
Molekulare Ursachen Vitamin K-abhängiger Gerinnungsstörungen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Simone Esther Rost
geboren in Schweinfurt

Würzburg, November 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2002 bis November 2005 am Institut für Human-genetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Müller-Reible ange-fertigt.

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Doktorarbeit selbständig und ausschließlich unter Ver-wendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Die Dissertation hat bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Es wurde zuvor kein anderer akademischer Grad erworben.

Würzburg, November 2005

Simone Rost

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Clemens Müller-Reible, der mir nicht nur die Möglichkeit geboten hat, sondern mich auch dazu ermutigt hat, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik durchzuführen. Für seine hervorragende Betreuung sowohl bei der praktischen als auch bei der theoretischen Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. Johannes Oldenburg, der inzwischen das Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Bonn leitet, für seine engagierte Förderung und Betreuung während meines gesamten Biologiestudiums und der anschließenden Promotion. Ihm verdanke ich dieses äußerst interessante Thema und die damit verbundenen Publikationen, sowie die Möglichkeit zusätzliche Erfahrungen in anderen Labors sammeln zu können.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Georg Krohne vom Lehrstuhl für Zoologie I, der sich freundlicherweise zur Begutachtung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ein grosser Dank geht auch an den Institutsleiter der Humangenetik, Herrn Prof. Dr. Holger Höhn, für die Durchsicht meiner Doktorarbeit und für die Auszeichnung mit dem Nachwuchspreis des Biozentrums der Universität Würzburg im Januar 2004.

Ganz herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Ernst Conzelmann vom Lehrstuhl für Physiologische Chemie II für seine fachlich kompetente und stets besonders freundliche Unterstützung bei biochemischen Fragen und für die Bereitstellung der HPLC.

Tanja Förster und Andreas Fregin danke ich ganz herzlich für die angenehme Zusammenarbeit in unserem gemeinsamen Labor. Sie standen mir bei theoretischen und praktischen Fragen stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite und waren für das Gelingen dieser Doktorarbeit unverzichtbar.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Müller-Reible möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und für ihre Hilfestellungen ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Barbara Kellner, die mir in all den Jahren stets zur Seite stand.

Ganz lieben Dank an meinen Verlobten Christoph Hasenmüller, der mir während der gesamten Zeit sehr viel Geduld und Verständnis entgegenbrachte und mich stets bei meinen Entscheidungen unterstützt hat.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht und natürlich auch bei meinen drei „kleinen“ Brüdern Dominik, Julian und Nicolas.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	2
3	EINLEITUNG	3
3.1	Der Vitamin K-Stoffwechsel	3
3.1.1	Vitamin K-abhängige Proteine.....	5
3.1.1.1	Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren und Blutgerinnung.....	7
3.1.1.2	Vitamin K-abhängiges Protein S und Gas 6	9
3.1.1.3	Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein	11
3.1.1.4	Vitamin K-abhängige Membranproteine.....	11
3.1.1.5	Vitamin K abhängige Proteine in Invertebraten.....	12
3.1.2	Die Vitamin K-abhängige γ -Glutamyl-Carboxylase	12
3.1.3	Der Vitamin K-Zyklus.....	16
3.1.4	Vitamin K-Antagonisten.....	19
3.2	Defekte im Vitamin K-Stoffwechsel.....	22
3.2.1	Erblich bedingter Mangel der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren	23
3.2.2	Warfarin-Resistenz und -Hypersensitivität beim Menschen	24
3.2.3	Warfarinresistenz bei Ratten und Mäusen	26
3.3	Zielsetzung der Arbeit	28
4	ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER PUBLIZIERTEN ERGEBNISSE.....	29
4.1	Klinische Symptomatik von VKCFD2 in zwei betroffenen Familien	29
4.2	Genetische Kartierung des VKCFD2-Locus	30
4.3	Identifizierung und Charakterisierung des VKORC1-Gens.....	33
4.4	Untersuchungen zur Warfarinresistenz bei Ratten und Mäusen.....	38
4.5	Systematische Mutagenese im humanen VKORC1-Gen.....	42
4.6	Nachweis und Charakterisierung neuer Mutationen im GGCX-Gen	46
4.7	Ausblick.....	51
5	LITERATURVERZEICHNIS	53
6	LISTE DER VORGELEGTE PUBLIKATIONEN	70

7	SONDERDRUCKE DER VORGELEGTEN PUBLIKATIONEN.....	71
7.1	Anlage 1.....	71
7.2	Anlage 2.....	77
7.3	Anlage 3.....	82
7.4	Anlage 4.....	88
7.5	Anlage 5.....	98
7.6	Anlage 6.....	106
8	WEITERE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....	111
8.1	Zusätzliche Veröffentlichungen.....	111
8.2	Vorträge.....	111
8.3	Posterpräsentationen.....	112
9	CURRICULUM VITAE	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APC	aktiviertes Protein C
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BMP	bone matrix protein (Osteocalcin)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cM	Centimorgan
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CYP2C9	Cytochrom P-450 2C9
DHPLC	denaturing high performance liquid chromatography (denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ER	endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag (exprimierte sequenzmarkierte Stelle)
et al.	et altera (und andere)
F	Faktor (z.B. FII, FVII, FIX, FX)
FLEEL	Phe-Leu-Glu-Glu-Leu (kurzes synthetisches Gla-Peptid)
FMFD	frühere Bezeichnung für VKCFD
G	Guanin
Gas 6	growth arrest specific protein 6 (wachstumsregulierendes Protein)
γ -CRS	γ -carboxylase recognition site (Erkennungssequenz für die GGCX)
GGCX	γ -Glutamyl-Carboxylase
Gla	γ -Carboxyglutamat
GST	Glutathion S-Transferase
HDN	haemorrhagic disease of the newborn (Vitamin K-Defizienz bei Neugeborenen)
HEK	human embryonic kidney (embryonale Nierenzellen)
HPLC	high performance liquid chromatography

INR	international normalized ratio (internationale, methodenunabhängige Einheit für die Prothrombinzeit)
kDa	Kilodalton
KH ₂	Vitamin K-Hydrochinon
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LOD	logarithm of the odds (Logarithmus des Verhältnisses von Kopplung und Nicht-Kopplung zweier Loci)
Mb	Megabase
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MGP	Matrix-Gla-Protein
mM	millimolar
μM	mikromolar
mRNA	messenger-RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-Terminus	Amino-Terminus
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRGP	Prolin-reiches Gla-Protein
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SHBD	Steroidhormon-Bindungsdomäne
SP	Serinprotease
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TF	tissue factor (Gewebefaktor)
TM	Transmembrandomäne
TMG	transmembranes Gla-Protein
VKCFD	familiärer Mangel aller Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren
VKD	vitamin K dependent (Vitamin K-abhängig)
VKOR	Vitamin K-2,3-Epoxid-Reduktase
VKORC1	Komponente 1 der VKOR
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
WR	Warfarinresistenz
WT	Wildtyp

1 ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin K ist ein essentieller Cofaktor für die posttranslationale γ -Carboxylierung von sog. Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, Knochenproteinen, Zellwachstumsregulierenden und weiteren Proteinen mit noch unbekannter Funktion. Defekte im Vitamin K-Stoffwechsel führen einerseits zu zwei verschiedenen Formen des familiären Mangels aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (VKCFD1 und 2) und andererseits zur Resistenz oder Hypersensitivität gegenüber Cumarinderivaten, wie Warfarin, die als Vitamin K-Antagonisten zur Antikoagulationstherapie bei thromboembolischen Erkrankungen, aber auch zur Bekämpfung von Ratten und Mäusen eingesetzt werden.

Die Aufklärung und Charakterisierung der molekularen Ursachen dieser Erkrankungen wird in dieser Doktorarbeit anhand von Veröffentlichungen dokumentiert. Ausgehend von der Charakterisierung zweier Familien mit dem VKCFD2-Phänotyp, wird die Kartierung des VKCFD2-Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 beschrieben. Durch eine systematische Mutationssuche in der ca. 130 Gene umfassenden Kandidatenregion von Chromosom 16 konnte das für diese Erkrankung und die Warfarinresistenz ursächliche Gen ausfindig gemacht werden. Dabei handelt es sich um das Gen für die entscheidende Komponente der Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKORC1), die den Recycling-Prozess von Vitamin K im sog. Vitamin K-Zyklus katalysiert. Die Charakterisierung des VKORC1-Proteins umfasst dessen subzelluläre Lokalisation, den Vergleich orthologer Proteine in verschiedenen Species und die funktionelle Charakterisierung von rekombinant exprimiertem VKORC1. Durch positionsspezifische Mutagenesen und anschließende Expression in humanen Nierenzellen konnten mehrere für die Funktion der VKORC1 relevante Aminosäuren identifiziert werden.

Die posttranslationale Modifikation der Vitamin K-abhängigen Proteine wird von der γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) katalysiert. Defekte in diesem Enzym wurden von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen als Ursache für die erste Form der VKCFD-Erkrankung nachgewiesen. In dieser Doktorarbeit werden drei weitere, von unserer Arbeitsgruppe identifizierte Mutationen im GGCX-Gen beschrieben, unter denen sich ein nachgewiesener Founder-Effekt an Position 485 des Proteins befindet. Die Arg485Pro-Variante wurde rekombinant in Insektenzellen exprimiert und konnte mittels kinetischer Studien als VKCFD1-verursachende Mutation verifiziert werden.

2 SUMMARY

Vitamin K is an essential cofactor for the posttranslational γ -carboxylation of the so-called vitamin K-dependent coagulation factors, bone proteins, cell growth regulating proteins and others of unknown function. Defects in vitamin K metabolism cause two different forms of combined deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors (VKCFD type 1 and type 2) as well as resistance or hypersensitivity to coumarin derivatives, such as warfarin, which act as vitamin K antagonists. Coumarins are used for anticoagulation therapy of thromboembolic diseases and in higher doses also for rodent pest control.

The aim of this thesis is to characterize the molecular basis of these diseases. This work has led to six publications. The VKCFD type 2 phenotype as described in two unrelated families was used to perform a homozygosity mapping of the VKCFD2 locus on the short arm of chromosome 16. A systematic mutation screening in the candidate region on chromosome 16 comprising approximately 130 putative genes resulted in the identification of the gene causative for VKCFD2 and the allelic phenotype warfarin resistance. This gene encodes the first identified component of the vitamin K epoxide reductase (VKORC1) which catalyzes the reduction of vitamin K epoxide as an important part of the so-called vitamin K cycle. Characterization of the VKORC1 protein includes its subcellular localization, comparison of orthologous proteins in different species and functional studies of the recombinant VKORC1. Amino acids which are relevant for protein structure or function were identified by site-directed mutagenesis experiments and subsequent expression in human embryonic kidney cells (HEK293).

Posttranslational modification of the vitamin K-dependent proteins is catalysed by the γ -glutamyl carboxylase (GGCX), an enzyme of the endoplasmic reticulum. Mutations in the gene encoding this enzyme were demonstrated to be causative for VKCFD type 1 by two different working groups. Our working group identified three additional mutations in the GGCX gene. Recurrent mutations at position 485 of the protein were shown to result from a founder effect. The Arg485Pro variant was recombinantly expressed in insect cells using the baculovirus system and could be verified as a causative mutation for the VKCFD1 phenotype by kinetic studies.

3 EINLEITUNG

3.1 Der Vitamin K-Stoffwechsel

Die Gruppe der K-Vitamine zählt neben Vitamin A, D und E zu den fettlöslichen Vitaminen. Chemisch handelt es sich um Naphthochinonderivate, welche sich vom synthetischen Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon, auch Vitamin K3 genannt) ableiten [Suttie, 1985]. Vitamin K1 kommt in allen grünen Pflanzen vor und wird deshalb auch als Phyllochinon bezeichnet; verschiedene Formen von Vitamin K2 oder Menachinon werden von Darmbakterien synthetisiert. Phyllochinon und Menachinone unterscheiden sich ausschließlich durch die Substitution ihrer Seitenkette am C3-Kohlenstoffatom. Vitamin K1 besitzt eine Phytyl-Seitenkette aus 20 Kohlenstoff, Vitamin K2 dagegen weist eine Polyisoprenyl-Seitenkette aus 4-13 Isopreneinheiten auf (Abb. 1). Die vorherrschende Form in der menschlichen Leber ist Vitamin K1. In den extrahepatischen Geweben kommt Vitamin K1 und MK-4 vor, ein Menachinon, welches in tierischen Geweben aus Phyllochinon gebildet wird [Booth & Suttie, 1998]. Im Gehirn von Ratten konnte fast ausschließlich MK-4 nachgewiesen werden, was für eine besondere Funktion dieser Form von Vitamin K spricht [Carrié et al., 2004].

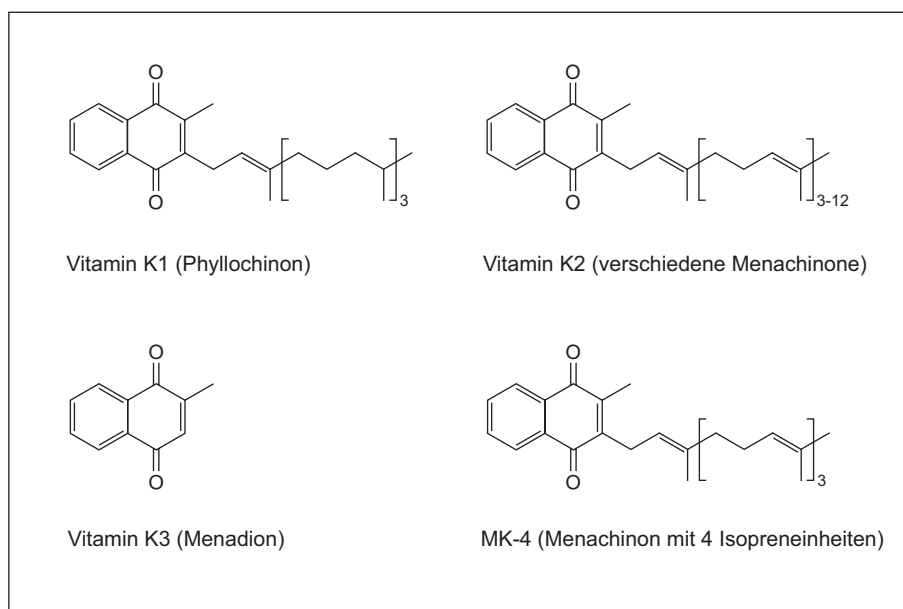


Abb. 1: Struktureller Aufbau verschiedener Formen von Vitamin K.

Vitamin K wird dem Körper über die Nahrung, v.a. Gemüse, sowie die Produktion durch Darmbakterien zugeführt. Den höchsten Vitamin K-Gehalt haben Kohl, Spinat und grüne Salate mit ca. 300-400 µg Phyllochinon pro 100 g [Booth & Suttie, 1998]. Die empfohlene

Tagesdosis an Vitamin K ist jedoch sehr umstritten, wobei man bislang von sehr geringen benötigten Mengen ausgegangen ist. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. empfiehlt z.B. eine Vitamin-K-Tagesdosis von nur etwa 70 µg [Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Frankfurt/Main 2000], was die Aufrechterhaltung einer normalen Blutgerinnung – eine wichtige Funktion von Vitamin K – durchaus gewährleistet. Die Entdeckung von Vitamin K-abhängigen Proteinen, die nicht in die Blutgerinnung involviert sind, und damit mehrerer verschiedener Vitamin K-benötigender Gewebe, deutet jedoch stark auf einen erhöhten Vitamin K-Bedarf hin [Vermeer & Hamulyák, 2004]. Nach Vermeer und Hamulyák gibt es zahlreiche Hinweise für einen direkten Zusammenhang zwischen Vitamin K-Aufnahme und dem Gesundheitszustand von Knochen und Gefäßen.

Vitamin K ist als Cofaktor für die sog. γ -Glutamyl-Carboxylase in vielen verschiedenen Bereichen des Metabolismus beteiligt, wobei die Blutgerinnung den zuerst entdeckten und am ausführlichsten beschriebenen Vitamin K-Stoffwechselweg darstellt. Bereits 1935 wurde die antihämorrhagische Wirkung von Vitamin K erstmals durch den dänischen Wissenschaftler Dam beschrieben [Dam, 1935]. Die Tatsache, dass dieses Vitamin für die Blutgerinnung so essentiell ist, verlieh dem Vitamin K seinen Namen – K steht für Koagulation. Da die Synthese der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteine in der Leber stattfindet, gilt diese als Hauptort des Vitamin K-Metabolismus. Voraussetzung für eine normal ablaufende Blutgerinnung ist die posttranslationale Modifikation der Faktoren II, VII, IX und X, sowie von Protein C, S und Z, die von einer ausreichenden Menge an Vitamin K abhängig ist [Shearer, 1995]. Die Knochen und das Gefäßsystem stellen weitere wichtige Stoffwechselorte von Vitamin K dar. Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein, die bei der Calcifizierung von Knochen, Knorpeln und Gefäßen eine entscheidende Rolle spielen, werden ebenfalls in einer Vitamin K-abhängigen Reaktion modifiziert [Shearer, 2000]. Sogar das Zellwachstum kann indirekt durch Vitamin K beeinflusst werden: z.B. fungiert das Vitamin K-abhängige Protein Gas 6 (growth arrest specific protein 6) als ein Regulator der Zellproliferation und Apoptose [Goruppi et al., 1996].

Neben diesen bekannten und in der Literatur sehr ausführlich beschriebenen Funktionen ist Vitamin K vermutlich an einer großen Anzahl weiterer Reaktionen im Metabolismus beteiligt. So gibt es z.B. mindestens vier weitere Vitamin K-abhängige Proteine noch unbekannter Funktion (siehe 3.1.1.4). Da reduziertes Vitamin K permanent benötigt und während der Carboxylierungsreaktion zu Epoxid umgewandelt wird, muss die für den Stoffwechsel aktive Form, die chemisch instabil ist, durch ein mikrosomales Oxidations-

Reduktions-System zurückgewonnen werden. Dieser Recycling-Weg wird als Vitamin K-Zyklus bezeichnet und kann durch Cumarine, die als Antikoagulantien wirken, inhibiert werden.

3.1.1 Vitamin K-abhängige Proteine

Das charakteristische Kennzeichen aller Vitamin K-abhängigen (VKD, vitamin K-dependent) Proteine ist ihre aminoternale Gla-Domäne, weshalb sie auch häufig als Gla-Proteine bezeichnet werden. Die insgesamt etwa 45 Aminosäuren (AS) umfassende Gla-Domäne beinhaltet bis auf wenige Ausnahmen 9-12 Glutamatreste (Glu-Reste) [Stenflo & Suttie, 1977; Berkner & Pudota, 1998]. Diese werden in einer Vitamin K-abhängigen Reaktion durch die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) in γ -Carboxyglutamatreste (Gla-Reste) überführt. Für ihre Identifizierung durch die GGCX besitzen alle VKD-Proteine eine γ -Carboxylase-Erkennungsregion (γ -CRS, γ -carboxylase recognition site), die sich fast immer in einer konservierten, 18 AS umfassenden Propeptidsequenz befindet, welche der Gla-Domäne vorausgeht. Drei der Propeptidreste sind hochkonserviert und für die Bindung an die GGCX entscheidend: Phenylalanin an Position -16, Alanin an -10 und Leucin an -6 [Berkner, 2000]. Mutationen an diesen AS-Positionen wirken sich deutlich auf die Affinität der VKD-Proteine zur GGCX aus.

Die Vitamin K-abhängigen Proteine lassen sich nach ihrer Funktion und ihrer Struktur in vier Gruppen einteilen (Abb. 2) [Berkner & Runge, 2004]. Zur ersten Gruppe gehören die prokoagulatorischen (gerinnungsfördernden) Faktoren II, VII, IX und X, sowie die antikoagulatorischen (gerinnungshemmenden) Proteine C und Z. Diese sechs Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren zeichnen sich durch eine stark ausgeprägte Homologie ihrer Sequenz und ihrer Domänen aus. Am N-Terminus ihrer Vorläuferproteine befindet sich ein Signalpeptid, welches das jeweilige Protein zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) dirigiert und dort abgespalten wird. Nach erfolgter posttranslationaler Modifikation durch die GGCX wird die Propeptiddomäne mit der γ -CRS im Golgi-Apparat ebenfalls entfernt, wodurch die Gla-Domäne den N-Terminus bildet.

Bis auf das Prothrombin (Faktor II) enthalten alle VKD-Gerinnungsfaktoren zwei EGF-(epidermal growth factor-) Domänen. Weiterhin besitzen sie eine C-terminale Serinprotease- (SP-) Domäne und sind somit, bis auf Protein Z, enzymatisch aktiv.

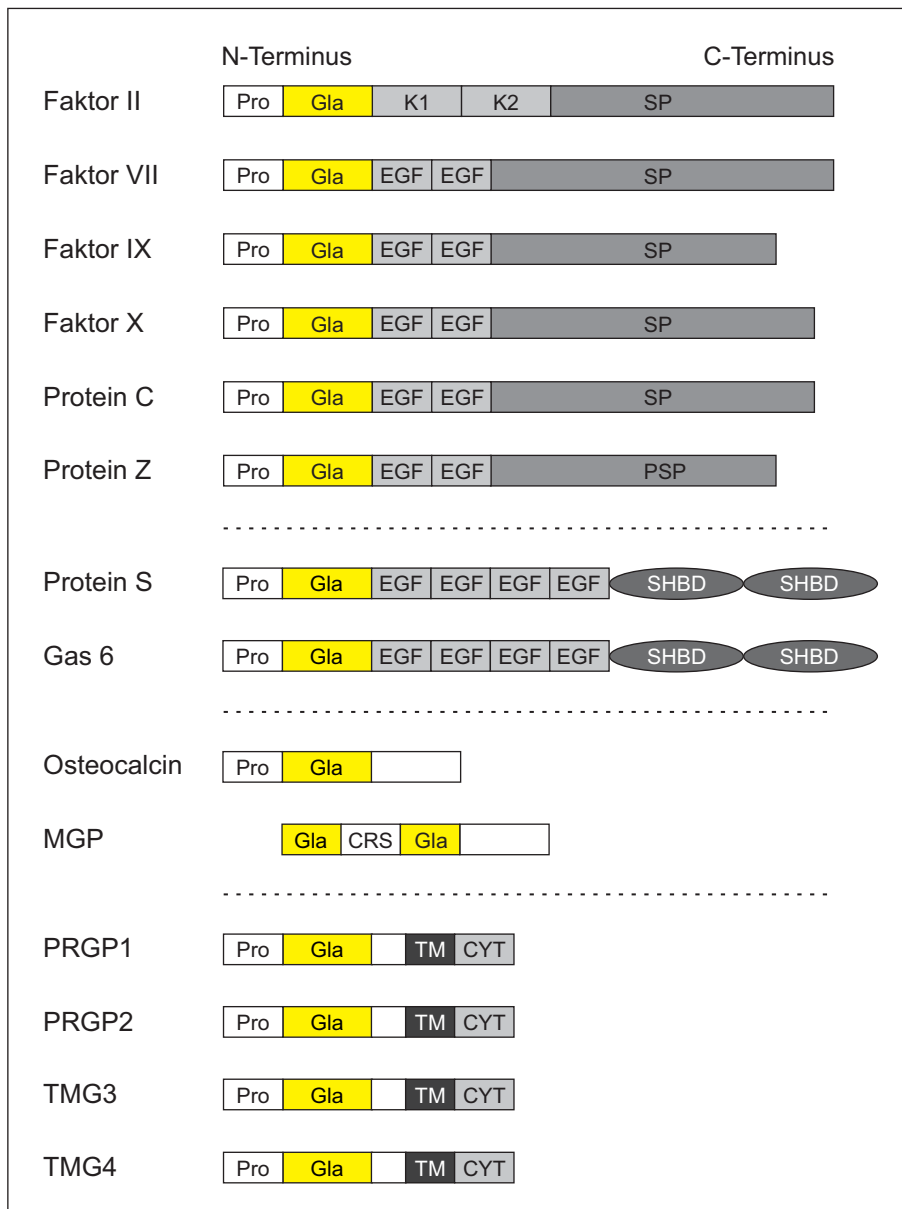


Abb. 2: Schematischer Aufbau Vitamin K-abhängiger Proteine (nach Berkner & Runge, 2004). CRS = γ -Carboxylase-Erkennungssequenz, CYT = Cytoplasmatische Domäne, EGF = Epidermale Wachstumsfaktordomäne, Gla = γ -Carboxyglutamatdomäne, K = Kringeldomäne, Pro = Propeptid, PSP = Pseudo-Serinproteasedomäne, SHBD = Steroidhormon-Bindungsdomäne, SP = Serinproteasedomäne, TM = Transmembrandomäne.

Aufgrund der auffällig homologen Struktur des Zellzyklus-stimulierenden Proteins Gas 6 (growth arrest specific protein 6) und des prokoagulatorischen Protein S können diese beiden als separate Gruppe der VKD-Proteine angesehen werden. Sie unterscheiden sich strukturell von den erstgenannten durch eine Schleifenregion, vier darauffolgenden EGF-Domänen und zwei Steroidhormon-Bindungsdomänen (SHBD). Wie noch näher erläutert wird, üben sie auch eine ähnliche Funktion aus.

Die dritte Gruppe bilden die beiden VKD-Knochenproteine Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein (MGP). Dabei handelt es sich um die kleinsten bekannten Gla-Proteine mit nur drei bzw. fünf Glutamatresten in ihrer Gla-Domäne. MGP besitzt als einziges VKD-Protein keine N-terminale Propeptiddomäne, weshalb sich die γ -CRS in seiner Gla-Domäne befindet.

Zur vierten Gruppe der VKD-Proteine zählen vier Membranproteine mit noch ungeklärter Funktion. Ihre Struktur ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein einer einzelnen Transmembrandomäne (TM), sowie einer cytoplasmatischen (CYT) Domäne.

3.1.1.1 Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren und Blutgerinnung

Die plasmatische Gerinnung erfolgt über eine Kaskade von Zymogenaktivierungen – Aktivierungen der inaktiven Vorstufen von Gerinnungsfaktoren - an deren Ende die Umwandlung von Fibrinogen zu vernetztem Fibrin steht. Die meisten prokoagulatorischen Proteine sind Serinproteasen, die den nachfolgenden Faktor durch proteolytische Spaltung aktivieren. Dabei wird der aus einer langen Peptidkette bestehende inaktive Faktor derart gespalten, dass zwei kürzere durch Disulfidbrücken verbundene Ketten entstehen, wobei das aktive Zentrum des Enzyms freigelegt wird.

Um die Geschwindigkeit der Proteolyse und somit den Ablauf der Gerinnungskaskade um ein Vielfaches zu erhöhen, bilden einige Gerinnungsfaktoren Komplexe mit Ca^{2+} , Phospholipiden und/oder Cofaktoren. Für die Anheftung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteine FII (Prothrombin), FVII, FIX und FX an Phospholipidmembranen von Thrombozyten bzw. Gewebezellen ist das Vorhandensein von Ca^{2+} essentiell. Die Bindung an Ca^{2+} wiederum ist nur durch ihre posttranslationale Modifikation im Anschluss an ihre ribosomale Proteinsynthese möglich [Furie & Furie, 1988].

Je nach Auslösemechanismus unterscheidet man den exogenen (extrinsischen), von Faktor VII ausgehenden, und den endogenen (intrinsischen), von Faktor XII eingeleiteten Aktivierungsweg der Blutgerinnung (Abb. 3). Um Faktor X bei Verletzung des Endothels vom exogenen Weg her zu aktivieren, muss der Vitamin K-abhängige Faktor VII zunächst einen Komplex mit Gewebefaktor (TF, tissue factor), Ca^{2+} und Phospholipiden ausbilden. In diesem Gewebsthromboplastinkomplex kann der aktivierte Faktor VII auch das intrinsische System aktivieren. Alternativ erfolgt die endogene Gerinnungsaktivierung durch Kontakt von Faktor XII mit negativ geladenen Oberflächen, wie Kollagenfasern, Zellfragmenten oder bakteriellen Endotoxinen.

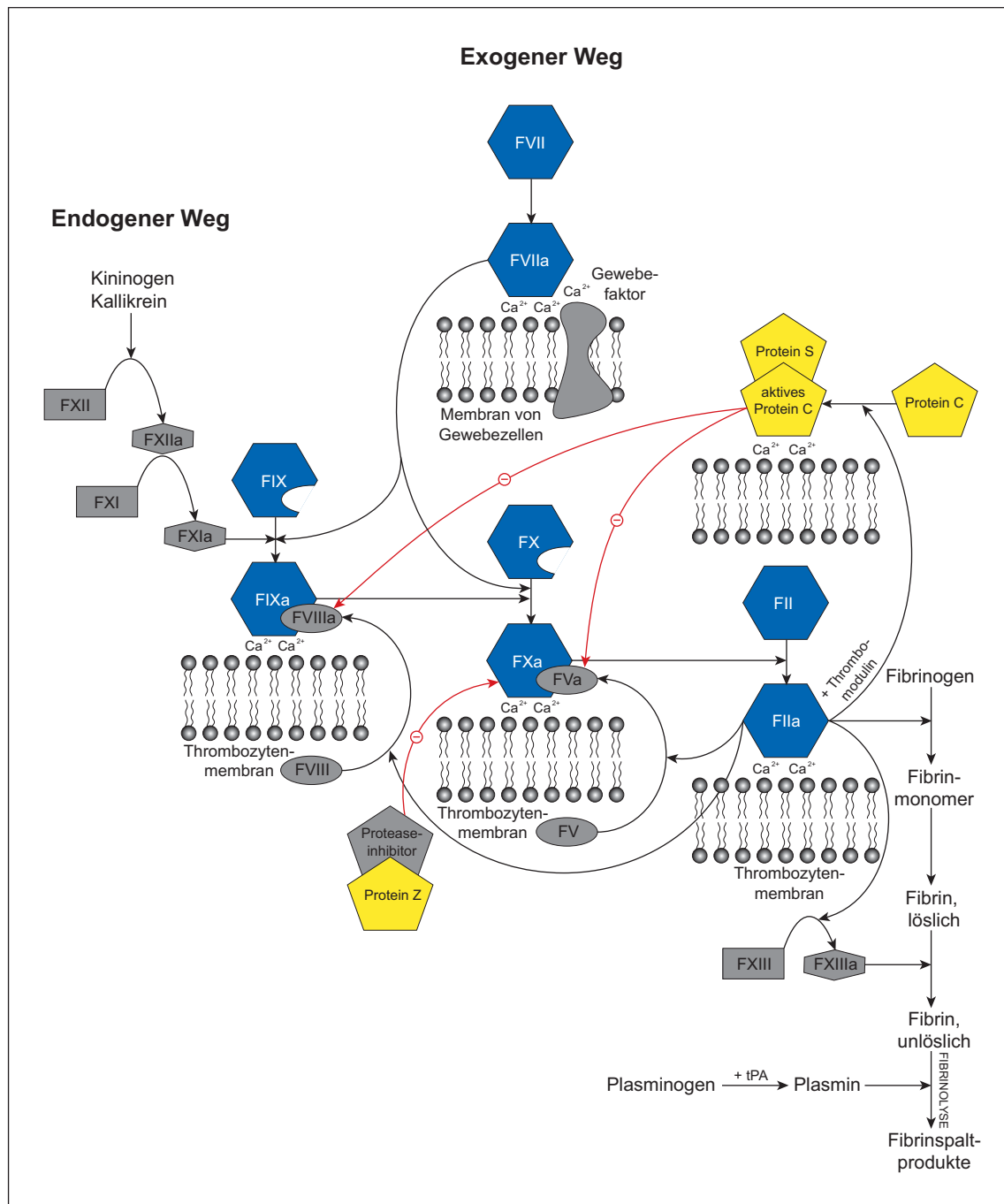


Abb. 3: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade. Prokoagulatorische Vitamin K-abhängige Proteine sind blau dargestellt, antikoagulatorische Proteine gelb. Inhibierende Einflüsse sind durch rote Pfeile mit Minus-Zeichen verdeutlicht, schwarze Pfeile stehen für aktivierende Einflüsse, meist durch proteolytische Spaltung.

Der aktivierte Faktor XII (FXIIa) spaltet Faktor XI zu FXIa, welcher wiederum den Vitamin K-abhängigen Faktor IX aktiviert. FIXa liegt im Komplex mit seinem Cofaktor FVIIIa und Ca^{2+} an die Thrombozytenmembran gebunden vor und kann auf diese Weise Faktor X aktivieren [Linnemann & Kühl, 2004].

Beide Systeme laufen in der Aktivierung des Vitamin K-abhängigen Faktors X zusammen, welcher, gemeinsam mit seinem Cofaktor FV, Prothrombin (FII) zu Thrombin aktiviert.

Thrombin wiederum spaltet Fibrinogen zu Fibrinmonomeren, deren Aggregation zur Bildung von Fibrinpolymeren und schließlich zu einem stabilen Fibrinnetz führt (Abb. 3) [Stryer, Biochemie, 1999].

Prothrombin ist das erste Protein, in dem Gla-Reste identifiziert wurden, die direkt mit der Bindung von Ca^{2+} in Zusammenhang gebracht werden konnten und stellt somit das zuerst entdeckte Vitamin K-abhängige Protein dar [Stenflo et al., 1974; Nelsestuen et al., 1974].

Die antikoagulatorischen Proteine C, S und Z sind für die Regulierung der Blutgerinnung essentiell und werden ebenfalls in einer Vitamin K-abhängigen Reaktion modifiziert. Protein C wird durch an Thrombomodulin gebundenes Thrombin aktiviert und bildet einen Komplex mit dem Cofaktor Protein S, Ca^{2+} und Phospholipiden. Das aktivierte Protein C (APC) inhibiert die aktivierten Faktoren V (FVa) und VIIIa durch proteolytische Spaltung und stellt somit einen der wichtigsten Mechanismen zur lokalen Begrenzung der Gerinnungsvorgänge dar [Esmon, 2000]. Das Vitamin K-abhängige Protein Z spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Blutgerinnung, indem es als Cofaktor im Komplex mit dem plasmatischen Protein Z-abhängigen Proteaseinhibitor zur Inaktivierung von Faktor Xa beiträgt [Sofi et al., 2004].

Eine intakte Blutgerinnung ist erforderlich, um jederzeit Gefäßverletzungen kurzfristig schließen zu können. Andererseits muss „im Ruhezustand“ eine ständige Balance zwischen aktivierten und inaktiven Faktoren sowie pro- und antikoagulatorischen Modulatoren erreicht werden, da eine stark erniedrigte Konzentration an Gerinnungsfaktoren zu Blutungsneigungen, eine erhöhte Konzentration zu einem gesteigerten Thromboserisiko führen kann.

3.1.1.2 Vitamin K-abhängiges Protein S und Gas 6

Neben der Blutgerinnung erfüllt Protein S eine weitere Funktion im Stoffwechsel. Es weist, wie bereits beschrieben, denselben strukturellen Aufbau wie Gas 6 auf, ein wachstumsregulierendes VKD-Protein. Protein S und Gas 6 können durch Bindung an spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) u.a. auf Zellwachstum, Zelltransformation und Apoptose Einfluß nehmen [Saxena et al., 2001]. Gas 6 wurde zuerst im Medium von wachstumsarretierten Fibroblasten nachgewiesen [Manfioletti et al., 1993] und ist ein Ligand für drei verwandte RTK-Familien, Axl (Tyro 7), Sky (Tyro 3) und Mer (Tyro 12) [Nagata et al., 1996]. Dabei handelt es sich um Protooncogene, die bei der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle spielen. Protein S ist ausschließlich ein Ligand

für Tyro 3, wobei die Interaktion von Rezeptor und Ligand wie bei Gas 6 über die globuläre Domäne erfolgt [Nyberg et al., 1997]. Unabhängig von seiner wachstumsstimulierenden Wirkung vermag Gas 6 Zellen in verschiedenen Zellsystemen, wie z.B. Gefäßmuskelzellen [Nakano et al., 1996] und NIH 3T3-Fibroblasten [Goruppi et al., 1996] vor Apoptose zu schützen. Dies erfolgt durch eine komplexe Signaltransduktionskaskade über das sog. Vitamin K-abhängige Rezeptor-Liganden-System (Abb. 4).

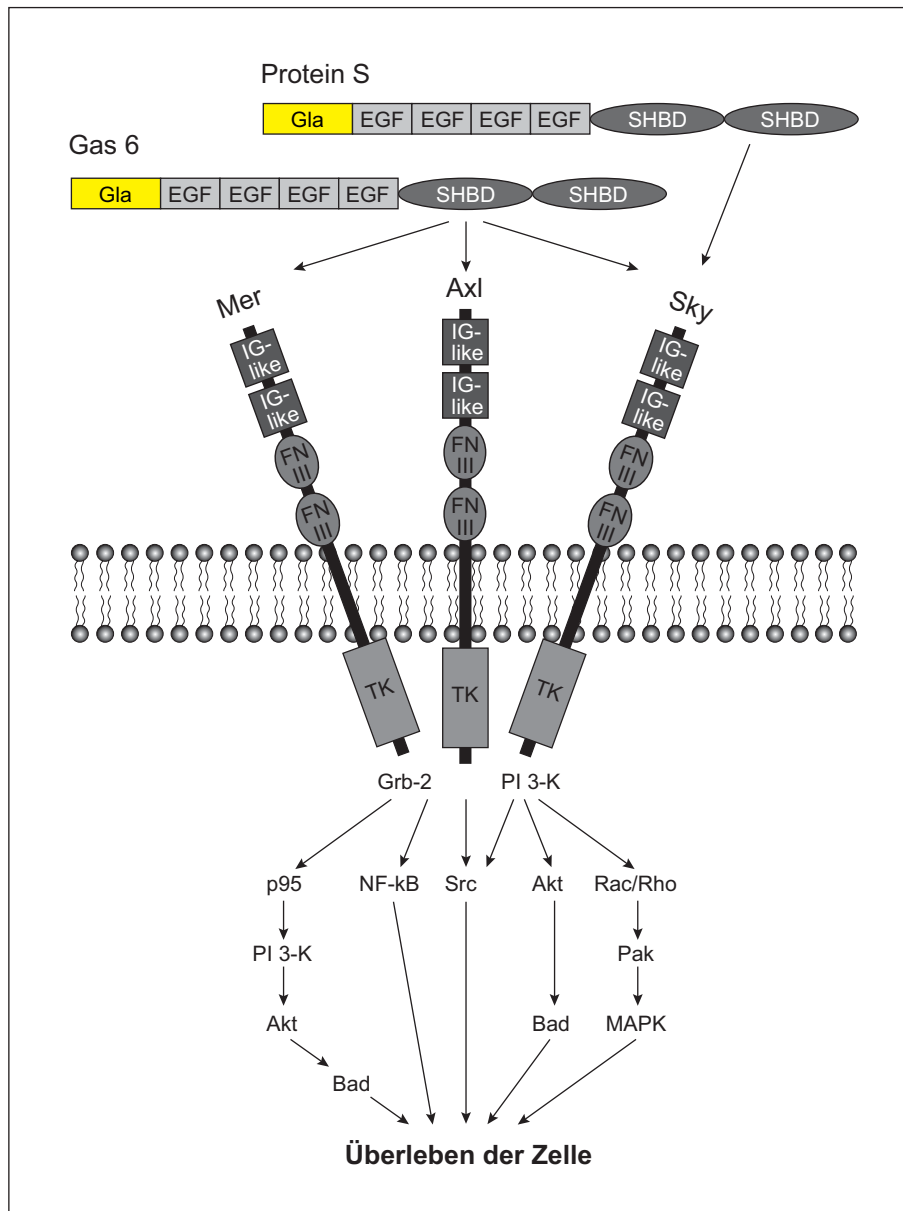


Abb. 4: Mögliche Signaltransduktionswege, die durch Bindung der Vitamin K-abhängigen Liganden Gas 6 bzw. Protein S an spezifische Rezeptor-tyrosinkinase ausgelöst werden können (nach Saxena et al., 2001).
 FN = Fibronectin-Domäne, IG = Immunglobulindomäne, MAPK = Mitogenaktivierte Proteinkinase, PI 3-K = Phosphatidylinositol 3-Kinase, TK = Tyrosinkinase-Domäne.

3.1.1.3 Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein

Neben der Leber, in der die Synthese der Gerinnungsfaktoren stattfindet, sind die Knochen und das Gefäßsystem weitere bedeutsame Speicher- und Stoffwechselorte von Vitamin K. Das Vitamin K-abhängige Protein Osteocalcin (bone matrix protein, BMP) wird hauptsächlich in differenzierten Osteoblasten exprimiert und ist somit in großer Menge in den Knochen vorhanden [Shearer, 2000]. Mitte der 80er Jahre wurde ein Zusammenhang zwischen einem verminderten Spiegel an zirkulierendem Vitamin K und Osteoporose entdeckt [Hart et al., 1985]. Das aufgrund des niedrigen Vitamin K-Spiegels untercarboxylierte Osteocalcin gilt als ein empfindlicher Indikator für die Knochendichte (BMD, bone mineral density) und für ein erhöhtes Risiko von Knochenbrüchigkeit, v.a. Hüftfrakturen.

Matrix-Gla-Protein (MGP) ist ein kleines sekretorisches Protein mit nur fünf Gla-Resten und konnte erstmals 1983 aus demineralisierten Knochenextrakten isoliert werden [Price et al., 1983]. MGP ist ein wirksamer Inhibitor der Calcifizierung von Arterien und Knorpeln. Den Beweis hierfür erbrachte eine Knock-out-Maus, der das MGP-Gen fehlt [Luo et al., 1997]. Diese Deletion verursachte eine äußerst schnelle Calcifizierung der elastischen Lamellen von Arterien, was aufgrund von Blutgefäßbrüchen schnell zum Tod der Mäuse führte. Mutationen im menschlichen MGP-Gen führen zum autosomal rezessiv vererbten Keutel-Syndrom [Munroe et al., 1999], welches durch eine abnorme Calcifizierung der Ohrmuscheln, Nase, Luftröhre, des Kehlkopfes und der Rippen gekennzeichnet ist.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass für eine ausreichende Carboxylierung der extrahepatischen Gla-Proteine Osteocalcin und MGP eine höhere Tagesdosis an Vitamin K benötigt wird als für die Gerinnungsfaktoren, die in der Leber synthetisiert werden [Shearer, 2000]. Außerdem konnte eine verminderte Vitamin K-Aufnahme mit erhöhter Arterienverkalkung, gesteigertem Herzinfarktrisiko und einem Anstieg der Sterberate aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden [Jie et al., 1995; Vermeer & Hamulyák, 2004].

3.1.1.4 Vitamin K-abhängige Membranproteine

Neben den dargestellten Vitamin K-abhängigen Proteinen mit bekannter Funktion wurden vier Membranproteine entdeckt, die ebenfalls Gla-Reste aufweisen, aber bislang eine noch unbekannte Funktion haben. Dabei handelt es sich zum einen um die beiden Prolin-reichen Gla-Proteine PRGP1 und PRGP2 [Kulman et al., 1997] und zum anderen um die

transmembranen Gla-Proteine TMG3 und TMG4 [Kulman et al., 2001]. Diese vier Gla-Proteine wurden durch BLAST-Suche von konservierten Gla-Motiven in EST- (expressed sequence tag) Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entdeckt. Neben dem Gla-Motiv beinhalten die vier Proteine eine bzw. zwei PPXY-Sequenzen, welche ein potentiell WW-Domänen-Bindemotiv darstellen [Chen & Sudol, 1995]. WW-Domänen befinden sich z.B. in Proteinen, die an Interaktionen mit dem Cytoskelett, Signaltransduktion oder im Zellzyklus involviert sind [Einbond & Sudol, 1996]. Die Identifizierung dieser Membranproteine durch Datenbanksuche gibt Anlass zur Spekulation, dass noch weitere unentdeckte Gla-Proteine vorhanden sein könnten und somit Vitamin K neben der Blutgerinnung und dem Knochenstoffwechsel weitere essentielle Funktionen im Metabolismus von Vertebraten erfüllt.

3.1.1.5 Vitamin K abhängige Proteine in Invertebraten

Aus mehreren Arten mariner Kegelschnecken der Gattung *Conus* konnten Vitamin K-abhängige Gifte, die sog. Conotoxine, isoliert werden. Conotoxine sind kleine, lähmende neuroaktive Peptide, die die Kegelschnecken in ihre Beute injizieren. Unter den zahlreichen bisher identifizierten Conotoxinen konnten das Conantokin-R aus *Conus radiatus* [Stanley et al., 1997], das Conantokin-G aus *Conus geographus* [Rigby et al., 1997] und das epsilon-TxIX von *Conus textile* [Bush et al., 1999] isoliert werden. Conantokin-G besteht aus nur 17 Aminosäuren, von denen fünf γ -Carboxyglutamatreste sind, die mit Ca^{2+} und Mg^{2+} Komplexe eingehen können. Conantokine inhibieren sog. NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat-) Rezeptoren und wirken somit auf das zentrale Nervensystem von Vertebraten [Clark et al., 1981].

Bis zur Entdeckung dieser Gla-beinhaltenen Conotoxine in den Meeresschnecken, wurden Vitamin K-abhängige Proteine ausschließlich in Vertebraten beschrieben.

3.1.2 Die Vitamin K-abhängige γ -Glutamyl-Carboxylase

Die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) ist ein integrales Membranprotein des rauhen Endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparates [Carlisle & Suttie, 1980; Stanton et al., 1991] und wird neben der Leber in einer Vielzahl weiterer Gewebe wie z.B. Haut, Lunge oder Niere exprimiert [Vermeer, 1984; Suttie, 1985]. Das GGCX-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p1.2) lokalisiert [Kuo et al., 1994] und besteht aus 15

Exons (Abb. 5). Es codiert für eine 758 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa [Wu et al., 1991 und 1997a)]. Das Protein besteht aus mindestens fünf Transmembrandomänen, wobei die aminoterminalen Hälfte der Polypeptidkette an deren Bildung beteiligt ist und die carboxyterminale Hälfte eine Schleife im Lumen des ER bildet (Abb. 5) [Tie et al., 2000].

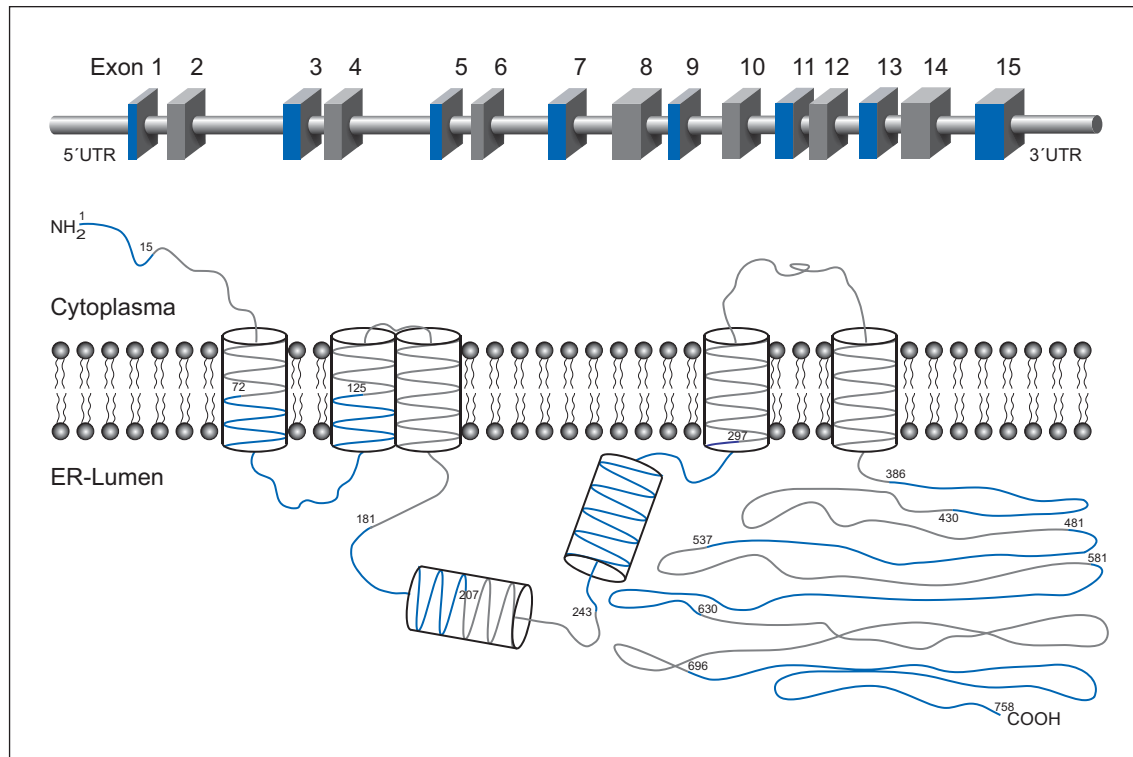


Abb. 5: Modell des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens (oben) und Proteins (unten) (nach Tie et al., 2000). Die Exons sind in alternierenden Farben blau und grau dargestellt und auf die Polypeptidkette projiziert. Die Zahlen im Proteinmodell geben jeweils die letzte durch das zugehörige Exon codierte Aminosäure an. Die Transmembrandomänen sind in Form von Zylindern dargestellt, wobei die beiden ausserhalb der Membran liegenden Zylinder stark hydrophobe Regionen symbolisieren.

Bis heute konnte die exakte Lokalisation der für die Enzymaktivität relevanten Domänen, wie die Propeptidbindungsstelle, die Vitamin K-Bindungsstelle und die katalytische Domäne nicht bis ins Detail aufgeklärt werden. Beispielsweise konnte die Arbeitsgruppe um Yamada zeigen, dass sich die Propeptidbindungsstelle der GGCX in einem Bereich zwischen Aminosäure 50 bis 225 erstreckt [Yamada et al., 1995]. Wu et al. hingegen lokalisierten diese an Position 438-507 [Wu et al., 1997b)]. Aufgrund ihrer Homologie zur Propeptidsequenz von MGP bilden die AS-Reste 495-513 der GGCX nach Meinung von Price und Williamson ein sog. internes Propeptid, welches durch intramolekulare Bindung an die Propeptidbindungsstelle zur Regulation der GGCX beitragen soll [Price & Williamson, 1993]. Lin und Kollegen konnten jedoch durch zielgerichtete Mutagenese

zeigen, dass es sich bei diesem vermuteten internen Propeptid um die eigentliche Propeptidbindungsstelle der GGCX handelt [Lin et al., 2002].

Die GGCX ist das einzige bekannte Enzym, das Vitamin K in seiner reduzierten Form, Vitamin K-Hydrochinon, als Cofaktor benötigt. Sie katalysiert zwei chemische Reaktionen in ihrem aktiven Zentrum [Wallin & Suttie, 1982]. Die physiologisch wichtige Reaktion ist die Addition von Kohlendioxid an spezifische Glutamatreste von Vitamin K-abhängigen Proteinen, wobei γ -Carboxyglutamat entsteht. Die Umwandlung des schwachen Ca^{2+} -Chelators Glutamat in den weitaus stärkeren Ca^{2+} -Chelator γ -Carboxyglutamat bewirkt eine Erhöhung der Bindungsaffinität von Ca^{2+} und dadurch bedingt eine Konformationsänderung in diesen Proteinen. Dies führt zu einer Verankerung der Proteine an Phospholipidmembranen z.B. von Thrombozyten, was für ihre Aktivierung und somit für die Ausübung ihrer physiologischen Funktion essentiell ist [Sperling et al., 1978; Borowski et al., 1986].

Als zusätzliche enzymatische Aktivität besitzt die GGCX die Funktion einer Epoxidase [Morris et al., 1993], welche die Oxidation von Vitamin K-Hydrochinon (KH_2) zu Vitamin K-2,3-Epoxid unter Sauerstoffverbrauch katalysiert.

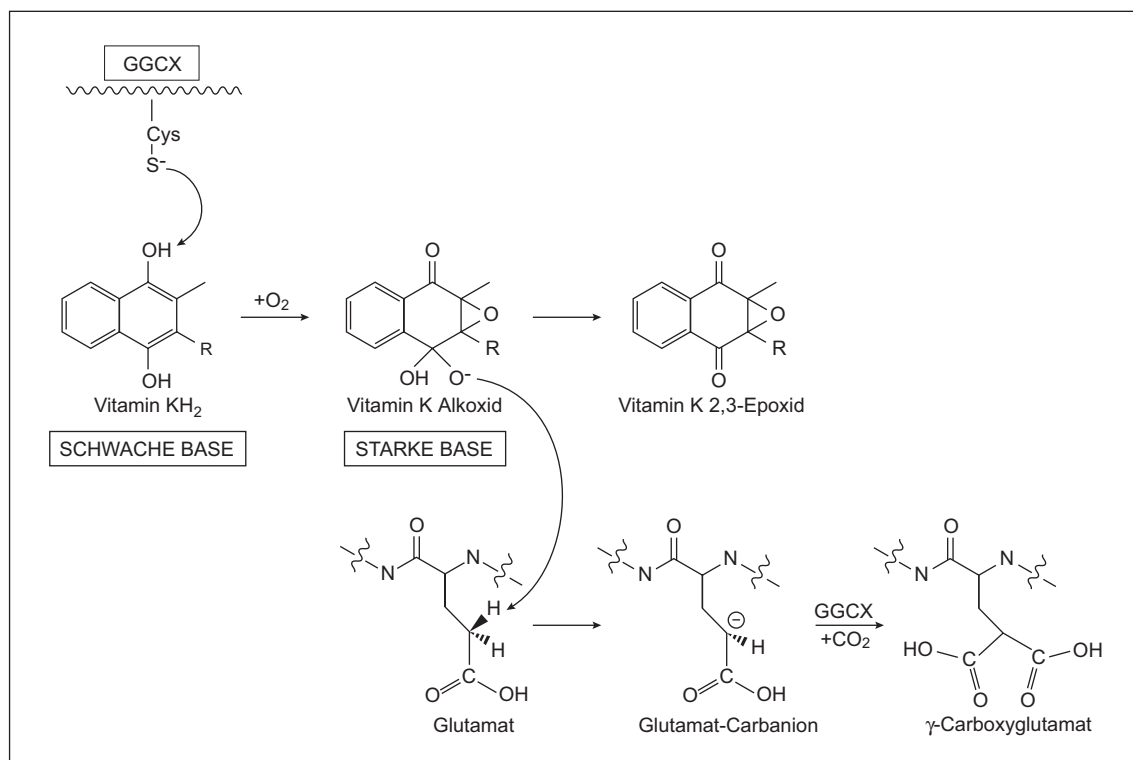


Abb. 6: Mechanismus der γ -Carboxylierung (nach Dowd et al., 1995). Die Glutamatreste in der Gla-Domäne von Vitamin K-abhängigen Proteinen werden durch Vitamin K-Alkoxid deprotoniert und durch Addition von Kohlendioxid in γ -Carboxyglutamat überführt. Sowohl die Umwandlung von Vitamin K-Hydrochinon in -Epoxid, als auch von Glutamat in γ -Carboxyglutamat werden von der γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) katalysiert.

Nach dem hypothetischen Mechanismus von Dowd et al. (1995) entsteht dabei das reaktive Naphthochinon-Intermediat Vitamin K-Alkoxid, welches sehr stark basisch ist. Diese Base entzieht vermutlich der γ -Methylengruppe des Glutamats ein Proton, wodurch ein reaktives Carbanion-Zwischenprodukt entsteht. Durch die anschließende Anlagerung von Kohlendioxid an das Glutamat-Carbanion wird das Produkt γ -Carboxyglutamat gebildet (Abb. 6) [Presnell & Stafford, 2002].

Voraussetzung für die Substraterkennung und die anschließende γ -Carboxylierung der Gla-Proteine ist das Vorhandensein einer konservierten aminoterminalen γ -CRS bzw. Propeptidsequenz, mit welcher die GGCX interagieren kann [Jorgensen et al., 1987]. Die Propeptidsequenzen der verschiedenen VKD-Proteine besitzen sehr unterschiedliche Affinitäten zur γ -Carboxylase. Von neun untersuchten Propeptidsequenzen weist Faktor X die höchste und Osteocalcin die niedrigste Affinität zur Carboxylase auf [Stanley et al., 1999]. Zusätzlich zur Andockungsfunktion an die GGCX fungiert die Propeptidsequenz auch als allosterischer Aktivator, indem die Affinität der Gla-Domäne zur GGCX erhöht wird (Abb. 7, A+B) [Knobloch & Suttie, 1987]. Die kovalente Bindung der Propeptidsequenz und der Gla-Domäne an die GGCX führt wiederum zur Erhöhung der Affinität der GGCX gegenüber Vitamin KH_2 bedingt durch eine Konformationsänderung der Vitamin K-Bindungstasche (Abb. 7, C) [Berkner, 2000].

Um eine vollständige Carboxylierung der VKD-Proteine zu erreichen, können nach Berkner (2000) zwei verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen werden. Zum einen kann eine Art Qualitätskontrolle die Sekretion von nur teilweise carboxylierten VKD-Proteinen verhindern, was z.B. anhand der schnellen Degradierung von unvollständig carboxyliertem humanem Protein C gezeigt werden konnte [Tokunaga et al., 1995]. Zweitens kann eine vollständige Carboxylierung der VKD-Proteine gewährleistet werden, indem die γ -Carboxylase prozessiv arbeitet, d.h. dass alle Modifikationen der Glutamatreste während eines einzigen Bindungsereignisses ablaufen (Abb. 7, D) [Morris et al., 1995] und dass die GGCX ihr Substrat nicht freisetzt, ehe es vollständig carboxyliert ist. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die GGCX zwischen Glu- und Gla-Resten unterscheiden können muss [Berkner, 2000].

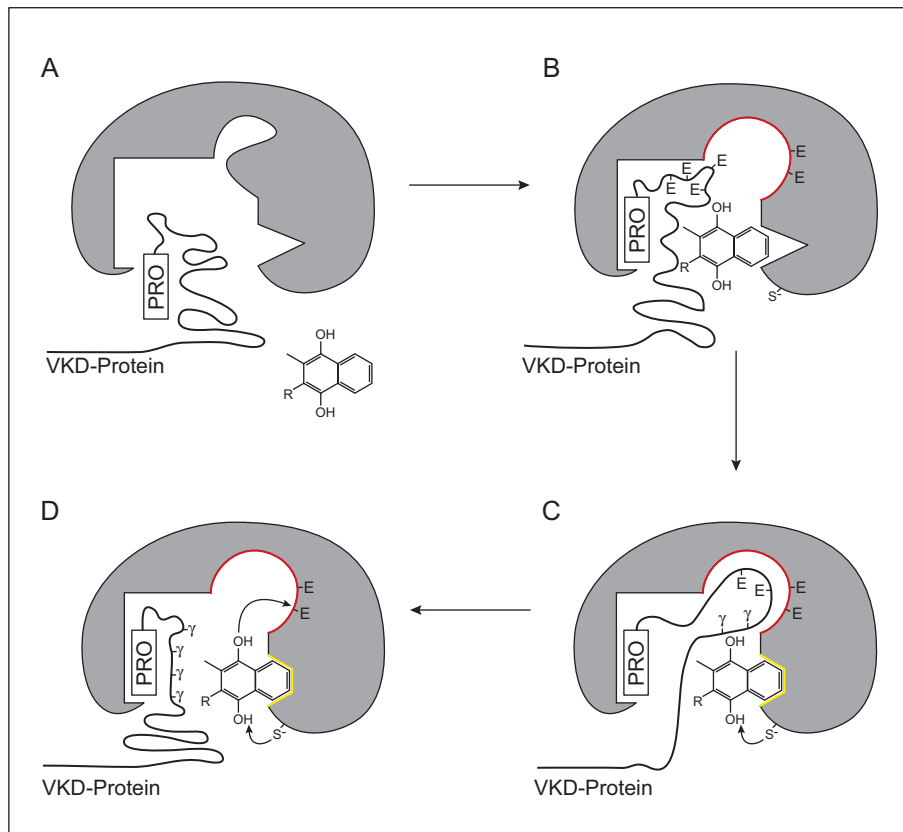


Abb. 7: Das katalytische Zentrum der γ -Glutamyl-Carboxylase (nach Berkner, 2000). Die Bindung des Propeptids (PRO) eines Vitamin K-abhängigen Proteins an die GGCX erhöht zunächst die Affinität für die Bindung der Gla-Domäne (B) und schließlich die Affinität zum Cofaktor Vitamin K (C). Alle Glutamatreste E werden sequentiell während eines einzigen Bindungsereignisses carboxyliert (D). Außerdem kann die GGCX eine Selbst-Carboxylierung durchführen (D).

Eine weitere Eigenschaft der GGCX ist die Fähigkeit zur Selbst-Carboxylierung (Abb. 7, D) [Berkner & Pudota, 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinant-exprimierte, autocarboxylierte γ -Carboxylase in Abwesenheit von Gla-Proteinen schneller abgebaut wird als in Anwesenheit ihrer Substrate. Eine Erklärung für die Selbst-Carboxylierung der GGCX könnte folglich die Regulation des Carboxylase-Spiegels sein, welcher von der Verfügbarkeit von Vitamin K bzw. VKD-Proteinen abhängt.

3.1.3 Der Vitamin K-Zyklus

Die γ -Carboxylierung eines Glutamatrestes ist stöchiometrisch gekoppelt mit der Bildung eines Moleküls Vitamin K-2,3-Epoxid. Da für einen erneuten Carboxylierungsschritt die Bereitstellung von Vitamin K-Hydrochinon erforderlich ist, muss das Vitamin K recycled werden, d.h. das Epoxid über die Chinon-Form zum Hydrochinon reduziert werden. Die

Reaktionsfolge von Vitamin K-Oxidation durch die GGCX und anschließendem Recycling kann als Redox-Zyklus dargestellt werden und wird als Vitamin K-Zyklus bezeichnet (Abb. 8).

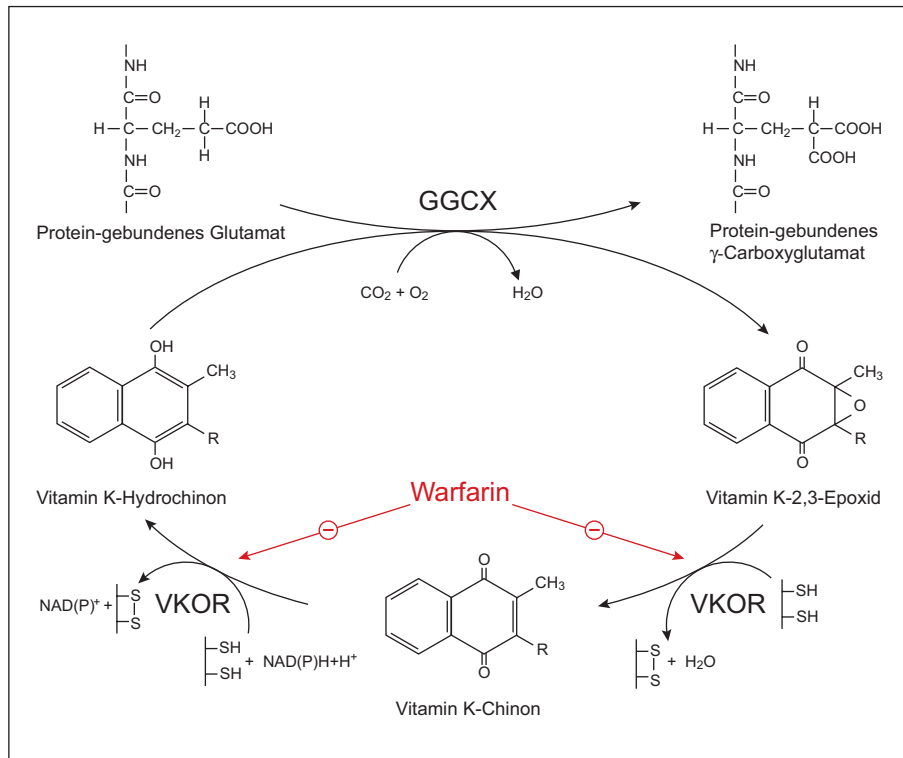


Abb. 8: Der Vitamin K-Zyklus (nach Wallin & Martin, 1987). Im oberen Teil des Zyklus ist die γ -Carboxylierung dargestellt, im unteren Teil das Recycling von Vitamin K durch die Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKOR). Die VKOR kann durch Cumarinderivate wie z.B. Warfarin inhibiert werden, was die Bereitstellung des Cofaktors Vitamin K-Hydrochinon für die GGCX verhindert.

Nach Wallin und Martin (1987) konnten zwei unabhängige Vitamin K-reduzierende Enzyme identifiziert werden. Das Flavoprotein DT-Diaphorase, eine NAD(P)H-Dehydrogenase (NQO1 oder NMOR1, EC 1.6.99.2) vermag ausschließlich die Chinon-Form des Vitamin K zu reduzieren [Wallin et al., 1978] und benötigt sehr hohe Konzentrationen an Vitamin K-Chinon, so dass es unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle für die Generierung von reduziertem Vitamin K spielt. Die Dithiol-gekoppelte Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKOR) hingegen ist in der Lage, beide Formen des Vitamin K zu reduzieren [Cain et al., 1998] und arbeitet bei physiologischen Konzentrationen an Vitamin K-Epoxid bzw. -Chinon. Sie wird daher als das eigentliche Recycling-Enzym angesehen.

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1970 durch Bell und Matchinger (1970) haben mehrere Arbeitsgruppen versucht, die Vitamin K-Epoxid-Reduktase aus Mikrosomenpräparationen

aus Rinder-Leber [Mukharji & Silverman, 1985] bzw. aus Ratten-Leber [Cain et al., 1997; Begent et al., 2001] zu isolieren. Eine Reinigung zur Homogenität und die vollständige Charakterisierung der beteiligten Proteine ist aber bisher nicht gelungen. Auf der Basis dieser Studien ging man davon aus, dass es sich bei der VKOR um einen Multienzymkomplex aus mindestens zwei Komponenten handelt, der in der ER-Membran verankert ist. Nach Cain et al. bilden die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH, EC 3.3.2.3) und ein bisher noch unbekanntes Mitglied der Glutathion-S-Transferase-Familie die Hauptbestandteile des Komplexes und liegen vermutlich in Assoziation mit der γ -Glutamyl-Carboxylase vor (Abb. 9). Das von Cain et al. vorgeschlagene Modell weist eine hohe Analogie zum Lipoxygenase-Enzymkomplex auf, welcher sich aus dem Glutathion-S-Transferase-verwandten FLAP-Protein und einer cytosolischen Lipoxygenase zusammensetzt [Abramovitz et al., 1993].

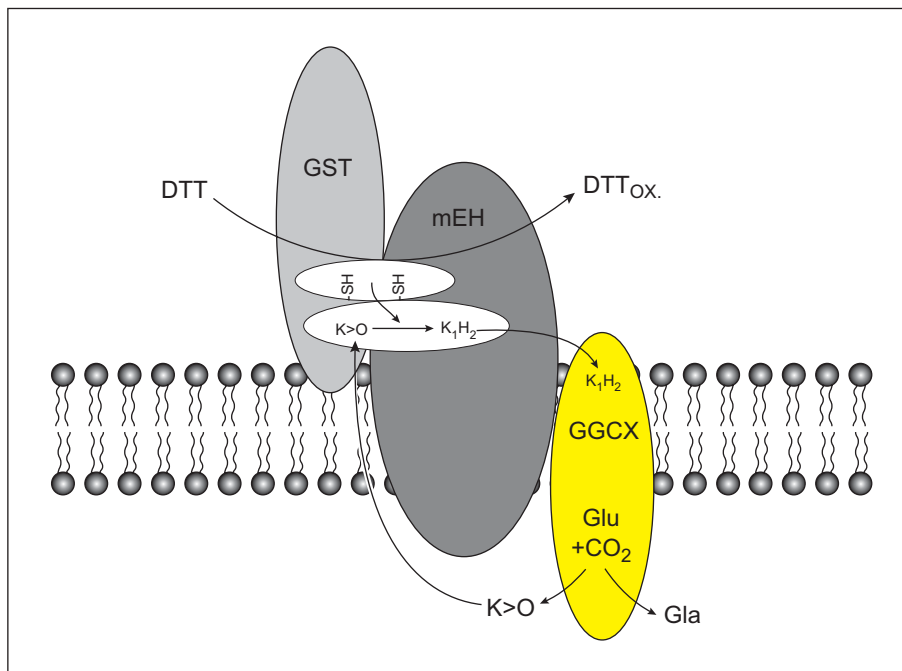


Abb. 9: Hypothetisches Modell des γ -Carboxylierungssystems (nach Cain et al., 1997). DTT = Dithiothreitol, Gla = γ -Carboxyglutamat, Glu = Glutamat, GST = Glutathion-S-Transferase, K_1H_2 = Vitamin K1-Hydrochinon, $K>O$ = Vitamin K-Epoxid, mEH = mikrosomale Epoxidhydrolase.

Als Reduktionsmittel für die VKOR wurde bei den bisher veröffentlichten *in vitro*-Enzymstudien DTT (Dithiothreitol) verwendet, *in vivo* kommt hierfür z.B. Lipoamid [Thijssen et al., 1994] oder das Thioredoxin-System in Frage [Soute et al., 1992]. Thioredoxine sind eine Familie von kleinen Redox-Proteinen, die in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die Thioredoxin-Reduktase reduziert werden [Powis & Monfort, 2001]. Auf diese Weise können sie wiederum oxidierte Cysteingruppen in

verschiedenen Proteinen reduzieren und haben somit regulatorischen Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselfvorgänge in verschiedenen Organismen, vom Menschen bis hin zu den Bakterien. Beispielsweise sind sie in allen Organismen an der DNA-Synthese beteiligt, bei Säugetieren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose und der Immunomodulation, in Pflanzen sind sie an der Regulation der Photosynthese-Enzyme beteiligt [Arner & Holmgren, 2000]. Silverman und Nandi konnten bereits 1988 zeigen, dass reduziertes Thioredoxin einen möglichen Cofaktor für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase darstellt [Silverman & Nandi, 1988].

3.1.4 Vitamin K-Antagonisten

Der Einfluss von Vitamin K auf die Blutgerinnung wurde bereits im Jahr 1935 von Dam beschrieben, der Studien an Hühnern durchführte, die mit einer fettfreien Diät gefüttert wurden. Dies sollte eigentlich den Bedarf an Cholesterin demonstrieren und führte „nebenbei“ zur Identifizierung und Charakterisierung von Phyllochinon bzw. zur Entdeckung dieser Substanzklasse als essentielle Vitamine. Hendrik Dam erhielt dafür 1943 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Nur einige Jahre später wurde durch Stahmann et al. (1941) bzw. Link (1959) ein natürlich vorkommender Antagonist von Vitamin K entdeckt. In den 1920er Jahren trat in den USA und Kanada eine hämorrhagische Krankheit bei Rindern auf, die nachweislich verdorbenen Klee gefressen hatten. Diese „sweet clover disease“ wurde durch eine verlängerte Gerinnungszeit aufgrund einer erniedrigten Prothrombinaktivität im Blut verursacht und konnte durch Bluttransfusionen behoben werden. Die Substanz, die für diese Krankheit verantwortlich war, wurde 1941 von der Arbeitsgruppe um Link isoliert und als 3-3'-methyl-bis-4-(hydroxycumarin) bzw. Dicumarol charakterisiert [Stahmann et al., 1941].

Inzwischen gibt es zahlreiche synthetische 4-Hydroxycumarinderivate, wie z.B. Warfarin (Coumadin®), Acenocoumarol (Sintrom®) oder Phenprocoumon (Marcumar®), die als pharmakologisch wirksame Antikoagulantien v.a. zur Therapie oder Prophylaxe von thromboembolischen Ereignissen angewendet werden [Suttie, 1994]. In den USA und Großbritannien wird v.a. Warfarin als therapeutischer Vitamin K-Antagonist eingesetzt. In Deutschland werden jährlich etwa 500.000 Patienten aufgrund verschiedener Erkrankungen, wie z.B. Beinvenenthrombosen, Lungenembolie, Vorhofflimmern oder künstlichem Herzklappenersatz mit Phenprocoumon antikoaguliert. Als unerwünschte Nebenwirkung der Antikoagulations-Therapie treten bei etwa 10-17% der Patienten

spontane Blutungen auf, 2-5% der anticoagulierten Patienten zeigen schwere Blutungen, die in einzelnen Fällen zum Tod führen [Kuijjer et al., 1999].

Grundsätzlich gilt für die Therapie mit allen Cumarinderivaten, dass eine Dosis gewählt werden muss, die einerseits antithrombotisch wirkt und andererseits nicht zu Blutungskomplikationen führt. Die Cumarinderivate müssen individuell dosiert werden, da das interindividuelle Ansprechen sehr stark schwanken kann [Deykins, 1970]. Zur individuellen Einstellung und Überwachung wird die Blutgerinnung der antikoagulierten Patienten anhand der Thromboplastinzeit (auch Prothrombinzeit, PT oder Quick-Wert) bzw. die INR (International Normalized Ratio) bestimmt. Dabei liegt der Normalbereich des Quick-Werts bei 70-120%, was einer INR von 0,9-1,25 entspricht, der therapeutische Bereich bei 20-30% bzw. INR 2-3.

Cumarinderivate inhibieren die Vitamin K-Epoxid-Reduktase, was den Vitamin K-Recycling-Prozess empfindlich stört. Kinetische Studien an aufgereinigten Mikrosomen aus Rattenleber konnten zeigen, dass Warfarin als gemischter nicht-kompetitiver Inhibitor von Vitamin K-Epoxid wirkt [Begent et al., 2001]. Dies bedeutet, dass der Inhibitor und das Substrat nicht an die selbe Stelle am Enzym binden, aber die Anlagerung von Vitamin K-Epoxid an die VKOR durch die Warfarinbindung beeinflusst wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Warfarin ein kompetitiver Inhibitor gegenüber dem Reduktionsmittel DTT ist und somit mit diesem um das Thiol-Disulfid-Redoxzentrum konkurriert [Begent et al., 2001].

Die Hemmung der VKOR durch Warfarin führt zu einer Anreicherung von Vitamin K-Epoxid im Plasma der behandelten Patienten [Shearer et al., 1977], da dieses nicht oder nur teilweise in Vitamin KH_2 umgewandelt werden kann. Der daraus resultierende Mangel an der Bereitstellung des Cofaktors Vitamin KH_2 für die GGCX führt zur Sekretion von unzureichend carboxylierten VKD-Gerinnungsfaktoren, was wiederum eine verstärkte Blutungsneigung bzw. die gewünschte „Verflüssigung“ des Blutes bei Thrombosepatienten nach sich zieht [Suttie, 1987].

Diesen Effekt nutzt man auch zur Bekämpfung von Ratten und Mäusen, die hochdosierte Cumarinderivate oder Derivate von Indan-1,3-dion als Rodentizid verabreicht bekommen (Abb. 10) [Jackson et al., 1988]. Die rodentiziden Antikoagulantien haben gegenüber Akutgiften, wie z.B. Blausäure oder Phosphorwasserstoff, den Vorteil, dass die Wirkung verzögert eintritt, so dass sie von den Tieren nicht mit dem Köder in Zusammenhang gebracht wird. In den 1950er und 60er Jahren wurde neben Warfarin, hauptsächlich

Chlorphacinon, Diphacinon und Coumatetralyl (Antikoagulantien der ersten Generation, Abb. 10) zur Rattenbekämpfung eingesetzt.

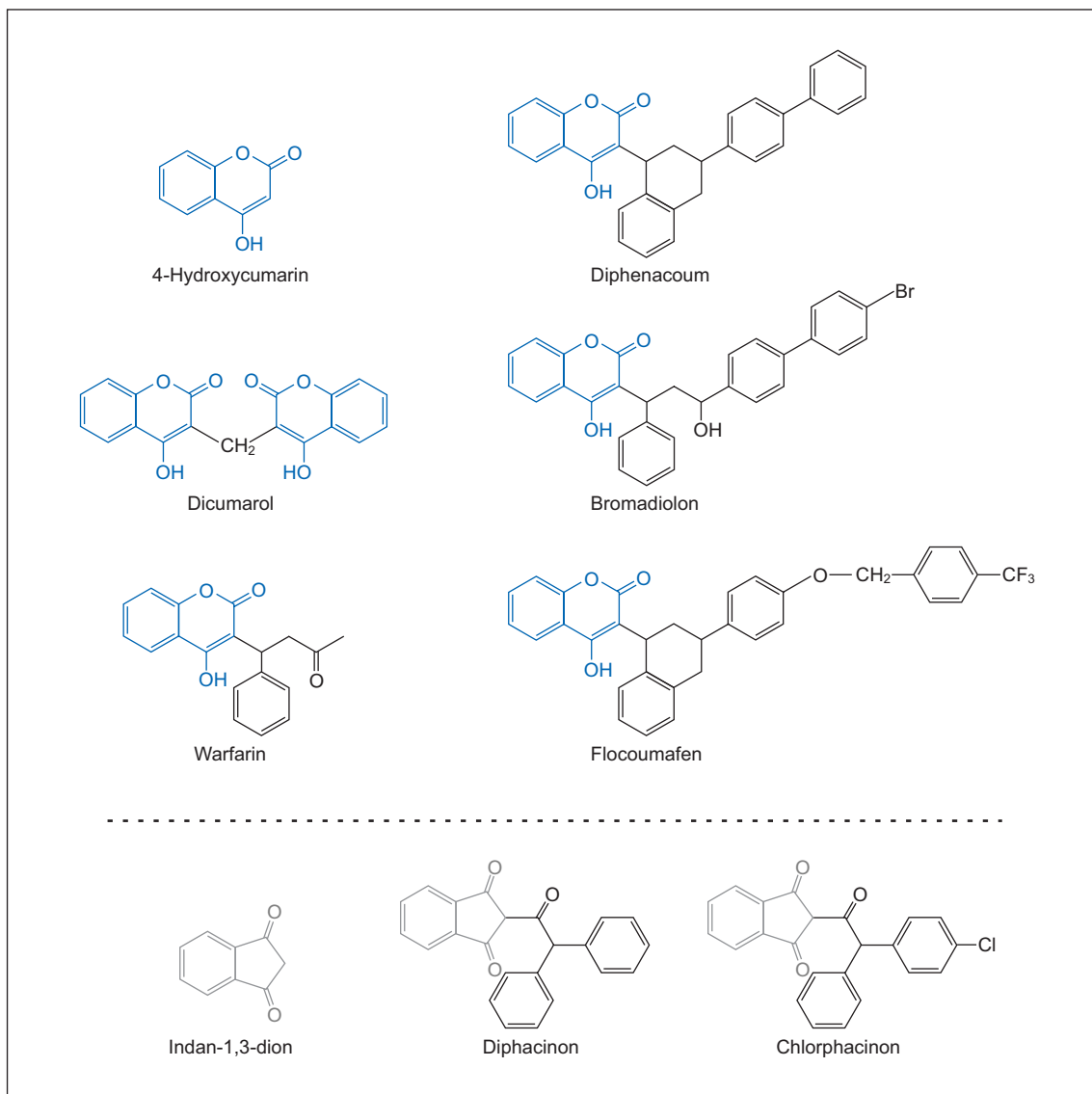


Abb. 10: Derivate von 4-Hydroxycoumarin (oben) und Indan-1,3-dion (unten). Die Vitamin K-Antagonisten werden als Rodentizide zur Bekämpfung von Ratten und Mäusen eingesetzt.

Das Problem der Resistenzbildung gegenüber diesen Antikoagulantien innerhalb zahlreicher Rattenpopulationen machte die Entwicklung von neuen, potenteren Rodentiziden notwendig. Antikoagulantien der zweiten Generation wurden ab Mitte der 1970er Jahre (Bromadiolon und Difenacoum) bzw. ab den 80er Jahren (Brodifacoum, Flocoumafen und Difethialon) als zunächst äußerst wirksame Rodentizide eingesetzt, deren einmalige Dosis in vielen Fällen bereits zum Tod der Nagetiere führte. Die höhere Potenz dieser Wirkstoffe führte aber auch zu einem erhöhten Risiko unbeabsichtigter Vergiftungen von Tieren und Menschen.

3.2 Defekte im Vitamin K-Stoffwechsel

Dam und Mitarbeiter konnten bereits in den 1940er Jahren einen Zusammenhang zwischen einer hämorrhagischen Krankheit bei Neugeborenen (HDN, haemorrhagic disease of the newborn) und dem Mangel an Vitamin K zeigen [Dam et al., 1952]. Die Plasma- und Leberkonzentrationen an Vitamin K₁ sind bei Neugeborenen signifikant niedriger als bei Erwachsenen [Shearer et al., 1982]. Vitamin K₂, welches bei Erwachsenen den Hauptanteil an Vitamin K in der Leber ausmacht, ist bei Neugeborenen nicht nachweisbar [Shearer, 1990]. Die Übertragung von Vitamin K von der Mutter auf das ungeborene Kind ist durch die plazentale Barriere stark eingeschränkt, aber nicht komplett ausgeschlossen, da eine Vitamin K-Gabe bei der Mutter einen erhöhten Vitamin K-Spiegel im Blut des Neugeborenen bedingt [Shearer et al., 1982] und somit HDN verhindert werden kann. Die Ausprägung von HDN ist u.a. abhängig von der Menge und der Art der Milch, die Säuglinge in den ersten Wochen ihres Lebens erhalten [Motohara et al., 1989]. Muttermilch enthält nur sehr geringe Mengen an Vitamin K und an Vitamin K₂-produzierenden Bakterien, die für den Aufbau der Darmflora des Neugeborenen wichtig sind. Nach dem Zeitpunkt des Auftretens der Erkrankung unterscheidet man drei Formen von HDN [Zipursky, 1999]. Frühe HDN tritt meistens innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Geburt des Kindes auf. Ursache hierfür ist meist eine Behandlung der werdenden Mutter mit krampflösenden Mitteln, wie z.B. Barbituraten, eine Anti-Tuberkulose- oder eine Antikoagulations-Therapie mit Vitamin K-Antagonisten während der Schwangerschaft. Diese Form der HDN kann durch eine hochdosierte pränatale Vitamin K-Aufnahme durch die Mutter verhindert werden. Die klassische HDN, die sich hauptsächlich in den postnatalen Tagen 2-5, aber auch bis zur zweiten Lebenswoche manifestiert, ist mit einer Inzidenz von 0,4-1,7 % sehr häufig und kann mit schweren intracranialen und gastrointestinalen Blutungen einhergehen [McNinch & Tripp, 1991]. Durch intramuskuläre oder orale Vitamin K-Verabreichung direkt nach der Geburt des Kindes kann der klassischen, aber auch der späten HDN vorgebeugt werden. Die späte HDN kann bei Säuglingen in der 2. bis zur 12. Lebenswoche mit einer Inzidenz von 4,4 bis 10,5 auf 100.000 Geburten eintreten [Von Kries & Hanawa, 1993]. Sie wird hauptsächlich bei brustgefütterten Kindern beobachtet, die keine Vitamin K-Prophylaxe nach der Geburt erhalten haben und kann mit einer Lebererkrankung, wie z.B. α 1-Antitrypsin-Mangel assoziiert sein [Loughnan & McDougall, 1993].

Bisher konnten drei erblich bedingte Erkrankungen mit dem Vitamin K-Stoffwechsel assoziiert werden. Zum einen handelt es sich um den hereditären Mangel aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (VKCFD, deficiency of all vitamin K-dependent clotting factors), der bei den Betroffenen, ähnlich wie bei erhöhter Dosierung von Cumarinpräparaten, Blutungsneigungen z.T. sogar in Verbindung mit Skelettanomalien hervorruft. Andererseits konnte man bei Thrombosepatienten beobachten, dass sie auf das verabreichte Antikoagulans nicht oder nur auf erhöhte Dosen ansprachen. Diese Patienten weisen folglich eine komplette oder teilweise Resistenz gegenüber Cumarinderivaten auf, was in der Literatur als Warfarinresistenz (WR) beschrieben wird. Auch bei Ratten und Mäusen tritt seit mehreren Jahren vermehrt eine Warfarinresistenz auf, was zu einem großen Problem bei deren Bekämpfung führt, da häufig sogar hohe Dosen an bestimmten Rodentiziden keine Wirkung mehr zeigen.

Im Gegensatz zur Warfarinresistenz konnte bei einigen Patienten unter Antikoagulationstherapie auch eine erhöhte Warfarinsensitivität nachgewiesen werden, was sich durch das Ansprechen auf sehr geringe Dosen an Cumarinpräparaten bzw. durch Blutungsneigungen während der Therapie bemerkbar macht.

3.2.1 Erblich bedingter Mangel der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Der kombinierte Mangel aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (VKCFD, OMIM #277450 und #607473) ist eine seltene hereditäre Gerinnungsstörung mit bislang 15 veröffentlichten Fällen weltweit [McMillan & Roberts, 1966; Fischer & Zweymuller, 1966; Johnson et al., 1980; Goldsmith et al., 1982; Vicente et al., 1984; Ekelund et al., 1986; Pauli et al., 1987; Leonard, 1988; Brenner et al., 1990; Pechlaner et al., 1992; Boneh & Bar-Ziv, 1996; Spronk et al., 2000; Oldenburg et al., 2000; Orbak et al., 2003].

Klinische Symptome der Erkrankung sind unterschiedlich stark ausgeprägte Blutungsneigungen mit z.T. lebensbedrohlichen intracranialen Blutungsepisoden. In einzelnen Fällen kann es zu Skelettanomalien aufgrund der Beeinträchtigung der für den Knochenstoffwechsel wichtigen Vitamin K-abhängigen (VKD-) Proteine Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein kommen. Häufig können die Auswirkungen dieser Krankheit durch orale Verabreichung von Vitamin K komplett beseitigt werden, bei einigen Patienten dagegen kann selbst eine hochdosierte intravenöse Vitamin K-Gabe die Krankheitssymptome nicht kompensieren. Der Pathomechanismus von VKCFD basiert auf der unzureichenden Carboxylierung der Glutamatreste von VKD-Proteinen. In

Abhängigkeit von der verbleibenden Restaktivität dieser Proteine kann der Phänotyp der Erkrankung sehr stark variieren.

Erworbene Formen der Krankheit können durch eine gestörte intestinale Resorption von Vitamin K bzw. einen defekten Transportmechanismus in die Hepatocyten verursacht werden, wie es z.B. bei Morbus Crohn, einer entzündlichen Darmerkrankung, der Fall ist [Prentice, 1985].

Hereditäre VKCFD kann durch einen Defekt in der γ -Glutamyl-Carboxylase hervorgerufen werden, was zu einer verminderten oder ausbleibenden Aktivität der VKD-Proteine aufgrund ihrer unvollständigen posttranslationalen Modifikation führt. Bisher wurden drei Fälle beschrieben, bei denen Mutationen im GGCX-Gen als Ursache für die als Typ 1 bezeichnete Form der Erkrankung (VKCFD1) nachgewiesen wurden [Brenner et al., 1998; Spronk et al., 2000; Mousallem et al., 2001]. Die rekombinante Expression und anschließende kinetische Studien an der von Brenner et al. identifizierten Leu394Arg-Mutante lassen als primären Defekt eine Veränderung der Glutamat-Bindungsstelle vermuten [Mutucumarana et al., 2000]. Zusätzlich, wenn auch im geringeren Maß, sind die Propeptid- und die Vitamin KH_2 -Bindung bei dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt. Die von Spronk et al. und Moussalem et al. berichtete Mutation im Exon 11 des GGCX-Gens führt bei zwei nichtverwandten Patienten zum Austausch von Tryptophan nach Serin an Position 501. Kinetische Studien an der rekombinant exprimierten W501S-Mutante ergaben eine stark verminderte Affinität der GGCX zum Propeptid ihrer Substrate, was einen Defekt in der Propeptid-Bindungsstelle sehr wahrscheinlich macht [Soute et al., 2004].

Die zweite Form des erblichen Mangels aller VKD-Proteine (VKCFD2) wird durch eine Störung im Vitamin K-Recycling verursacht. Die Regeneration von Vitamin KH_2 aus Vitamin K-Epoxid erfolgt, wie beschrieben, durch die Vitamin K-Epoxid-Reduktase. Eine Mutation im VKOR-Gen führt zur mangelnden Bereitstellung des Cofaktors Vitamin KH_2 für die GGCX, was häufig durch orale Substitution von Vitamin K behoben werden kann. Beide Formen von VKCFD werden autosomal rezessiv vererbt, was anhand der Stammbäume der bisher publizierten betroffenen Familien ersichtlich ist.

3.2.2 Warfarin-Resistenz und -Hypersensitivität beim Menschen

Der erste Fall einer Resistenz gegenüber Cumarinen beim Menschen wurde 1964 von O'Reilly et al. publiziert. Für eine ausreichende Anticoagulationstherapie nach einem

Herzinfarkt benötigte der beschriebene Patient täglich 145 mg Warfarin, was etwa der 20-fachen durchschnittlichen Dosis dieses Anticoagulans entspricht [O'Reilly et al., 1964]. Anhand des Stammbaumes seiner Familie, in der weitere sieben Mitglieder innerhalb von drei Generationen betroffen waren, konnten O'Reilly et al. einen autosomal dominanten Erbgang der Warfarinresistenz postulieren. Weiterhin vermutete die Arbeitsgruppe um O'Reilly, dass die Warfarinresistenz durch ein defektes Enzym oder eine Rezeptorbindungsstelle verursacht wird, welche entweder eine verminderte Affinität für Cumarine oder eine erhöhte Affinität für Vitamin K aufweist. Eine verminderte Absorption und ein gesteigerter Abbau des Medikamentes, sowie eine erhöhte Produktion von Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren und eine ungewöhnlich hohe Vitamin K-Aufnahme konnte bei dem beschriebenen Patienten als Ursache für die Resistenz ausgeschlossen werden. Der Patient reagierte zudem extrem sensitiv auf die Gabe von Vitamin K als Antidot.

Seitdem wurden mehrere Fälle von erblicher Resistenz gegenüber Vitamin K-Antagonisten beim Menschen beschrieben, bei denen das Ausmaß der Resistenz sehr stark variiert [O'Reilly 1970; Danesi, 1980; Holt et al., 1983; Alving et al., 1985; Warrier et al., 1986; Diab et al., 1994; Keréveur et al., 1997]. Bei einer durchschnittlichen Antikoagulationstherapie benötigen die Patienten 5-6 mg Warfarin pro Tag [Keréveur et al., 1997], bei den beschriebenen warfarinresistenten Patienten beträgt die tägliche Dosis zwischen 30 und 150 mg. Danesi berichtete 1980 sogar von einem Fall mit kompletter Resistenz gegen orale Antikoagulantien. Die tägliche Warfarindosis bei nicht-resistenten Patienten unterliegt ebenfalls einer großen Streuung von etwa 2-15 mg [Keréveur et al., 1997], was u.a. durch eine variierende Vitamin K-Aufnahme durch die Nahrung z.B. in Form von Gemüse erklärt werden kann [Shearer, 1992].

Neben der Resistenz gegenüber Cumarinen konnte auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Vitamin K-Antagonisten nachgewiesen werden, welche durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden kann. Ein Defekt im Abbauweg von Warfarin kann z.B. die Sensitivität gegenüber diesem Medikament beeinflussen. Cytochrom P-450 2C9 katalysiert die Umwandlung des pharmakologisch potenteren S-Enantiomers von Warfarin in seinen inaktiven Metaboliten [Taube et al., 2000]. Bisher konnten zwei Varianten von CYP2C9 (2C9*2 und 2C9*3) identifiziert werden, welche die enzymatische Aktivität reduzieren und auf diese Weise mit einer Hypersensitivität gegenüber Warfarin assoziiert sind. Außerdem führen bestimmte Mutationen im Propeptid von Faktor IX (Ala-10Thr, Ala-10Val) zu einer Erniedrigung der Affinität zur GGCX und dadurch bedingt zu erhöhter

Warfarinsensitivität [Chu et al., 1996; Oldenburg et al., 1997]. Die beiden Missense-Mutationen haben unter normalen Bedingungen keinerlei Auswirkung auf die Blutgerinnung. Unter Warfarintherapie kommt es jedoch schon bei sehr geringen Dosen zu einem Abfall des FIX-Spiegels auf unter 1% und somit zu Blutungskomplikationen. Zudem kann die Hypersensitivität gegenüber Warfarin, analog zur Warfarinresistenz, durch eine Mutation im Gen für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase, dem Angriffspunkt der Cumarine, verursacht werden.

3.2.3 Warfarinresistenz bei Ratten und Mäusen

Die Resistenz gegenüber gerinnungshemmenden Rodentiziden der ersten Generation wurde erstmals 1958 bei Wanderratten (*Rattus norvegicus*) in Schottland entdeckt [Boyle, 1960]. Kurz darauf wurde auch von warfarinresistenten Hausmäusen (*Mus musculus domesticus*) in Großbritannien berichtet [Dodsworth, 1961]. Seitdem machte die zunehmende Resistenz in weiten Teilen Europas, sowie in den USA, Canada, Australien und Japan die Bekämpfung der schädlichen Nagetiere problematisch [Lund, 1964; Saunders, 1978; Naganuma et al., 1981; Siddiqi & Blaine, 1982; Jackson & Ashton, 1986; Myllymäki, 1995]. Auch nach der Entwicklung und Einführung der potenteren Antikoagulantien der zweiten Generation in den 1970er und 1980er Jahren traten bei Ratten und Mäusen Resistenzen gegen mehrere dieser Rodentizide auf [Rowe et al., 1981; Greaves et al., 1982; Lund, 1984; Johnson, 1988].

Anhand von Züchtungsexperimenten ging man schon bald davon aus, dass die Warfarinresistenz in Ratten durch einen monogenen, autosomal dominanten Erbgang verbreitet wird [Greaves & Ayres, 1967]. Im Jahr 1969 wurde das Gen für die Warfarinresistenz in der Wanderratte (Rw) auf Chromosom 1 und 1976 das orthologe Gen in der Hausmaus (War) auf Chromosom 7, beide gekoppelt mit Genen für die Fellfarbe, kartiert [Greaves & Ayres, 1969; Wallace & MacSwiney, 1976]. Kohn et al. konnten 2003 demonstrieren, dass der Mikrosatelliten-Marker D1Rat219 mit dem Rw-Locus und sehr wahrscheinlich mit dem Gen für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase gekoppelt ist. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Rw-Locus die Resistenz gegenüber verschiedenen, auch potenteren Antikoagulantien vermittelt, aber dass die Dominanz und die Penetranz bezüglich der Art des verwendeten Rodentizids variiert [Kohn et al., 2003].

Thijssen und Pelz charakterisierten 2001 drei verschiedene warfarinresistente Rattenstämme, die nach ihrer Herkunft als schottischer, walisischer bzw. Hampshire-

Stamm bezeichnet werden, durch einen *in vitro* VKOR-Aktivitätsassay an Lebermikrosomen, bezüglich ihrer Resistenz gegenüber Warfarin, Difenacoum und Brodifacoum. Die VKOR des walisischen Stammes zeigt eine starke Resistenz gegenüber Warfarin, aber nicht gegenüber den anderen getesteten Antikoagulantien. Der schottische Stamm ist nahezu genauso sensitiv gegenüber den drei Vitamin K-Antagonisten wie nicht-resistente Ratten. Aber im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym lässt sich der hemmende Effekt von Warfarin auf die VKOR des schottischen Stammes „auswaschen“, d.h. die Hemmung ist reversibel. Der Hampshire-Stamm weist eine Resistenz gegenüber allen drei Rodentiziden auf, wobei der Effekt für Warfarin am stärksten und für Brodifacoum am schwächsten ist [Thijssen & Pelz, 2001]. Diese Stämme unterscheiden sich auch hinsichtlich ihres Vitamin K-Bedarfs. Die Rattenstämme aus Wales und Hampshire benötigen im Vergleich zu normalen sensitiven Ratten sehr viel größere Mengen an Vitamin K, der schottische Stamm hingegen weist einen moderaten Vitamin K-Bedarf auf.

Aufgrund der unterschiedlich starken Ausprägung der Resistenz gegenüber verschiedenen Cumarin- und Indandiolderivaten können, neben Defekten in der VKOR, vermutlich noch weitere Mechanismen zu diesem Phänotyp führen oder diesen modifizieren. Wallin et al. publizierten 2001 ein neues molekulares Modell für die Warfarinresistenz in der Ratte. Die Arbeitsgruppe konnte eine Überexpression des ER-spezifischen Chaperons Calumenin in der Leber von warfarinresistenten Ratten nachweisen. Nach ihrer Hypothese bindet Calumenin an die VKOR, wodurch die Bindungsstelle für Warfarin nicht mehr zugänglich ist und somit eine Resistenz entstehen kann [Wallin et al., 2001].

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Beteiligung von Vitamin K an zahlreichen Stoffwechselwegen und die Entdeckung der Vitamin K-assoziierten Erkrankungen zeigen die Relevanz der Charakterisierung der Gene bzw. Proteine des Vitamin K-Zyklus. Ziel dieser Doktorarbeit ist die Aufklärung und Beschreibung der Ursachen der beiden hereditären Formen des kombinierten Mangels aller Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren (VKCFD1 und 2), sowie der Warfarinresistenz auf genetischer und proteinchemischer Ebene. Während das Gen für die γ -Carboxylase bereits 1991 kloniert worden ist [Wu et al., 1991], konnte das zentrale Protein der VKOR erst im Laufe dieser Doktorarbeit identifiziert werden.

Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komponente 1 (VKORC1)

Anhand der bereits veröffentlichten Ergebnisse soll der Weg der Entdeckung des VKORC1-Gens detailliert dargelegt werden. Ausgehend von der Beschreibung der VKCFD2-Erkrankung zweier betroffener Familien [Oldenburg et al., 2000], über die Kartierung des korrelierenden Gens [Fregin, Rost et al., 2002] bis zur Entdeckung des VKORC1-Gens [Rost, Fregin et al., 2004a] und die anschließende Charakterisierung des Genproduktes werden die einzelnen Schritte dargestellt. Die Aufklärung von Aminosäureresten, die für die Funktion der VKOR eine entscheidende Rolle spielen, erfolgte einerseits anhand der Sequenzierung des orthologen Gens in warfarinresistenten Ratten und anschließender rekombinanter Expression der identifizierten Mutationen [Pelz, Rost et al., 2005], andererseits durch positionsspezifische Mutagenese von ausgewählten Aminosäureresten des menschlichen VKORC1-Proteins [Rost et al., 2005].

γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX)

Ebenfalls anhand von Veröffentlichungen und noch unveröffentlichten Daten sollen neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich des GGCX-Gens vorgestellt werden.

Wie bereits beschrieben wurden bisher nur zwei verschiedene homozygote Mutationen im GGCX-Gen identifiziert und rekombinant exprimiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte den ersten Fall von VKCFD1 nachweisen, der aufgrund von compound-heterozygoten Mutationen verursacht wird [Rost et al., 2004b)]. Das Auftreten einer der beiden Mutationen in einem weiteren VKCFD1-Patienten führte zur Annahme und Bestätigung eines Founder-Effektes [Rost et al., in Bearbeitung]. Noch unveröffentlichte Ergebnisse zur Durchführung des GGCX-Proteinassays und kinetischen Studien, die zum Nachweis der Funktion von rekombinant exprimierten Mutationen im GGCX-Gen dienen, werden ebenfalls in der vorliegenden Arbeit vorgestellt.

4 ZUSAMMENFASSENDER DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER PUBLIZIERTEN ERGEBNISSE

4.1 Klinische Symptomatik von VKCFD2 in zwei betroffenen Familien

Der VKCFD-Phänotyp variiert, wie beschrieben, sehr stark in Abhängigkeit von der Restaktivität der VKD-Proteine, was hier anhand von zwei Familien mit jeweils mehreren betroffenen Mitgliedern verdeutlicht werden soll. Die detaillierte Beschreibung der beiden Familien wurde im Jahr 2000 von Oldenburg et al. (Anlage 1) veröffentlicht.

Die libanesische Familie A besteht aus den konsanguinen, nichtbetroffenen Eltern und acht Kindern, die zwischen 1981 und 1997 geboren wurden (Abb. 11). Zwei weitere Kinder starben im ersten Lebensjahr an intracerebralen Blutungen. Schwere Blutungsereignisse bei vier der betroffenen Kinder (A5, A6, A8 und A10) machten die Anwendung von Bluttransfusionen bzw. Ventrikeldrainagen erforderlich. Pränatale intracerebrale Blutungen führten bei dem Letztgeborenen (A10) zur Ausbildung eines Hydrozephalus internus, zu schwerer geistiger und körperlicher Retardierung, Epilepsie und Blindheit. Die Probandin A3 zeigte trotz erniedrigter Spiegel an VKD-Gerinnungsproteinen keine klinischen Symptome.

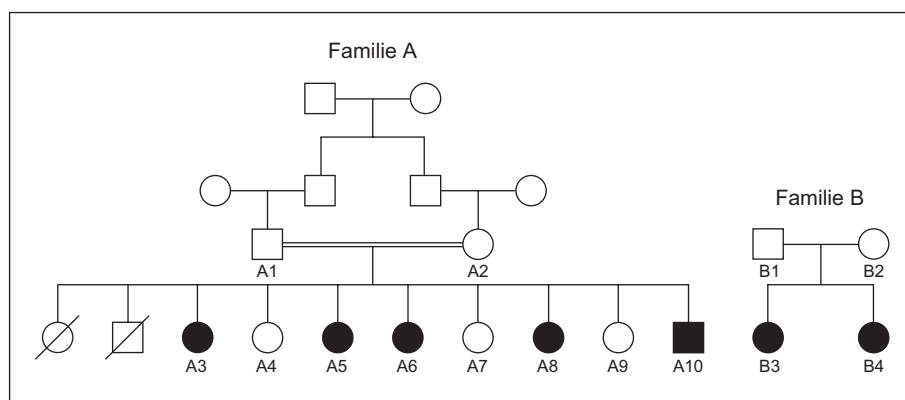


Abb. 11: Stammbäume der Familien A und B. Ausgefüllte Kreise bzw. Quadrate weisen auf den VKCFD2-Phänotyp und folglich auf eine Verminderung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren bei den Betroffenen hin.

Die aus Deutschland stammende Familie B besteht aus zwei betroffenen Mädchen und den Eltern, die nach eigener Aussage nicht blutsverwandt sind (Abb. 11). Da die maternalen und paternalen Großeltern aus benachbarten Ortschaften stammen, kann eine Konsanguinität aber nicht ausgeschlossen werden. Das 1989 geborene Mädchen (B3) wies postnatal ein großes Hämatom im Kopfbereich, eine spastische Lähmung der linken

Körperseite und ebenfalls einen Hydrocephalus internus auf. Während der ersten Lebensjahre litt sie an Epilepsie und zeigt eine persistente mentale und physische Schwäche. Ihre Schwester (B4) hingegen wies trotz verminderter Werte aller Vitamin K-abhängigen koagulatorischen Proteine keine Auffälligkeiten auf.

Die Serumspiegel der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren FII, FVII, FIX und FX, sowie Protein C wurden bei allen Mitgliedern der Familien A und B durch standardisierte Methoden bestimmt. Bei den Betroffenen schwankten die Werte zwischen 20 und 60 % der Norm (Tab. 2A in Oldenburg et al., 2000), was auf eine milde Form der Erkrankung hindeutet. Die Werte der VKD-Proteine konnten bei allen Betroffenen durch orale Vitamin K-Substitution vollständig normalisiert werden (Tab. 2B in Oldenburg et al., 2000). Beide Elternpaare, die unter der Annahme einer autosomal rezessiven Vererbung der Krankheit, heterozygot sein müssen, wiesen keine Verminderung der Serumspiegel für die gemessenen VKD-Proteine auf.

Als Ursache für die Erkrankung wurde in beiden Familien zunächst ein Defekt in der γ -Carboxylase vermutet, was aber aufgrund der Sequenzierung der 15 Exons einschließlich der flankierenden Introns des GGCX-Gens und der Haplotyp-Analyse von vier Polymorphismen im GGCX-Gen (Abb. 1 in Oldenburg et al., 2000) ausgeschlossen werden konnte.

Bei allen Mitgliedern beider Familien wurden die Vitamin K-Hydrochinon- und Vitamin K-Epoxid-Werte im Serum vor und nach oraler Applikation von 10 mg Vitamin K durch HPLC-Analyse bestimmt. Während Vitamin K-Epoxid normalerweise im Serum nicht nachweisbar ist, zeigten die Betroffenen beider Familien stark erhöhte Vitamin K-Epoxid-Spiegel nach Vitamin K-Substitution (Tab. 3 in Oldenburg et al., 2000).

Sowohl dieses Ergebnis, als auch der Ausschluss einer Mutation im GGCX-Gen und die komplette Korrektur der VKD-Protein-Spiegel der Betroffenen durch orale Vitamin K-Gabe, ließen uns vermuten, dass ein Defekt im VKOR-Komplex für den Phänotyp in diesen Familien verantwortlich ist. Da der VKOR-Komplex zu diesem Zeitpunkt weder auf molekulargenetischer noch proteinchemischer Ebene aufgeklärt war, strebte unsere Arbeitsgruppe eine genetische Kartierung des VKCFD2-Locus an.

4.2 Genetische Kartierung des VKCFD2-Locus

Die genetische Kartierung eines Krankheitslocus erfolgt im Allgemeinen durch eine Kopplungsanalyse anhand der Untersuchung von 300 bis 400 polymorphen

Mikrosatellitenmarkern in betroffenen Familien, was auch als genom-weite Multilocus-Analyse bezeichnet wird. Das Ziel ist dabei, das Krankheitsgen innerhalb einer vorgegebenen Markerkarte, in welcher die einzelnen Marker ihrer chromosomalen Position nach angeordnet sind, einem Bereich zwischen zwei Markern zuzuordnen. Je näher zwei Loci auf demselben Chromosom benachbart liegen, desto häufiger werden sie gemeinsam vererbt (genetische Kopplung), je weiter sie voneinander entfernt sind, desto häufiger werden sie durch Rekombination getrennt. Folglich kann die Entfernung zwischen zwei Loci durch ihre Rekombinationshäufigkeit in Centi-Morgan (1 cM = Rekombinationshäufigkeit von 1 %) ausgedrückt werden, deren Höchstwert 0,5 bzw. 50 % beträgt. Zur Berechnung der Kopplungswahrscheinlichkeit verwendet man sog. LOD- (logarithm of the odds-) Scores, welche 1955 von Morton eingeführt wurden. Der LOD-Score Z ist definiert als der Logarithmus des Verhältnisses der Wahrscheinlichkeit für Kopplung zweier Loci zur Wahrscheinlichkeit gegen Kopplung und ist daher eine Funktion der Rekombinationshäufigkeit θ . Ab einem LOD-Score von 3,0 kann von genetischer Kopplung ausgegangen werden, da dann ein Verhältnis von 1000:1 für Kopplung vorliegt. Bei einem Verhältnis von 100:1 gegen Kopplung, erhält man einen LOD-Wert von -2,0, was zu einem signifikanten Kopplungsausschluß führt [Strachan & Read, 1996; Passarge, 1994].

Besitzt eine Person an einem bestimmten Locus zwei identische Allele, so ist sie homozygot für diesen Genort. Sind die beiden Allele aufgrund gemeinsamer Abstammung identisch, spricht man von Autozygotie. Konsanguine Personen, die an einer rezessiven Erbkrankheit leiden, sind für die mit dem krankheitsverursachenden Gen gekoppelten Marker mit großer Wahrscheinlichkeit autozygot. In diesem Fall führt man eine sog. Homozygotie- bzw. Autozygotie-Kartierung zur Identifizierung des Krankheitslocus durch.

Familie A eignete sich aufgrund ihrer Größe und der Anzahl an Betroffenen und Nichtbetroffenen besonders gut für eine genomweite Kopplungsanalyse des VKCFD2-Locus (ursprünglich als FMFD-Locus bezeichnet) [Fregin, Rost et al., 2002, Anlage 2]. Die Multilocus-Kartierung wurde mit insgesamt 374 Mikrosatellitenmarkern, die durchschnittlich 11 cM voneinander entfernt liegen, am Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin in Berlin durchgeführt. Zur Analyse der Kartierungsdaten wurden die Computerprogramme GENESCAN v3.0, GENOTYPER v2.5 (Applied Biosystems) und GENEHUNTER v2.0 [Kruglyak et al., 1996] verwendet. Die Multilocus-Analyse ergab einen Multipoint-LOD-Score von 2,78 bei $\theta = 0$ für den Marker D16S415 und verwies

somit auf die perizentrische Region von Chromosom 16 als sehr wahrscheinliche Position des VKCFD2-Locus. Das Intervall, das vermutlich den gesuchten Krankheitslocus enthielt, erstreckte sich nach der Mikrosatellitenkarte von Généthon [Dib et al., 1996] von D16S3093 bis D16S3039 (Abb. 1 in Fregin, Rost et al., 2002).

Zur Eingrenzung und Bestätigung des durch die Grobkartierung festgelegten Bereichs wurde in den Familien A und B eine Homozygotie-Kartierung mit zusätzlichen Markern von Chromosom 16 vorgenommen [Fregin, Rost et al., 2002]. In beiden Familien zeigten alle Betroffenen einen gemeinsamen homozygoten Bereich über 3 cM in der perizentrischen Region von Chromosom 16, der insgesamt 26 Mikrosatellitenmarker umfasste. Die Haplotyp-Analyse ermöglichte es, durch zwei Rekombinationen in Familie A die Grenzen des vermuteten VKCFD2-Intervalls zu definieren (Abb. 2 in Fregin, Rost et al., 2002). Die obere Grenze des Homozygotie-Bereichs wurde in beiden Familien durch den Marker D16S261 bestimmt, die untere Grenze wurde durch ein Rekombinationsereignis zwischen D16S409 und D16S419 bei Patient A II:8 festgelegt. In Familie B traten im untersuchten Intervall keine Rekombinationen auf, aber ein identischer parentaler Haplotyp über diesen großen chromosomalen Bereich führte zur Vermutung, dass ein gemeinsamer Ursprung vorliegen muss (identical by descent, IBD).

Mit Hilfe des Computerprogrammes MLINK aus dem Linkage-Programmpaket 5.20 [Lathrop et al., 1984] wurden für beide Familien kombinierte Zwei-Punkt-LOD-Scores errechnet (Tab. 1 in Fregin, Rost et al., 2002). Für die Marker D16S261 und D16S690 wurde bei $\theta = 0$ ein maximaler LOD-Score von 3,39 erreicht, was auf eine signifikante Kopplung mit dem VKCFD2-Locus schließen läßt (Tab.1 in Fregin, Rost et al., 2002). Das auf diese Weise definierte Kandidatengen-Intervall umfasste die perizentrische Region von Chromosom 16 mit den Bereichen 16p11-p12 auf dem kurzen Arm und 16q11-q21 auf dem langen Arm.

Wie in der Einleitung dargestellt, ist die VKOR sowohl der entscheidende Stoffwechselschritt für die VKCFD2-Erkrankung als auch der Angriffspunkt für die Antikoagulantien vom Cumarin-Typ. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Warfarinresistenz bei Mensch und Nagetieren durch Mutationen im VKOR-Komplex verursacht wird. Obwohl die bisherigen Modelle davon ausgehen, dass die VKOR-Reaktion von einem Multienzymkomplex ausgeführt wird (vgl. Abb. 9), besteht theoretisch die Möglichkeit, dass beide Phänotypen sich von ein und demselben Protein herleiten. Wie bereits beschrieben, wurde das Gen für die Warfarinresistenz bei der Ratte auf Chromosom 1 und bei der Maus auf Chromosom 7 kartiert. Zahlreiche Gene, die den

WR-Locus in der Ratte und der Maus flankieren, wie z.B. das Interleukin 4-Rezeptor alpha-Gen (IL4R) oder das Sialophorin-Gen (SPN) befinden sich in der gleichen Reihenfolge auf dem kurzen Arm des humanen Chromosom 16 (Abb. 12). Diese syntänen Regionen in den drei Species führten uns zu der Hypothese, dass der VKCFD2-Locus mit dem WR-Locus identisch sein könne und in der Region 16p11-p12 auf dem menschlichen Chromosom 16 zu lokalisieren sei. Wenn diese Annahme zuträfe, könnte das Kandidatengen-Intervall auf den kurzen Arm von Chromosom 16 eingegrenzt werden.

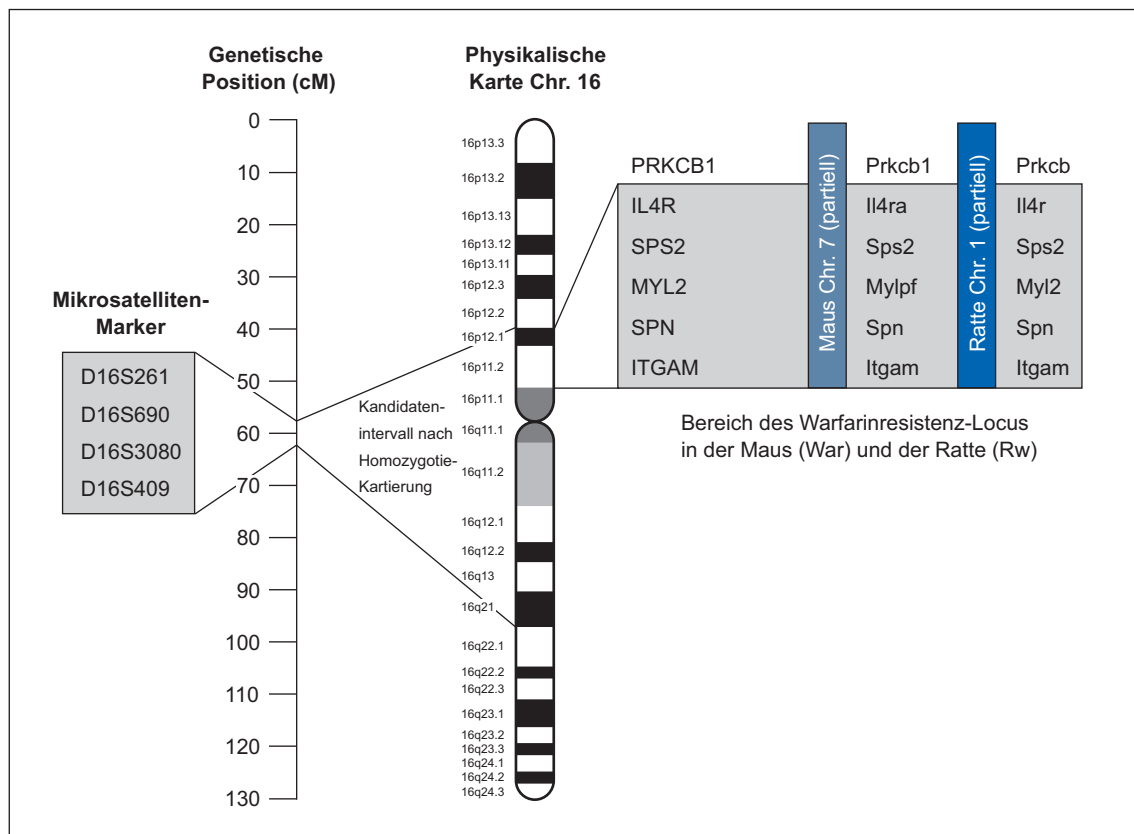


Abb. 12: Vergleich der Genreihenfolge der orthologen Chromosomen 16 (Mensch), 7 (Maus) und 1 (Ratte). Hieraus ergibt sich die Kandidatenregion für den Warfarinresistenz-Locus und somit für den VKCFD2-Locus auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosom 16.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung des VKORC1-Gens

Auf der Basis der oben formulierten Arbeitshypothese haben wir unsere Suche nach dem VKCFD2-Gen auf die Region 16p11-12 konzentriert. Ausgangspunkt für die systematische Mutationssuche durch Direktsequenzierung von Kandidatengenen in beiden VKCFD2-Familien und vier warfarinresistenten Patienten war die 4 Mb umfassende Kandidatenregion auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 mit insgesamt 129 Genen (Ensembl-Datenbank, Stand: April 2003) [Rost, Fregin et al., 2004, Anlage 3]. Die

Kandidatengene wurden zunächst nach Größe und Funktion in Gruppen mit unterschiedlich hohen Präferenzen eingeteilt. Nachdem die wenigen Gene mit vermuteter Assoziation zum Vitamin K-Stoffwechsel keine Mutationen aufwiesen, wurden die hypothetischen Gene mit unbekannter Funktion, die aufgrund ihrer Exon-Intron-Struktur als Gene vorhergesagt wurden, bevorzugt sequenziert. Im Kandidatengen mit der Accession-Nummer NM_024006 wurde bei allen Patienten der beiden VKCFD2-Familien eine homozygote und bei den Eltern eine heterozygote Missense-Mutation im Exon 3 entdeckt, die zur Substitution Arg98Trp führte. Alle vier untersuchten warfarinresistenten Patienten wiesen, in Übereinstimmung mit dem postulierten autosomal dominanten Erbgang der WR, unterschiedliche heterozygote Mutationen im gleichen Gen auf (Tab. 1). In 192 gesunden Kontrollen konnte keine der beobachteten Mutationen nachgewiesen werden. Das orthologe Gen wurde ebenfalls in warfarinresistenten und sensitiven Ratten des Stammes, der zur Kartierung der Warfarinresistenz auf Chromosom 1 verwendet wurde, und in Wildfängen aus dem Münsterland sequenziert. Bis auf eine Ausnahme waren alle warfarinsensitiven Ratten homozygot für die Wildtyp-Sequenz und alle warfarinresistenten Ratten hetero- oder homozygot für den Austausch Tyr139Cys. Die Identifizierung von sieben unabhängigen Mutationen bei zwei unterschiedlichen Phänotypen in zwei verschiedenen Species deutete sehr stark darauf hin, dass es sich bei dem Genprodukt um die gesuchte Komponente der Vitamin K-Epoxid-Reduktase handelt, weshalb wir es als VKORC1 (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1) bezeichneten.

Probanden	Phänotyp	Warfarin-Dosis	Mutation	homo- oder heterozygot
Patienten, Familie A + B	VKCFD2	-	Arg98Trp	homozygot
Eltern, Familie A + B	normal	-	Arg98Trp	heterozygot
Patient C	WR	100 mg pro Woche	Val29Leu	heterozygot
Patient D	WR	komplett resistent	Val45Ala	heterozygot
Patient E	WR	220-250 mg pro Woche	Arg58Gly	heterozygot
Patient F	WR	komplett resistent	Leu128Arg	heterozygot
Zucht-Ratten (10)	Rw		Tyr139Cys	heterozygot
Wildfänge (16)	Rw		Tyr139Cys	12 homozygot 4 heterozygot

Tab. 1: Übersicht über die im VKORC1-Gen nachgewiesenen Mutationen.

Die Topologie-Vorhersage für das VKORC1-Protein mittels Hydropathieplots ergab drei hydrophobe Regionen, die vermutlich als Transmembrandomänen fungieren. Orthologe VKORC1-Proteine konnten durch elektronische Datenbanksuche außer in der Ratte auch in der Maus, in *Fugu rubripes*, *Xenopus laevis* und *Anopheles gambiae* identifiziert werden. Auf die gleiche Weise konnten in der Maus, der Ratte, *Fugu rubripes* und beim Menschen paraloge Proteine mit etwa 50 % Homologie nachgewiesen werden, die als VKORC1-like 1 bzw. VKORC1L1 bezeichnet wurden (Abb. 2 in Rost, Fregin et al., 2004). Die englische Arbeitsgruppe um Goodstadt und Ponting konnte anhand von umfassenden Analysen der publizierten Sequenzen nachweisen, dass homologe VKORC1-Proteine nicht nur in Vertebraten und Arthropoden sondern auch in Pflanzen, Bakterien und sogar *Archaea* vorhanden sind. Ein Sequenzvergleich der orthologen Proteine von ausgewählten Eukaryoten und zahlreichen Prokaryoten zeigte, dass vier Cysteine (Cys43, Cys51, Cys132 und Cys135) und ein Serin bzw. Threonin (Ser/Thr57) in allen Species vollständig konserviert sind [Goodstadt & Ponting, 2004]. Die Autoren vermuteten, dass die beiden Cysteinreste an Position 132 und 135 ein Thioredoxin-Motiv CXXC bilden und somit gemeinsam mit den anderen drei konservierten AS-Resten das aktive Zentrum der Reduktase darstellen.

Zur weiteren Charakterisierung von VKORC1 führte unsere Arbeitsgruppe einen Northern-Blot, eine subzelluläre Lokalisation und einen VKOR-Aktivitätstest durch [Rost, Fregin et al., 2004]. Der Northern-Blot ergab, wie aufgrund der zahlreichen vorhandenen ESTs (expressed sequence tags) vermutet, eine breite Gewebeverteilung beim Menschen (Abb. 13). Die stärkste Expression zeigte sich dabei in der adulten und fetalen Leber, die auch den Hauptsyntheseort der γ -Carboxylase darstellt.

Die γ -Carboxylase (GGCX) ist ein integrales Protein der ER-Membran [Carlisle & Suttie, 1980; Bristol et al., 1996; Presnell & Stafford, 2002]. Um zu überprüfen, ob VKORC1 analog zur GGCX in die Membran des ER integriert ist, führten wir eine subzelluläre Lokalisation des humanen, rekombinant exprimierten VKORC1 in COS7-Zellen durch. Die grüne Immuno-Fluoreszenz-Färbung von GFP- (green fluorescent protein) bzw. Myc-fusioniertem VKORC1 ergab eine für das ER typische, netzartige Struktur, die sich komplett mit der roten Färbung des ER-spezifischen Calnexin als Kontrolle zur Deckung bringen ließ (Abb. 3 in Rost, Fregin et al., 2004).

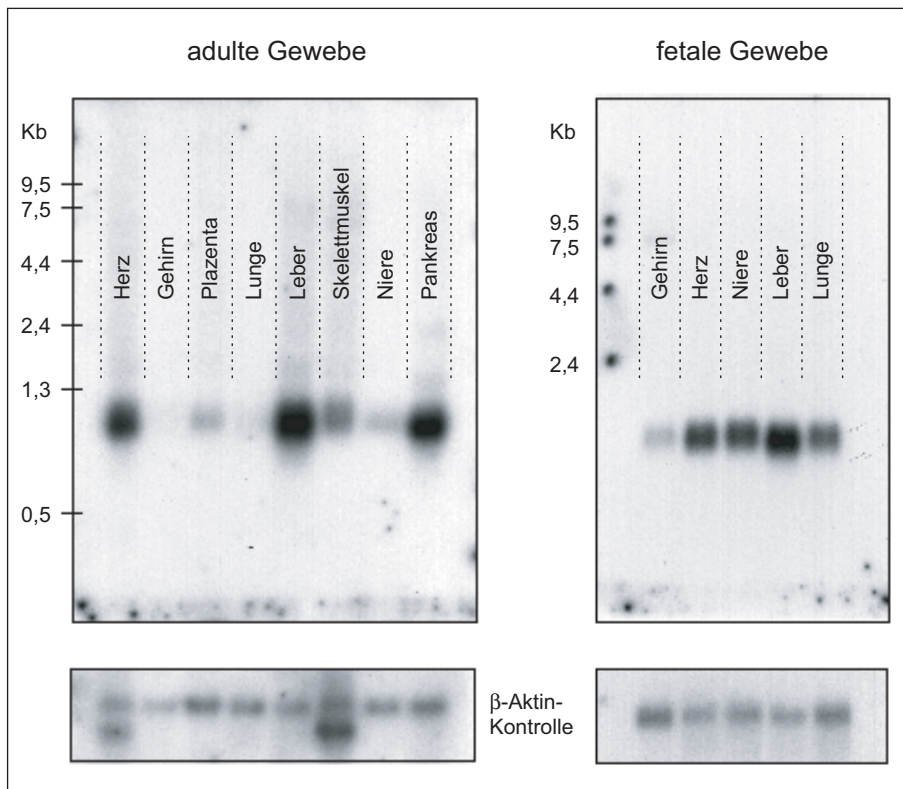


Abb. 13: Northern-Blots mit verschiedenen adulten (human 8-lane, BD Biosciences Clontech) und fetalen (fetal blot 1, Stratagene) Geweben wurden mit radioaktiv-markierter humaner VKORC1 cDNA hybridisiert. Als Kontrolle wurde eine β -Aktin-Sonde verwendet.

Um zu überprüfen, ob VKORC1 eine Vitamin K-Reduktase-Aktivität besitzt, wurde die cDNA in HEK293- (human embryonic kidney) Zellen rekombinant exprimiert. Die Überexpression von VKORC1-cDNA führte zu einem stark erhöhten Umsatz von Vitamin K-Epoxid zur reduzierten Chinonform. Die Umwandlung des Substrates Vitamin K-Epoxid in das Produkt Vitamin K-Chinon konnte nach Zugabe von DTT als Reduktionsmittel mittels HPLC (high pressure liquid chromatography) gemessen werden. VKORC1 alleine ist also in der Lage, mindestens einen Schritt der VKOR-Reaktion auszuführen. Die weitere Reduktion des Chinons zum biologisch aktiven Hydrochinon ist wegen dessen chemischer Instabilität nicht ohne weiteres nachweisbar. In analogen Experimenten wurden die bei VKCFD2- bzw. WR-Patienten (und Ratten) beobachteten Mutationen rekombinant exprimiert. Bis auf die Val29Leu-Mutante zeigten alle VKORC1-Varianten eine deutliche Reduktion der basalen VKOR-Aktivität gegenüber dem Wildtyp (Tab. 1 in Rost, Fregin et al., 2004; Abb. 14).

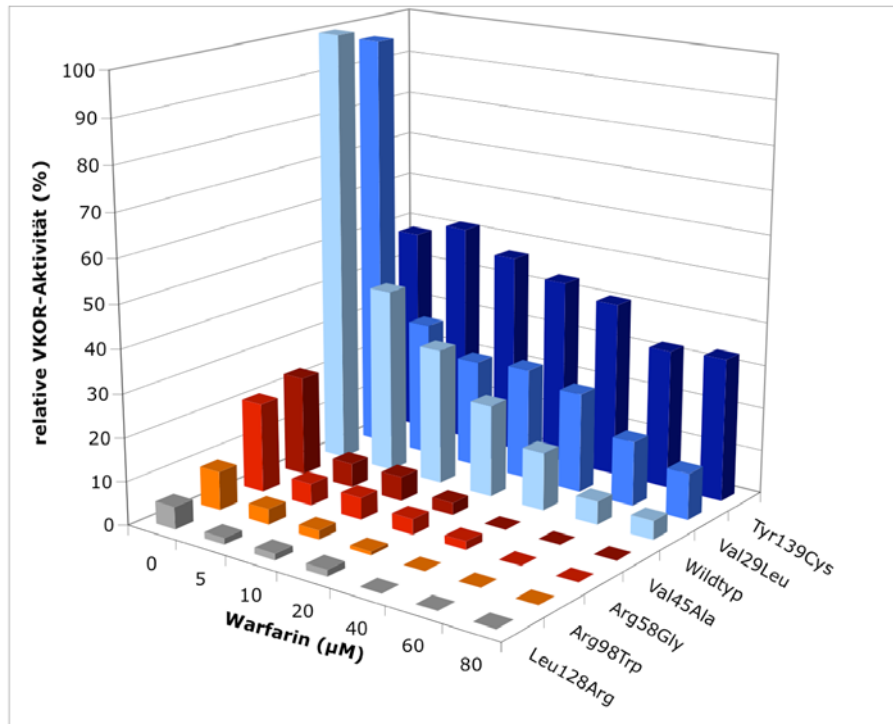


Abb. 14: Relative VKOR-Aktivitäten von VKORC1-Protein-Varianten nach rekombinanter Expression in HEK293-Zellen. Ihre Hemmbarkeit wurde durch Zugabe verschiedener Warfarinkonzentrationen überprüft. Die VKOR-Aktivität des Wildtyps in Abwesenheit von Warfarin wurde auf 100 % gesetzt.

Die Arg98Trp-Variante wies, wie aufgrund des VKCFD2-Phänotyps erwartet, eine sehr geringe VKOR-Aktivität von nur etwa 10 % der Wildtyp-Aktivität auf. Die Hemmbarkeit der VKOR durch Vitamin K-Antagonisten wurde in allen Varianten durch Zugabe von ansteigenden Warfarinkonzentrationen (5-80 µM) überprüft. Eine reduzierte Hemmung und somit eine Resistenz gegenüber dem zugegebenen Warfarin konnte nur bei der Tyr139Cys- und der Val29Ala-Variante festgestellt werden (Tab. 1 in Rost, Fregin et al., 2004; Abb. 14). Eine Erklärung für die nicht-nachweisbare Resistenz der anderen WR-Varianten ist, dass das rekombinante Expressionssystem im Gegensatz zur Situation *in vivo* homozygote Bedingungen darstellt und die Ausgangsaktivitäten dieser WR-Varianten schon so gering sind, dass die Werte bei hohen Warfarin-Konzentrationen nicht mehr detektierbar sind.

Die beschriebenen Experimente auf RNA- bzw. Proteinebene lieferten weitere Beweise dafür, dass es sich bei dem durch Mutationsscreening identifizierten Gen bzw. Protein tatsächlich um die gesuchte Komponente des VKOR-Komplexes bzw. um die Vitamin K-Epoxid-Reduktase selbst handelt. Dies wurde weiterhin durch die parallele Veröffentlichung „Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase“ von Li et al. unterstützt. Die Arbeitsgruppe von Darrel Stafford konnte durch einen komplett

unterschiedlichen Ansatz, nämlich durch die Inhibition der VKOR-Aktivität in einem humanen Karzinom-Zellsystem mittels systematisch ausgewählten siRNAs, das gleiche Gen identifizieren und zeitgleich publizieren [Li et al., 2004].

4.4 Untersuchungen zur Warfarinresistenz bei Ratten und Mäusen

Eine Studie an warfarinresistenten und sensitiven Ratten und Mäusen aus verschiedenen Teilen Europas sollte Aufschluss über die Art und die Verbreitung von Mutationen im VKORC1-Gen der Nagetiere geben [Pelz, Rost et al., 2005, Anlage 4]. Nach Bestimmung des Resistenzstatus der Nagetiere durch den sog. BCR- (blood clotting response) Test [MacNicoll & Gill, 1993] wurden die drei Exons des murinen und des Ratten-VKORC1-Gens von Wildfängen und Labortieren aus Großbritannien, Dänemark, Deutschland, Belgien und Frankreich sequenziert.

Herkunft bzw. Stamm	Mutationen
<i>Rattus norvegicus</i>	
Hampshire, UK (Laborstamm)	Leu120Gln
Berkshire 1, UK (Laborstamm)	Leu120Gln
Berkshire 2, UK (Laborstamm)	Leu120Gln
Schottland, UK (Laborstamm)	Leu128Gln
Wales, UK (Laborstamm)	Tyr139Ser
Yorkshire, UK (Wildfang)	Tyr139Cys, Leu128Gln
Dänemark (Wildfang)	Tyr139Cys
Deutschland (Wildfang)	Tyr139Cys
Deutschland (Wildfang)	Ser56Pro
Belgien (Wildfang)	Tyr139Phe
Frankreich (Wildfang)	Tyr139Phe, Arg35Pro
<i>Mus musculus</i>	
Reading, UK (Laborstamm)	Tyr139Cys
York, UK (Laborstamm)	Leu128Ser
<i>Homo sapiens</i>	
Patient F (siehe Tab. 1)	Leu128Arg

Tab. 2: Übersicht über die im VKORC1-Gen von Ratten und Mäusen identifizierten Mutationen.

Besonders auffällig war dabei das gehäufte Auftreten von Mutationen an den AS-Positionen 128 und 139, die offenbar Mutations-Hotspots darstellen (Tab. 2). Das Codon TAT, welches Tyrosin 139 codiert, wurde in der Maus zu TGT (Cystein) und in der Ratte

zusätzlich zu TCT (Serin) und TTT (Phenylalanin) mutiert. Das Leucin an Position 128 wurde sogar in drei verschiedenen Species (Ratte, Maus und Mensch) durch unterschiedliche Aminosäuren ersetzt.

Die Untersuchung von ca. 400 Ratten aus dem Münsterland bzw. Emsland wurde mittels eines von unserer Arbeitsgruppe entwickelten allelspezifischen ARMS-PCR-Test durchgeführt, der das gezielte Screening der bereits beschriebenen Tyr139Cys-Mutation [Rost, Fregin et al., 2004] ermöglichte. Der Nachweis eines DNA-Fragmentes der Größe 101 bp auf einem Agarosegel wies bei 281 von 286 mittels BCR-Test als resistent eingestuften Ratten auf die Tyr139Cys-Mutation hin (Abb. 15). Bei zwei von fünf dieser diskrepanten Ratten konnte durch Sequenzierung der drei Exons des VKORC1-Gens ein Austausch von Serin nach Prolin an Position 56 nachgewiesen werden. Die restlichen drei Tiere wurden als Falsch-Positive im BCR-Test eingestuft, da dieser komplexe Gerinnungstest eine Fehlerrate von etwa 2-5 % aufweist. Bei 43 als resistent eingestuften Ratten aus Dänemark konnte die Tyr139Cys-Mutation ebenfalls nachgewiesen werden, was aufgrund der räumlichen Nähe für einen gemeinsamen Ursprung der Mutation (Founder-Effekt) spricht. Der ARMS-PCR-Test an 142 BCR-negativen (= sensitiven) Ratten aus dem Münster- bzw. Emsland und 15 sensitiven Ratten aus Dänemark ergab eine Diskrepanz bei insgesamt sechs Tieren, was vermutlich auf falsch-negativen BCR-Test-Ergebnissen beruht.

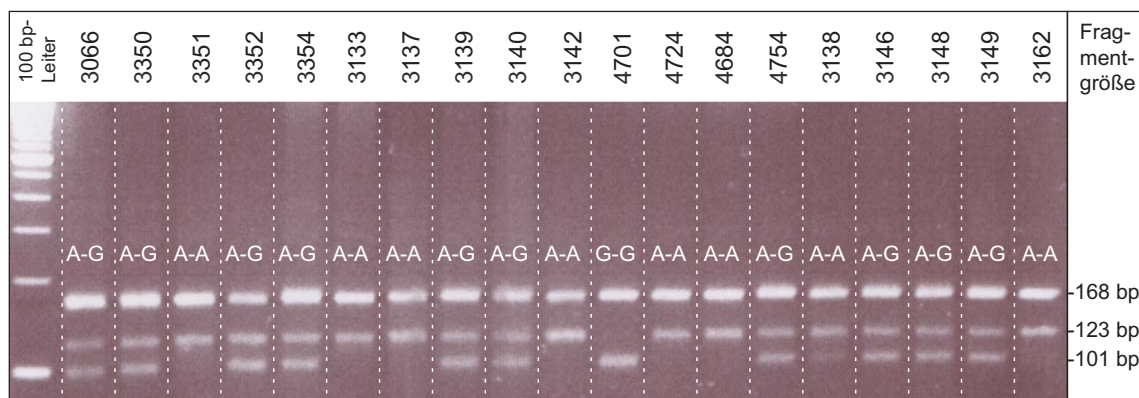


Abb. 15: ARMS-PCR-Test auf Vorhandensein der Tyr139Cys-Mutation bei ausgewählten Ratten aus Deutschland und Dänemark. Die 101 bp-Bande ist nur bei den Tieren zu erkennen, die an AS-Position 139 ein Cystein aufweisen, die 123 bp-Bande hingegen weist auf ein Tyrosin an AS-Position 139 hin. Sind beide Banden vorhanden, handelt es sich um heterozygote Tiere. Die 168 bp-Bande ist bei allen Tieren als PCR-Kontrolle nachweisbar.

Die unterschiedlichen Mutationen und ihr Auftreten in räumlich weit voneinander entfernten Rattenpopulationen legen die Vermutung nahe, dass es sich um unabhängige Mutationsereignisse handelt. Obwohl noch keine größere Anzahl von Warfarin-sensitiven

Wildfängen untersucht worden ist, sprechen die bisherigen Daten nicht dafür, dass die Mutationen ein „stilles Reservoir“ von Sequenzvarianten in der Population darstellen. Vielmehr scheinen Mutationen in VKORC1 sehr seltene Ereignisse zu sein, die aber bei Anwendung von Cumarinen als Rattengifte einen enormen Selektionsvorteil verleihen.

Die verschiedenen Mutationen wurden im HEK293-Zellsystem rekombinant exprimiert und ihre VKOR-Aktivität vor und nach Zugabe verschiedener Warfarin-Konzentrationen gemessen. Die Ausgangsaktivität des Wildtyp-VKORC1 (WT) wurde auf 100% gesetzt und mit den VKOR-Aktivitäten der verschiedenen Varianten ins Verhältnis gesetzt. Die in nur drei Ratten nachgewiesenen Mutationen Arg35Pro bzw. Ser56Pro zeigten nahezu keine messbare VKOR-Aktivität. Die VKORC1-Varianten Leu120Gln und Leu128Ser wiesen anfängliche VKOR-Aktivitäten von etwa 20%, die Leu128Gln-Variante von ca. 50% auf und wurden durch Warfarin stark gehemmt (Abb. 2 in Pelz, Rost et al., 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in diesen Ratten vermutlich ein zusätzlicher Mechanismus zur Warfarinresistenz vorhanden ist bzw. dass durch die stark reduzierte VKORC1-Aktivität ein Warfarin-insensitiver Weg angeschaltet wird, der die Blutgerinnung und somit das Überleben der Ratten ermöglicht. Der unterschiedliche Vitamin K-Bedarf in den untersuchten Laborstämmen unterstützt diese Vermutung. Der Hampshire- und einer der beiden Berkshire-Laborstämme benötigen beispielsweise größere Mengen an Vitamin K als der andere Berkshire-Stamm, obwohl sie alle die gleiche Leu120Gln-Mutation aufweisen.

Eine Resistenz gegenüber Warfarin konnte für alle drei Tyr139-Varianten *in vitro* sehr deutlich gezeigt werden (Abb. 2 in Pelz, Rost et al., 2005). Trotz erniedrigter Ausgangsaktivität wiesen die Tyr139Cys- und Tyr139Ser-Mutante in Gegenwart von Warfarin-Konzentrationen von 10-100 μM eine signifikant höhere VKOR-Aktivität als der Wildtyp auf. Die Tyr139Phe-Mutation führte sogar zu einer gesteigerten VKOR-Aktivität in Abwesenheit von Warfarin im Vergleich zum WT und war selbst durch hohe Inhibitor-Konzentrationen kaum hemmbar.

Das Auftreten und die rasche Verbreitung von resistenten Tieren, die gegen die Cumarine der ersten Generation resistent sind, hat zur Entwicklung von Cumarin-Derivaten mit höherer biologischer Wirksamkeit geführt. Obwohl auch gegen diese Substanzen bereits wieder Resistenz entwickelt worden ist, ist es bisher nicht gelungen, diesen Resistenzfaktor als ein monogenes Merkmal herauszuzüchten. Es stellte sich also die Frage, welche Rolle VKORC1 bei der Resistenz gegenüber Cumarinen der zweiten Generation spielt.

Daher wurden die Antikoagulantien Dicumarol, Difenacoum und Bromadiolon (vgl. Abb. 10) *in vitro* auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht (Abb. 16). Die Mutation Tyr139Phe, die die höchste Resistenz gegenüber Warfarin zeigte (vgl. Abb. 14), ist auch gegenüber den hochpotenten Cumarinen weitgehend unempfindlich. Eine Überprüfung der anderen Tyr139-Varianten auf Resistenz gegenüber Antikoagulantien der zweiten Generation steht noch aus.

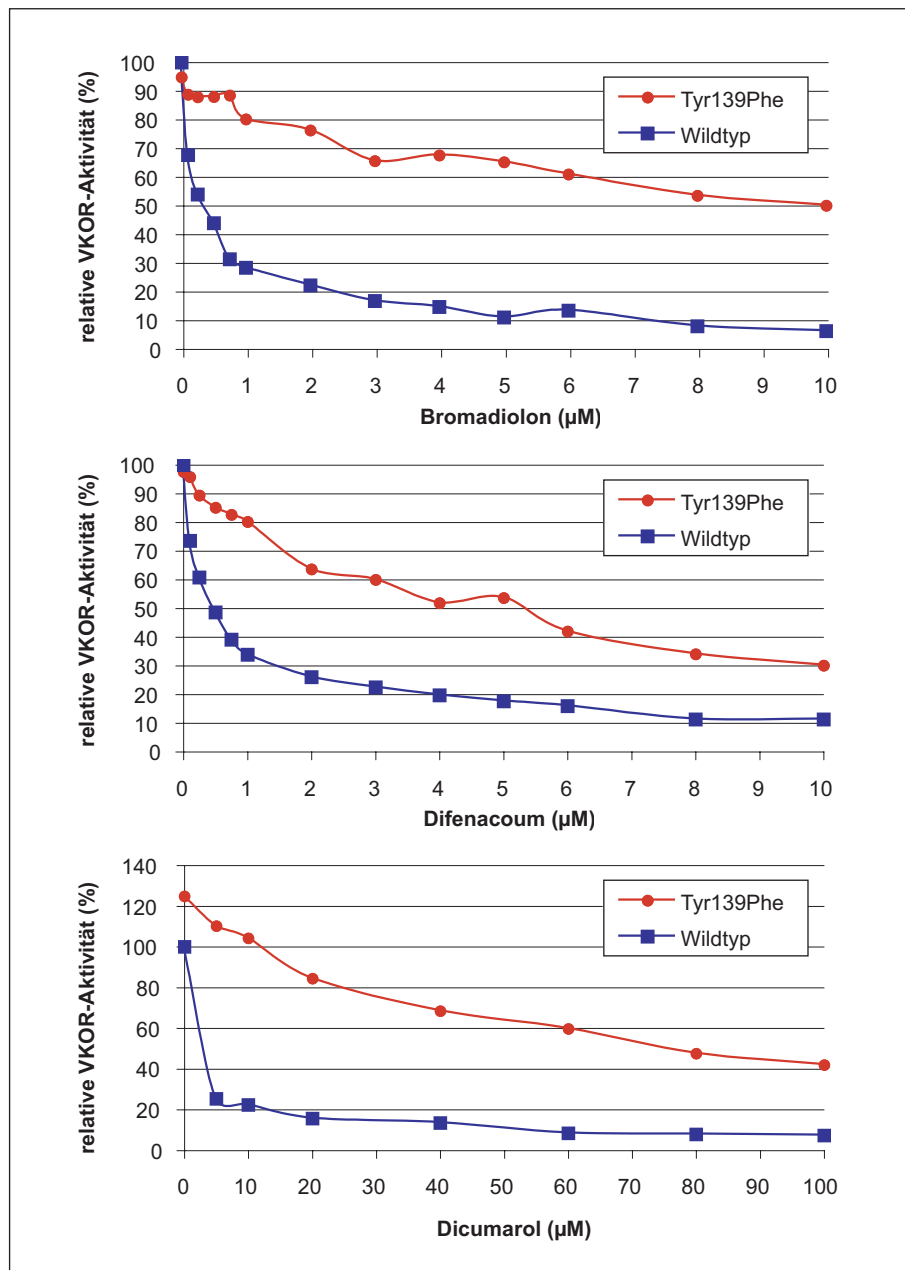


Abb. 16: Relative VKOR-Aktivität der Tyr139Phe-Variante im Vergleich zum Wildtyp nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an Bromadiolon (oben), Difenacoum (Mitte) bzw. Dicumarol (unten). Eine Resistenz dieser Mutante gegenüber allen drei Rodentiziden konnte somit signifikant nachgewiesen werden.

Da eine Resistenz gegenüber Warfarin im *in vitro*-System bis jetzt ausschließlich für die drei Tyr139-Varianten nachgewiesen werden konnte, spielt dieser Tyrosinrest vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Cumarinen. Die Resistenz der Tyr139-Varianten könnte auch die weite Verbreitung dieser Mutationen unter den Ratten- und Mauspopulationen, die einem hohen Selektionsdruck durch die Bekämpfung mittels Vitamin K-Antagonisten ausgesetzt sind, erklären. Die Träger dieser Mutationen, v.a. der Tyr139Phe-Mutation, stellen folglich ein schwerwiegendes Problem in der Bekämpfung von Ratten und Mäusen dar.

4.5 Systematische Mutagenese im humanen VKORC1-Gen

Die Identifizierung der für die Funktion von VKORC1 essentiellen Aminosäurepositionen ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von neuen effektiveren Vitamin K-Antagonisten für die Therapie von Thrombosepatienten und die Bekämpfung von schädlichen Nagetieren. Aminosäuren, die in verschiedenen Spezies unverändert konserviert sind, wie z.B. die bereits erwähnten Cysteinreste (Cys43, Cys51, Cys132 und Cys135) und das Serin an Position 57 des VKORC1, deuten auf eine unverzichtbare strukturelle oder funktionelle Bedeutung für das Protein hin. Cysteinreste sind in Proteinen häufig an der Bildung von stabilisierenden Disulfidbrücken beteiligt oder können durch Oxidation und Reduktion ihrer Thiolgruppen eine essentielle Funktion ausüben. Die Bedeutung der sieben im VKORC1 vorhandenen Cysteine und von Ser57 für die VKOR-Aktivität wurde durch positionsspezifische Mutagenese und anschließende rekombinante Expression im HEK293-Zellsystem überprüft [Rost et al. 2005, Anlage 5]. Zu diesem Zweck wurden die Cysteinreste an den Positionen 16, 43, 51, 85, 96, 132 und 135 nacheinander durch Serin bzw. Alanin ersetzt und Ser57 durch Alanin ausgetauscht (Abb. 17). Die Cys51Ser-, Cys132Ser-, Cys135Ser- und Ser57Ala-Varianten wiesen nach Durchführung des VKOR-Assays und anschließender HPLC-Analyse kaum messbare VKOR-Aktivitäten auf (Abb. 2 in Rost et al., 2005). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der starken evolutionären Konservierung dieser vier Aminosäurereste, die sogar in zahlreichen Bakterien nachgewiesen werden konnten. Die Cysteine an Position 132 und 135 wurden bereits als ein mögliches Redox-Zentrum vermutet [Goodstadt & Ponting, 2004], welches die Reduktion von Vitamin K-Epoxid in seine Chinon-Form katalysiert. Der Austausch der Sulfhydrylgruppe durch eine Hydroxylgruppe in einem der beiden Cysteinreste führt zu einer starken Verminderung der Reduktase-Aktivität und stützt diese

Hypothese (Abb. 2 in Rost et al., 2005). Eine elektronische Protein-Motivsuche ergab, dass das CIVC-Motiv, welches im VKORC1 durch Cys132, Ile133, Val134 und Cys135 gebildet wird, ebenfalls in der hochkonservierten bakteriellen Proteinfamilie der C-Untereinheiten von Na⁺-transportierenden NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Komplexen (NqrC) vorhanden ist. Dort erfüllt es die Aufgabe eines katalytisch-aktiven Redox-Zentrums, welches innerhalb einer α -Helix in die Phospholipidmembran eingebettet ist. Die Homologie des CIVC-Motivs und seine vorhergesagte Lokalisation in einer α -Helix des VKORC1 (Abb. 17) deuten stark darauf hin, dass dieses Proteinmotiv im VKORC1 eine ähnliche Funktion wie im NqrC ausübt.

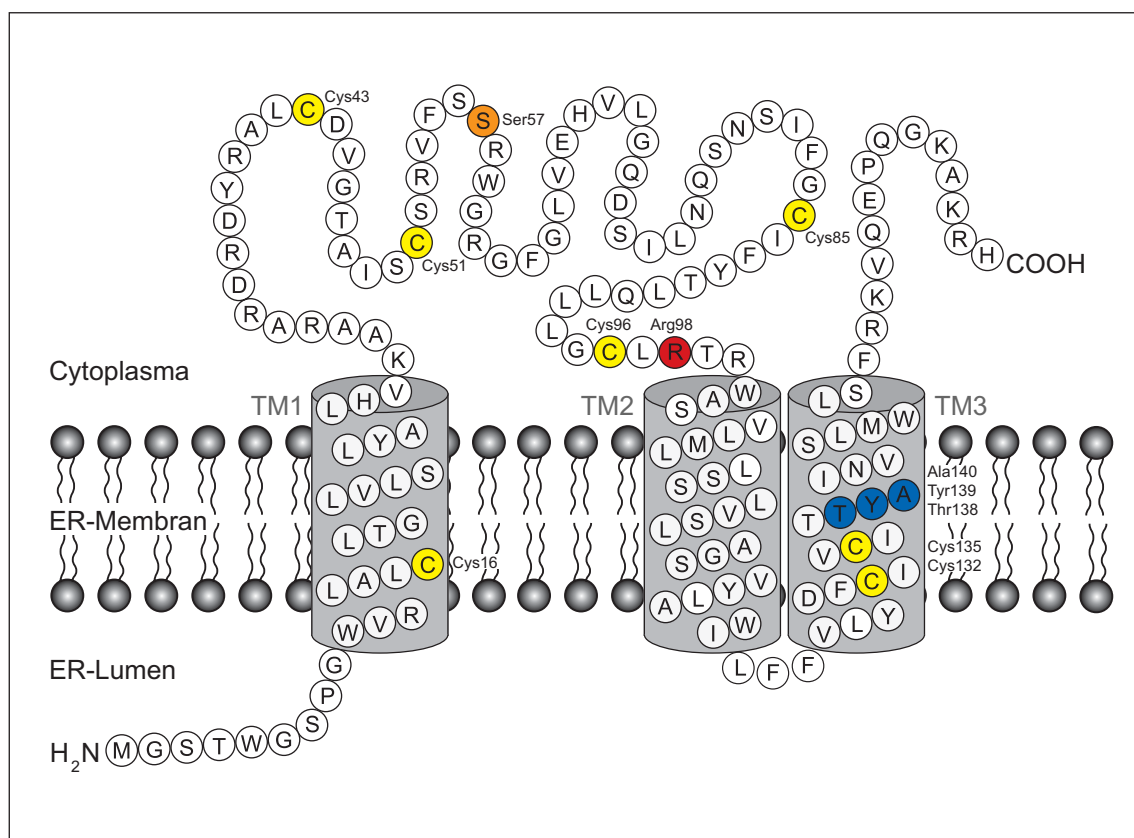


Abb. 17: Modell des VKORC1-Proteins mit drei Transmembrandomänen (nach Stafford, 2005). Aminosäuren sind in der Ein-Buchstaben-Abkürzung aufgeführt. Die durch positionsspezifische Mutagenese ausgetauschten Aminosäuren sind farbig dargestellt.

Goodstadt und Ponting spekulierten, dass das hochkonservierte Ser57, dessen Austausch ebenfalls zu einer stark verminderten VKOR-Aktivität führte, ein Bestandteil des aktiven Zentrums von VKORC1 darstellt. Serine sind häufig an der Substrat-Bindung von Reduktasen beteiligt, was z.B. anhand der Ferredoxin-NADP-Reduktase und Cytochrom P450C24 gezeigt werden konnte (Thomsen-Zieger et al., 2004; Omdahl et al., 2004). Eine Veränderung von Ser57 im VKORC1 sollte somit die Vitamin K-Bindung stark

beeinflussen, was sich in der gemessenen reduzierten VKOR-Aktivität widerspiegeln könnte.

Der Austausch des konservierten Cys43 und der weniger konservierten Cysteinreste an den Positionen 16, 85 und 96 nach Serin oder Alanin resultierte in verminderten, aber deutlich messbaren VKOR-Aktivitäten von 16-30%, im Fall von Cys85Ala sogar 74% der Wildtyp-Aktivität (Abb. 2 in Rost et al., 2005). Eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Reduktase-Aktivität ist daher eher unwahrscheinlich.

In der gleichen Veröffentlichung [Rost et al. 2005, Anlage 5] haben wir auch das Arginin an Position 98 (Abb. 17), welches in den Patienten der beiden VKCFD2-Familien homozygot gegen ein Tryptophan ausgetauscht ist [Rost, Fregin et al., 2004], untersucht. Im VKOR-Assay zeigte die Arg98Trp-Variante eine kaum messbare VKOR-Aktivität. Tryptophan ist eine stark hydrophobe AS mit aromatischer Ringstruktur und unterscheidet sich daher deutlich vom basischen, langkettigen Arginin. Um zu überprüfen, welche Seitenketten an Position 98 einen Einfluss auf die VKOR-Aktivität ausüben, wurde das Arginin durch strukturell ähnlichere Aminosäuren ausgetauscht. Die Substitution von Arg98 durch das ebenfalls langkettige, hydrophile Lysin und anschließende rekombinante Expression führte zu einer gesteigerten VKOR-Aktivität von ca. 110 % (Abb. 5, in Rost et al. 2005). Glutamin und Asparagin sind die ungeladenen Derivate von Glutamat und Aspartat und durch ihre Amidgruppe strukturell ähnlicher zum Lysin als die beiden sauren Aminosäuren. Dementsprechend zeigten die beiden Varianten Arg98Gln und Arg98Asn eine höhere VKOR-Aktivität als die Arg98Glu- und Arg98Asp-Varianten. Die VKOR-Aktivität war bei allen vier Varianten jedoch gegenüber der Wildtyp-Aktivität auf ca. 50 % bzw. 20 % reduziert (Abb. 5, in Rost et al. 2005). Die lange, positiv geladene Seitenkette von Arginin an Position 98 scheint für die Tertiärstruktur von VKORC1 eine entscheidende Rolle zu spielen, was auch durch den Vergleich von Hydropathieplots der untersuchten Arg98-Varianten verdeutlicht wird (Abb. 6, in Rost et al. 2005). Die Topologie-Vorhersage für die Arg98Trp-Variante wich am stärksten von der des VKORC1-Wildtyps ab. Der Austausch des Arginins an Position 98, welches sich im Wildtyp-Protein an der Grenze zwischen der cytoplasmatischen Schleife und der zweiten Transmembrandomäne (TM) befindet (Abb. 17), durch Tryptophan bewirkt eine Verschiebung der zweiten TM um ca. 20 AS in Richtung N-Terminus und somit eine komplette strukturelle Veränderung des VKORC1-Proteins.

Durch positionsspezifische Mutagenese wurde auch eine weitere Variante des Tyr139, welches in warfarinresistenten Ratten und Mäusen durch drei verschiedene AS (Cystein,

Serin, Phenylalanin) substituiert ist, untersucht. Die Tyr139Gly-Variante, die bis jetzt noch nicht in Ratten- oder Mauspopulationen nachgewiesen werden konnte, wies analog zu den anderen Varianten eine verminderte Hemmung durch Warfarin auf (Abb. 4, in Rost et al. 2005). Am deutlichsten war jedoch die Resistenz gegenüber Warfarin in der Tyr139Phe-Variante zu erkennen. Obwohl sich Tyrosin und Phenylalanin nur durch eine Hydroxylgruppe unterscheiden, führte die Substitution zu einer nahezu kompletten Warfarinresistenz. Dies lässt vermuten, dass die reaktive Hydroxylgruppe im Tyr139 eine essentielle Rolle in der Bindung von Warfarin an die VKORC1 spielt. Tyr139 wird flankiert von den AS Threonin und Alanin (Abb. 17), die gemeinsam eine hydrophobe Sequenz bilden. Dasselbe TYA-Motiv konnte in einer anderen Warfarin-sensitiven Chinon-Oxidoreduktase, NQOR, als Dicumarol-Bindungstasche identifiziert werden [Ma et al., 1992]. Die Homologie des TYA-Motivs und die Auswirkung der Mutationen von Tyr139 in VKORC1 legen es nahe, dass diese Aminosäure an der Bindung von Warfarin direkt und essentiell beteiligt ist. Noch unveröffentlichte Daten konnten zeigen, dass ein Austausch von Thr138 und/oder Ala140 im *in vitro*-System keine nachweisbare Resistenz gegenüber Warfarin zur Folge hatte (Abb. 18). Diese Ergebnisse unterstützen die entscheidende Rolle des zentralen Tyrosins im Thr-Tyr-Ala-Motiv für die Bindung von Vitamin K-Antagonisten.

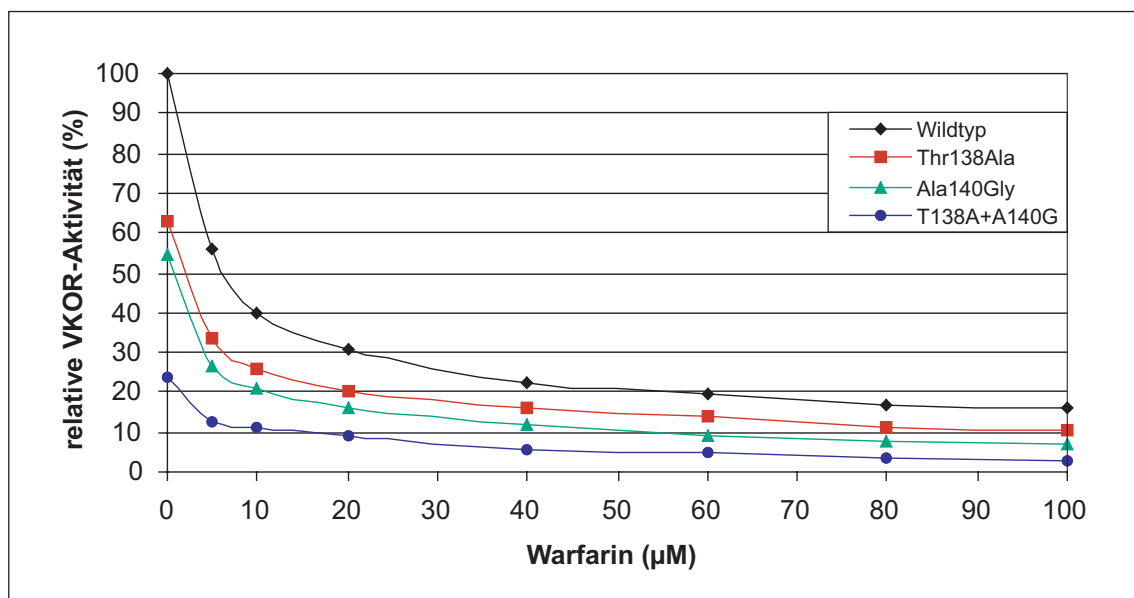


Abb. 18: Relative VKOR-Aktivität der Thr138Ala-, Ala140Gly- und der Doppel-Variante. Alle drei Mutanten weisen eine reduzierte basale VKOR-Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf, zeigen aber keine Resistenz gegenüber Warfarin.

4.6 Nachweis und Charakterisierung neuer Mutationen im GGCX-Gen

Wie bereits beschrieben, wurden in der codierenden Sequenz des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens erst zwei verschiedene Mutationen identifiziert und durch Expressionsstudien als ursächlich für die VKCFD1-Erkrankung nachgewiesen [Brenner et al., 1998; Spronk et al., 2000; Mutucumarana et al., 2000; Soute et al., 2004]. Die Mutationen Leu394Arg und Trp501Ser traten bei den untersuchten Patienten homozygot auf, was mit dem autosomal rezessiven Erbgang der Erkrankung in Einklang steht. Unsere Arbeitsgruppe konnte bei zwei nicht-verwandten VKCFD1-Patienten je zwei heterozygote Mutationen im GGCX-Gen nachweisen, was als compound-Heterozygotie bezeichnet wird [Rost et al., 2004b), Anlage 6; Rost et al., in Bearbeitung]. Beide Patienten stammen aus Deutschland und wiesen reduzierte Plasmaspiegel der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren von 20-40% der Norm auf (Tab. 3). Bei beiden Patienten konnte der Mangel an VKD-Proteinen nur teilweise durch orale Vitamin K-Gabe korrigiert werden.

	Normwerte	Patient A		Patientin B	
		vor Vit. K-Gabe	nach Vit. K-Gabe	vor Vit. K-Gabe	nach Vit. K-Gabe
APTT (Sek.)	30-45			38	28
Quick (%)	70-100	18 - 25	53	28	56
Fibrinogen (g/L)	2.0-4.5			2,8	
Faktor II (%)	75-110	21	40	35	71
Faktor V (%)	70-140			118	
Faktor VII (%)	65-130	47	62	37	69
Faktor VIII (%)	70-170			126	
Faktor IX (%)	70-120			54	90
Faktor X (%)	75-115	36	65	13	28
Antithrombin (%)	80-120			118	
Protein C (%)	70-120			56	63
Protein S (%)	60-140			37	48

Tab. 3: Plasmaspiegel der Vitamin K-abhängigen Proteine und zusätzlicher Gerinnungsfaktoren bei zwei nicht-verwandten Patienten A und B vor und nach oraler Vitamin K-Substitution. Es konnte keine komplette Wiederherstellung der Normwerte für die VKD-Proteine durch Vitamin K-Gabe erreicht werden.

Die Sequenzierung der 15 Exons und flankierenden intronischen Bereiche des GGCX-Gens ergab zwei compound-heterozygote Mutationen in beiden Patienten. Patient A wies eine heterozygote Transversion von G nach T an der 3'-Spleißstelle von Intron 2 auf

(Abb. 1 in Rost et al., 2004b). Die dadurch bewirkte veränderte Prozessierung der GGCX-mRNA hat sehr wahrscheinlich ein verkürztes Protein mit einem teilweisen oder kompletten Funktionsverlust zur Folge. Weiterhin konnte bei diesem Patienten eine heterozygote Punktmutation im Exon 11 des GGCX-Gens nachgewiesen werden, die zu einer Substitution von Arginin durch Prolin an AS-Position 485 führte. Die Arg485Pro-Mutation konnte ebenfalls bei Patientin B identifiziert werden, die zusätzlich eine heterozygote Missense-Mutation im Exon 9 des GGCX-Gens aufwies, die den Austausch von Histidin durch Prolin an AS-Position 404 verursachte [Rost et al., in Bearbeitung]. Anhand eines Screenings von 100 gesunden Kontrollen mittels DHPLC- (denaturing high-performance liquid chromatography) Analyse konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Arg485Pro-Mutation um einen häufigen Polymorphismus handelt (Abb. 2 in Rost et al., 2004b). Die Lage von Arg485 in einer stark konservierten Region der GGCX zwischen AS 365 und AS 496, die vermutlich die Propeptid-Bindungsstelle beinhaltet [Wu et al., 1997 b)], ist ein starker Hinweis auf die Kausalität der Arg485Pro-Mutation. His404 ist ebenfalls in dieser hochkonservierten Region der GGCX lokalisiert und sogar im *Drosophila*-Gen konserviert. Sowohl His404 als auch Arg485 wurden durch die „Iminosäure“ Prolin substituiert. Der Austausch der hydrophilen Aminosäuren Arginin und Histidin durch das hydrophobe Prolin, das als „Helixbrecher“ bekannt ist, kann eine strukturelle Veränderung der GGCX bewirken. Außerdem befinden sich beide Mutationen in der Nachbarschaft der bereits publizierten Mutationen Leu394Arg und Trp501Ser, die durch rekombinante Expression in Insektenzellen und anschließendem GGCX-Aktivitätsassay als ursächlich für VKCFD1 nachgewiesen werden konnten.

Da es sich bei VKCFD1 um eine sehr seltene Erkrankung handelt, vermuteten wir einen Founder-Effekt in den beiden Patienten, die die Arg485Pro-Mutation gemeinsam aufwiesen. Die Untersuchung von drei Polymorphismen im GGCX-Gen und fünf benachbarten Mikrosatellitenmarkern ergab, mit Ausnahme der beiden distal vom GGCX-Gen gelegenen Mikrosatelliten, einen identischen Haplotyp bei den beiden Patienten und ihren Müttern (Abb. 19) [Rost et al., in Bearbeitung]. Die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Gemeinsamkeit der untersuchten Allele ist so gering, dass man aufgrund der durchgeführten Haplotyp-Analyse von einem gemeinsamen Ursprung der Arg485Pro-Mutation ausgehen kann.

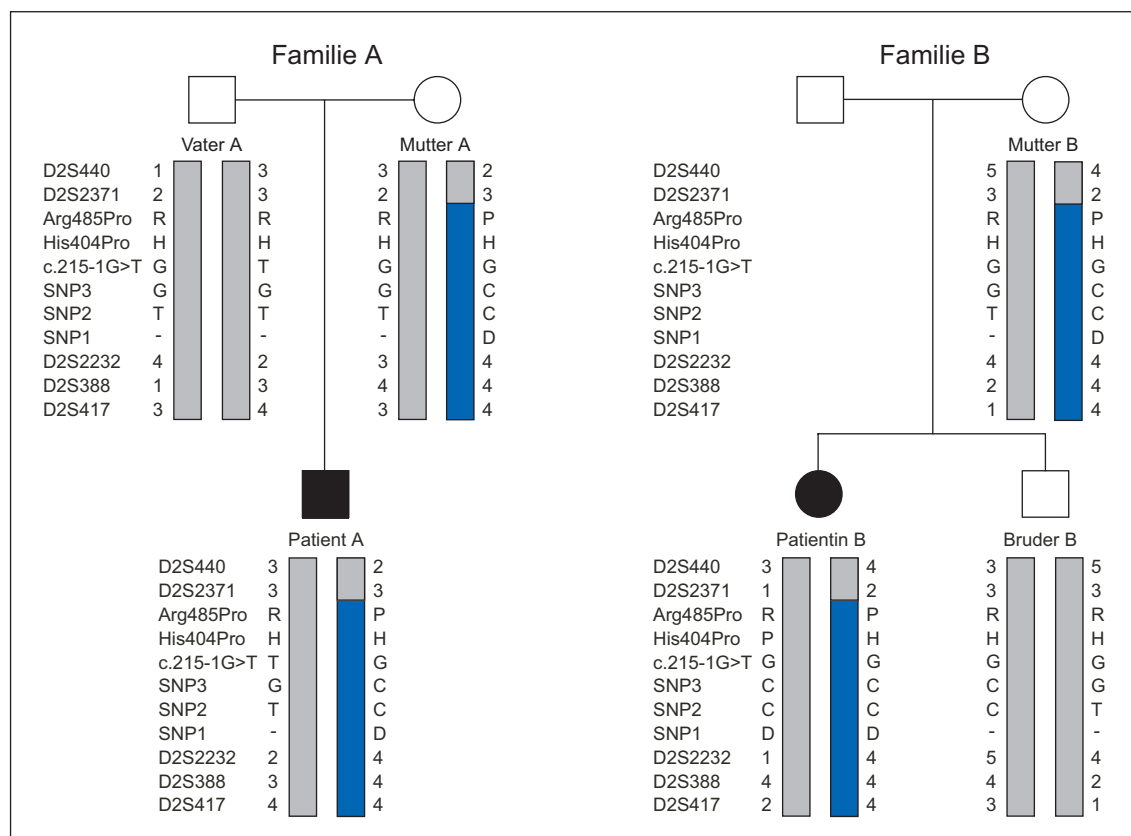


Abb. 19: Haplotype-Analyse zum Nachweis eines Founder-Effektes im GGCX-Gen bei zwei Familien A und B. Die Haplotypen, die die Arg485Pro-Mutation beinhalten (blaue Balken) wurden jeweils von der Mutter auf den Patienten A bzw. die Patientin B vererbt. Bis auf die beiden distal gelegenen Mikrosatelliten-Marker D2S2371 und D2S440 sind diese Haplotypen identisch. Dies spricht mit hoher Wahrscheinlichkeit für einen gemeinsamen Ursprung der beiden Mütter der Patienten und somit für einen Founder-Effekt der Arg485Pro-Mutation.

Um endgültig beweisen zu können, dass die Arg485Pro-Mutation kausal für die VKCFD1-Erkrankung ist, sollte ein GGCX-Aktivitätstest durchgeführt werden [bisher unveröffentlichte Daten]. Zu diesem Zweck wurde die Arg485Pro-Variante und das GGCX-Wildtyp-Protein mithilfe des Baculovirus-Systems in Sf9-Insektenzellen rekombinant exprimiert und anschließend über ein eingeführtes HPC4-Sequenzmotiv (EDQVDPRLIDGK) mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der GGCX-Aktivitätstest erfolgte durch Zugabe der folgenden Substrate bzw. Cosubstrate:

- Vitamin K-Hydrochinon (KH₂) als essentieller Cofaktor der GGCX
- radioaktiv markiertes NaH¹⁴CO₃ zum Nachweis des Einbaus von Carboxylgruppen in die Gla-Domäne von VKD-Proteinen
- FLEEL (Phe-Leu-Glu-Glu-Leu) als kurzes synthetisches Gla-Peptid
- das 19 AS umfassende Propeptid von Faktor IX (ProFIX19) zur Aktivierung der GGCX

- oder alternativ zu FLEEL und ProFIX19: rekombinant exprimiertes FIXproGla, ein 59 AS umfassendes Peptid aus dem Propeptid und der Gla-Domäne von Faktor IX. Die kinetischen Studien erfolgten durch Zugabe variierender Konzentrationen einer dieser Substrate unter Konstanthaltung der anderen Substrate. In Abb. 20 sind die Ergebnisse der Substratsättigungskurven der Arg485Pro-Variante und des Wildtyps dargestellt.

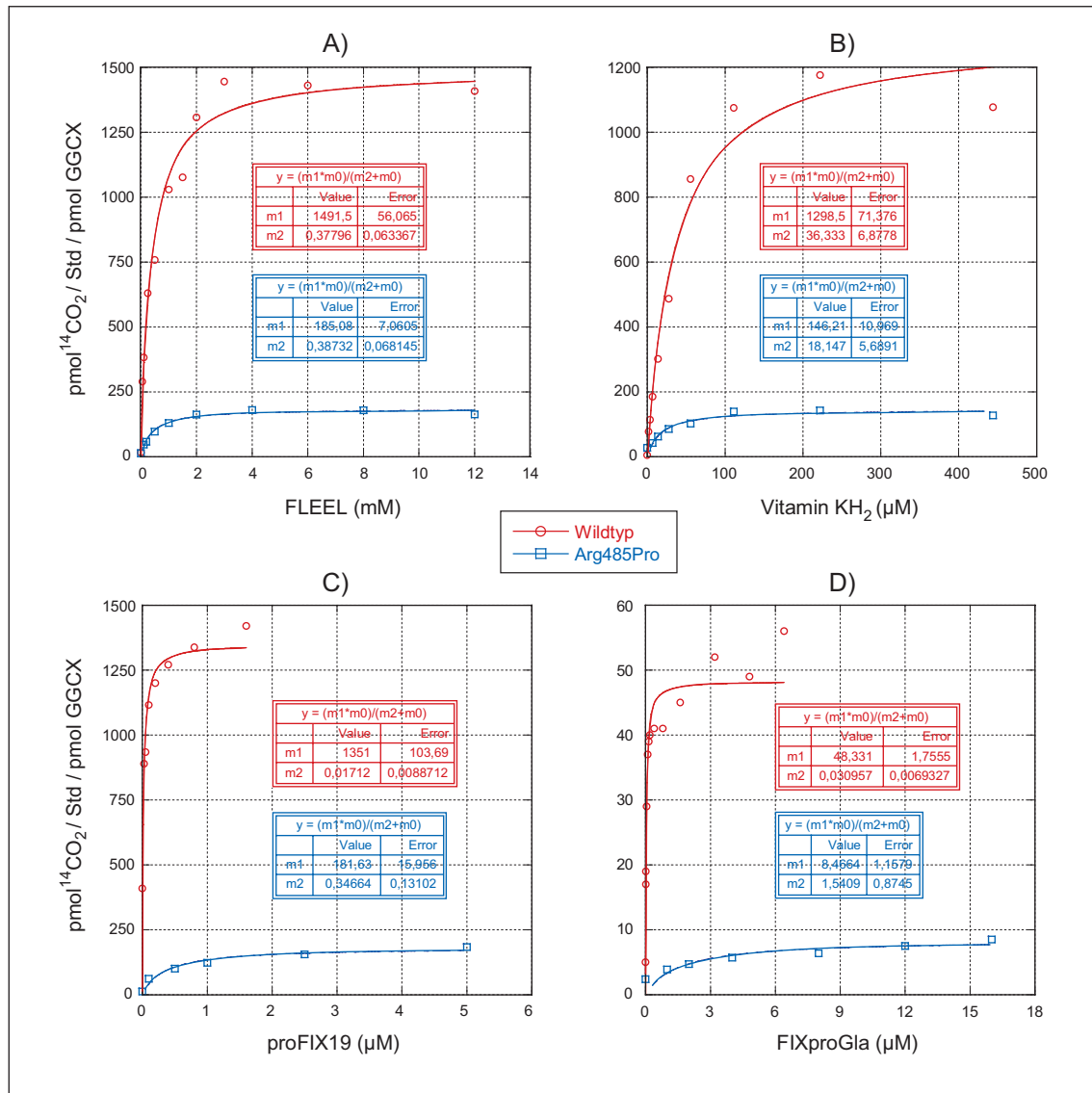


Abb. 20: Kinetik-Studien an der Wildtyp-GGCX (rote Kurven) und der Arg485Pro-Variante (blaue Kurven) nach rekombinanter Expression in Insektenzellen. Die Diagramme inklusive der Berechnungen von V_{max} (= m1) und K_M (= m2) wurden nach der Michaelis-Menten-Gleichung mithilfe der Software „Kaleida-Graph“ erstellt. A) Carboxylierung von FLEEL: V_{max} der Arg485Pro-Variante ist ca. 8 mal niedriger als beim Wildtyp, die K_M -Werte sind jedoch nahezu identisch. B) Einfluss der Vitamin KH_2 -Konz. auf die Carboxylierung von FLEEL: V_{max} der Mutante ist ca. 9 mal niedriger als beim Wildtyp, der K_M -Wert liegt etwa bei der Hälfte. C) Stimulation der FLEEL-Carboxylierung durch ProFIX19: V_{max} der Mutante ist ca. 7 mal niedriger als beim Wildtyp, die halbe maximale Stimulationskonzentration von ProFIX19 (m2) ist für die Mutante ca. 20 mal höher als für den Wildtyp. D) Carboxylierung von FIXproGla: V_{max} der Mutante ist ca. 6 mal niedriger als beim Wildtyp, K_M ist um das 50-fache erhöht.

Daraus ist deutlich ersichtlich, dass die GGCX-Aktivität der Arg485Pro-Mutante unabhängig vom Substrat niedriger ist als die des Wildtyps, was man aus den niedrigeren V_{\max} -Werten in allen vier Diagrammen ablesen kann. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für die FLEEL-Carboxylierung bei konstanter Propeptid- und Vitamin KH_2 -Konzentration ist bei der Arg485Pro-Variante und dem Wildtyp nahezu identisch (Abb. 20 A). Auch bei variierenden Vitamin KH_2 -Konzentrationen ist der K_M -Wert der Mutante mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb. 20 B). Die halb-maximale Stimulationskonzentration von ProFIX19 und der K_M -Wert für FIXproGla sind jedoch bei der Arg485Pro-Variante auf ein Vielfaches gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abb. 20 C und D). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der Austausch von Arginin durch Prolin die Affinität der GGCX zum Propeptid der Gla-Proteine beeinträchtigt. Eine verschlechterte Propeptidbindung kann sich ebenfalls auf die Bindung der Gla-Domäne und die Bindung von Vitamin KH_2 auswirken und somit die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion herabsetzen. Für einen Defekt der Propeptidbindungsstelle bedingt durch die Arg485Pro-Mutation sprechen auch die Ergebnisse von Wu und Kollegen [Wu et al., 1997 b)], wonach sich die Propeptidbindungsstelle im Bereich von AS 438 bis AS 507 im GGCX-Protein befindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Arg485Pro-Mutation, die bei zwei unabhängigen VKCFD1-Patienten identifiziert werden konnte, durch einen nachgewiesenen Founder-Effekt vererbt wurde und mittels GGCX-Aktivitätstest als VKCFD1-verursachende Mutation bestätigt werden konnte.

4.7 Ausblick

Grundlage für die Entwicklung neuer effektiverer gerinnungshemmender Medikamente mit weniger starken Nebenwirkungen als die momentan eingesetzten Vitamin K-Antagonisten ist die detaillierte Strukturaufklärung von VKORC1 bzw. des gesamten Vitamin K-Epoxid-Reduktase-Komplexes, dem Angriffspunkt der Cumarinderivate. Zu diesem Zweck muss zunächst eine Aufreinigung des VKORC1-Proteins erfolgen. Eine Schwierigkeit bei der Aufreinigung stellt die Aufrechterhaltung der Reduktase-Funktion bzw. die Solubilisierung und anschließende Rekonstitution dieses integralen Membranproteins dar. In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main konnten wir VKORC1 in großen Mengen in der Hefe *Pichia pastoris* rekombinant exprimieren. Die Aufreinigung zur Homogenität und eine funktionell aktive Rekonstitution stehen noch aus. Anschließend wird die Kristallisation und somit die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von VKORC1 ein wichtiges Ziel sein. Dies wird u.a. die Charakterisierung der exakten Bindungsstellen von Vitamin K und seinen Antagonisten ermöglichen. Die Aufreinigung des VKORC1-Proteins ist ebenfalls eine wichtige Voraussetzung zur Herstellung von Antikörpern gegen spezifische Epitope von VKORC1. Die Antikörper können u.a. für Coimmunopräzipitations-Experimente genutzt werden, um eventuell weitere Bindungspartner von VKORC1 zu identifizieren.

Die Herstellung von Knock-out-Mäusen für VKORC1 und das homologe Protein VKORC1L1 wurde begonnen und soll neue Erkenntnisse zur Pathogenese der mit den beiden Proteinen assoziierten Erkrankungen liefern. Gewebsspezifische Knock-out-Experimente sollen die Rolle der bekannten Vitamin K-abhängigen Proteine in embryonalen und adulten Mäusen zeigen und ggf. Hinweise auf noch unbekannte VKD-Proteine liefern.

Ein weiteres wichtiges Ziel von ökonomischer Relevanz ist die Co-expression von VKORC1 mit den verschiedenen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, um die Effizienz von Gerinnungspräparaten zu erhöhen, die bei genetischen Defekten der Gerinnung als Substitutionstherapie eingesetzt werden. Die Arbeitsgruppe um Darrel Stafford konnte in ihrer neuesten Veröffentlichung zeigen, dass die γ -Carboxylierung von Faktor X durch Co-expression mit VKORC1 von 52 % auf 92 % erhöht werden konnte [Sun et al., 2005]. Die Aktivität von VKORC1 scheint also – zumindest *in vitro* – der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Carboxylierung und damit für die Aktivität der Gerinnungsfaktoren zu sein. Experimente zur Co-expression von VKORC1 mit den

Faktoren II, VII oder IX werden bereits in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Fregin in HEK293-Zellen durchgeführt.

Neben den krankheitsverursachenden Mutationen im VKORC1-Gen konnten auch Variationen identifiziert werden, die keinen direkt erkennbaren Phänotyp aufweisen. Bestimmte Polymorphismen (SNPs) im VKORC1- und im Cyp2C9-Gen konnten jedoch mit der Höhe der effektiven Warfarin-Dosis bei der Therapie von Thrombosepatienten assoziiert werden. Eine amerikanische Arbeitsgruppe konnte z.B. in drei amerikanischen Patientenkollektiven, die mit Warfarin therapiert wurden, über die Analyse von 10 SNPs des VKORC1-Gens fünf Haupt-Haplotypen festlegen [Rieder et al., 2005], wobei einer dieser Haplotypen mit einer sehr niedrigen, ein anderer mit einer sehr hohen Warfarindosis assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe um Veenestra et al. konnte bei einem chinesischen Patientenkollektiv aus Hong Kong einen VKORC1-Haplotyp identifizieren, der ebenfalls signifikant mit einer erhöhten Warfarindosis einhergeht [Veenestra et al., 2005]. Eine SNP-Studie in einem deutschen Kollektiv wurde nun von der Frankfurter Arbeitsgruppe um Johannes Oldenburg durchgeführt und ein Vergleich der Haplotypen in verschiedenen ethnischen Populationen vorgenommen.

Wie in dieser Promotionsarbeit gezeigt werden konnte, stellte die Identifizierung von VKORC1 die molekulare Grundlage für die Aufklärung der mit dem Vitamin K-Stoffwechsel assoziierten Erkrankungen und der Wirkungsweise von Cumarinderivaten dar. Die sich nun anschließenden Experimente sollen detaillierte Kenntnisse über alle im Vitamin K-Zyklus beteiligten Komponenten liefern und dadurch eine entscheidende Verbesserung in der Therapie der vorgestellten Erkrankungen bzw. bei der Bekämpfung von Ratten und Mäusen erzielen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Abramovitz M., Wong E., Cox M. E., Richardson C. D., Li C., Vickers P. J., 1993: 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 215: 105-111.

Alving B. M., Strickler M. P., Knight R. D., Barr C. F., Berenberg J. L., Peck C. C., 1985: Hereditary warfarin resistance. *Arch. Intern. Med.* 145: 499-501.

Arner E. S., Holmgren A., 2000: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6102-6109.

Begent L. A., Hill A. P., Steventon G. B., Hutt A. J., Pallister C. J., Cowell D. C., 2001: Characterization and purification of the vitamin K₁ 2,3 epoxide reductase system from rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 481-486.

Bell R. G., Matchinger J. T., 1970: Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 141: 473-476.

Berkner K. L., Pudota B. N., 1998: Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 466-471.

Berkner K. L., 2000: The vitamin K-dependent carboxylase. *J. Nutr.* 130: 1877-1880.

Berkner K. L., Runge K. W., 2004: The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* 2: 2118-2132.

Boneh A., Bar-Ziv J., 1996: Hereditary deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors with skeletal abnormalities. *Am. J. Med. Gen.* 65: 241-243.

Booth S. L., Suttie J. W. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J. Nutr.* 128: 785-788.

Borowski M., Furie B. C., Bauminger S., Furie B., 1986: Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. *J. Biol. Chem.* 261: 14969-14975.

Boyle C. M., 1960: Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature* 188: 517

Brenner B., Tavori S., Zivelin A., Keller C.B., Suttie J.W., Tatarsky I., Seligsohn U., 1990: Hereditary deficiency of all vitamin K-dependent procoagulants and anticoagulants. *Br. J. Haematol.* 75: 537-542.

Brenner B., Sánchez-Vega B., Wu S. M., Lanir N., Stafford D. W., Solera J., 1998: A missense mutation in γ -glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood* 92: 4554-4559.

Bristol J. A., Ratcliffe J. V., Roth D. A., Jacobs M. A., Furie B. C., Furie B., 1996: Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood.* 88: 2585-2593.

Bush K. A., Stenflo J., Roth D. A., Czerwiec E., Harrist A., Begley G. S., Furie B. C., Furie B., 1999: Hydrophobic amino acids define the carboxylation recognition site in the precursor of the gamma-carboxyglutamic-acid-containing conotoxin epsilon-TxIX from the marine cone snail *Conus textile*. *Biochemistry* 38:14660-14666.

Cain D., Hutson S. M., Wallin R., 1997: Assembly of the Warfarin-sensitive Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase Enzyme Complex in the Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Biol. Chem.* 272: 29068-29075.

Cain D., Hutson S. M., Wallin R., 1998: Warfarin Resistance Is Associated with a Protein Component of the Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase Enzyme Complex in Rat Liver. *Thromb. Haemost.* 80: 128-133.

Carrie I., Portoukalian J., Vicaretti R., Rochford J., Potvin S., Ferland G., 2004: Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *J. Nutr.* 134: 167-72.

Carlisle T. L., Suttie J. W., 1980: Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in rat liver. *Biochemistry* 19: 1161-1167.

Chen H. I., Sudol M., 1995: The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7819-7823.

Chu K., Wu S. M., Stanley T., Stafford D. W., High K. A., 1996: A mutation in the propeptide of Factor IX leads to warfarin sensitivity by a novel mechanism. *J. Clin. Invest.* 98: 1619-1625.

Clark C., Olivera B. M., Cruz L. J., 1981: A toxin from the venom of the marine snail *Conus geographus* which acts on the vertebrate central nervous system. *Toxicon* 19: 691-699.

Dam H., 1935: The antihemorrhagic vitamin of the chick. Occurrence and chemical nature. *Nature (London)* 135: 652-653.

Dam H., Dyggve H., Larsen H., Plum P., 1952: The relation of vitamin K deficiency to hemorrhagic disease of the newborn. *Adv. Pediatr.* 5: 129-153.

Danesi M. A., 1980: Total resistance to oral anticoagulants (nicoumalone and warfarin). *Br. J. Clin. Pract.* 34: 55-64.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau/Braus, Frankfurt/Main 2000

Deykins D., 1970: Warfarin Therapy (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 283: 691-694.

Diab F., Feffer S., 1994: Hereditary warfarin resistance. *South. Med. J.* 87: 407-409.

Dib C., Faure S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J., 1996: A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.

Dodsworth E., 1961: Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic. Engin. Lond.* 3746: 1668.

Dowd P., Hershline R., Ham S. W., Naganathan S., 1995: Vitamin K and energy transduction: a base strength amplification mechanism. *Science* 269:1684-1691.

Einbond A., Sudol M., 1996: Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett.* 384: 1-8.

Ekelund H., Lindeberg L., Wranne L., 1986: Combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X: A case of probable congenital origin. *Ped. Hematol. Oncol.* 3: 187-193.

Esmon C. T., 2000: Regulation of blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477: 349-360.

Fischer M., Zweymuller E., 1966: Kongenitaler Kombiniertes Mangel der Faktoren II, VII und X. *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 95: 309-323.

Fregin A., Rost S., Wolz W., Krebsova A., Müller C. R., Oldenburg J., 2002: Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood* 100: 3229-3232.

Furie B., Furie B. C., 1988: The Molecular Basis of Blood Coagulation. *Cell* 53: 505-518.

Goldsmith G. H., Pence R. E., Ratnoff O. D., Adelstein D. J., Furie B., 1982: Studies on a familie with combined functional deficiencies of vitamin K-dependent coagulation factors. *J. Clin. Invest.* 69: 1253-1260.

Goruppi S., Ruaro E., Schneider C., 1996: Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 12: 471-480.

Greaves J. H., Ayres P., 1967: Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature* 215: 877-878.

Greaves J. H., Ayres P., 1969: Linkages between genes for coat colour and resistance to warfarin in *Rattus norvegicus*. *Nature* 224: 284-285.

Greaves J. H., Sheperd D. S., Quy R., 1982: Field trials of second-generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J. Hygiene* 89: 295-301.

Goodstadt L., Ponting C. P., 2004: Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends. Biochem. Sci.* 29: 289-292.

Hart J. P., Shearer M. J., Klenerman L., Catterall A., Reeve J., Sambrook P. N., Dodds R. A., Bitensky L., Chayen J., 1985: Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K1 in osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 1268-1269.

Holt R. J., Freytes C. O., 1983: Familial warfarin resistance. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 17: 281-283.

Jackson W. B., Ashton A. D., 1986: Case histories of anticoagulant resistance. In: *Pesticede resistance: Strategies and tactics for management*. National Academy Press, Washington.

Jackson W. B., Ashton A. D., Delventhal K., 1988: Overview of anticoagulant rodenticide usage and resistance. In: *Current Advances in Vitamin K Research* (Suttie J. W., Hg.), Elsevier, New York.

Jie K. S., Bots M.L., Vermeer C., Witteman J. C., Grobbee D. E., 1995: Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis* 116:117-123.

Johnson C. A., Chung K. S., McGrath K. M., Bean P. E., Roberts H. R., 1980: Characterization of a variant prothrombin in a patient congenitally deficient in factors II, VII, IX and X. *Br. J. Haematol.* 44: 461-469.

Johnson R. A., 1988: Performance studies with the new anticoagulant rodenticide, flocoumafen, against *Mus domesticus* and *Rattus norvegicus*. *EPPO Bull.* 18: 481-488.

Jorgensen M. J., Cantor A. B., Furie B. C., Brown C. L., Shoemaker C. B., Furie B., 1987: Recognition site directing vitamin K-dependent gamma-carboxylation resides on the propeptide of factor IX. *Cell* 48: 185-191.

Kéréveur A., Leclercq M., Trossaërt M., Dupeyron J. P., Parent F., Horellou M. H., Conard J., Bachmann F., Samama M. M., 1997: Vitamin K Metabolism in a Patient Resistant to Vitamin K Antagonists. *Haemostasis* 27: 168-173.

Knobloch J. E., Suttie J. W., 1987: Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X. *J. Biol. Chem.* 262: 15334-15337.

Kohn M. H., Pelz H. J., Wayne R. K., 2003: Locus-specific genetic differentiation at *Rw* among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations. *Genetics* 164: 1055-1070.

Kruglyak L., Daly M. L., Reeve-Daly M. P., Lander E. S., 1996: Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 1347-1363.

Kuijjer P. M., Hutten B. A., Prins M. H., Buller H. R., 1999: Prediction of the risk of bleeding during anticoagulant treatment for venous thromboembolism. *Arch. Intern. Med.* 159: 457-460.

Kulman J. D., Harris J. E., Haldeman B. A., Davie E. W., 1997: Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9058-9062.

Kulman J. D., Harris J. E., Xie L., Davie E. W., 2001: Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1370-1375.

Kuo W. L., Stafford D. W., Cruces J., Gray J., Solera J., 1994: Chromosomal localization of the gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12. *Genomics* 25: 746

Lathrop G. M., Lalouel J. M., Julier C., Ott J., 1984: Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3443-3446.

Leonard C.O., 1988: Vitamin K responsive bleeding disorder: A genocopy of the warfarin embryopathy. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center* 7: 165-166.

Li T., Chang C. Y., Jin D. Y., Lin P. J., Khvorova A., Stafford D. W., 2004: Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-544.

Lin P. J., Jin D. Y., Tie J. K., Presnell S. R., Straight D. L., Stafford D. W., 2002: The putative vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase internal propeptide appears to be the propeptide binding site. *J. Biol. Chem.* 277: 28584-28591.

Link K. P., 1959: The discovery of dicoumarol and its sequels. *Circulation* 19: 97

Linnemann M., Kühl M., 2004: *Biochemie für Mediziner*. Springer-Verlag, 7. Auflage. Kapitel 19: Die Blutgerinnung.

Loughnan P. M., McDougall P. N., 1993: Epidemiology of late onset haemorrhagic disease: a pooled data analysis. *J. Paediatr. Child. Health.* 29:177-181.

Lund M., 1964: Resistance to warfarin in the common rat. *Nature* 203: 778.

Lund M., 1984: Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides. *Proc. Vertebrate Pest Conf.* 11: 89-94.

Luo G., Ducey P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R., Karsenty G., 1997: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386: 78-81.

Ma. Q., Cui K., Xiao F., Lu A. Y., Yang C. S., 1992: Identification of a glycine-rich sequence as an NAD(P)H-binding site and tyrosine 128 as a dicumarol-binding site in rat liver NAD(P)H:quinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 22298-22304.

MacNicoll A. D., Gill J. E., 1993: Revised methodology for a blood clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *European Plant Protection Organisation Bulletin* 23: 701-707.

Manfioletti G., Brancolini C., Avanzi G., Schneider C., 1993: The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4976-4985.

Mc Millan C. W., Roberts H. R., 1966: Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. *N. Engl. J. Med.* 274: 1313-1315.

McNinch A. W., Tripp J. H., 1991: Haemorrhagic disease of the newborn in the British Isles: two year prospective study. *Br. Med. J.* 303:1105-1109.

Morris D. P., Soute B. A., Vermeer C., Stafford D. W., 1993: Characterization of the purified vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase. *J. Biol. Chem.* 268: 8735-8742.

Morris D. P., Stevens R. D., Wright D. J., Stafford D. W., 1995: Processive post-translational modification. Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. *J. Biol. Chem.* 270: 30491-30498.

Morton N. E., 1955: Sequential Tests for the Detection of Linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7: 277-318

Motohara K., Matsukane I., Endo F., Kiyota Y., Matsuda I., 1989: Relationship of milk intake and vitamin K supplementation to vitamin K status in newborns. *Pediatrics* 84: 90-93.

Mousallem M., Spronk H. M., Sacy R., Hakime N., Soute B. A., 2001: Congenital combined deficiencies of all vitamin K-dependent coagulation factors. *Thromb. Haemost.* 86: 1334-1336.

Mukharji I., Silverman R. B., 1985: Purification of vitamin K epoxide reductase that catalyzes conversion of vitamin K 2,3-epoxide to 3-hydroxy-2-methyl-3-phytyl-2,3-dihydro-naphthoquinone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2713-2717.

Munroe P. B., Olgunturk R. O., Fryns J. P., Van Maldergem L., Ziereisen F., Yuksel B., Gardiner R. M., Chung E., 1999: Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat. Genet.* 21: 142-144.

Mutucumarana V. P., Stafford D. W., Stanley T. B., Jin D. Y., Solera J., Brenner B., Azerad R., Wu S. M., 2000: Expression and characterization of the naturally occurring mutation L394R in human gamma-glutamyl carboxylase. *J. Biol. Chem.* 275: 32572-32577.

Myllymäki A., 1995: Anticoagulant resistance in Europe: Appraisal of the data from the 1992 EPPO questionnaire. *Pesticide Science* 43: 69-72.

Naganuma K., Fujita A., Taniguchi N., Takada S., 1981: Warfarin susceptibility in the roof rat, *Rattus rattus*, in some locations of Tokyo. *Japanese Journal of Sanitation Zoology* 32: 243-245.

Nagata K., Ohashi K., Nakano T., Arita H., Zong C., Hanafusa H., Mizuno K., 1997: Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 30022-30027.

Nakano T., Kawamoto K., Higashino K., Arita H., 1996: Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *FEBS Lett.* 387: 78-80.

Nelsestuen G. L., Zytковicz T. H., Howard B., 1974: The mode of action of vitamin K. Identification of γ -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.* 249: 6347-6350.

Nyberg P., He X., Hardig Y., Dahlback B., Garcia de Frutos P., 1997: Stimulation of Sky tyrosine phosphorylation by bovine protein S--domains involved in the receptor-ligand interaction. *Eur. J. Biochem.* 246: 147-154.

Oldenburg J., Quenzel E. M., Harbrecht U., Fregin A., Kress W., Muller C. R., Hertfelder H. J., Schwaab R., Brackmann H. H., Hanfland P., 1997: Missense mutations at ALA-10 in the factor IX propeptide: an insignificant variant in normal life but a decisive cause of bleeding during oral anticoagulant therapy. *Br. J. Haematol.* 98: 240-244.

Oldenburg J., Brederlow B., Fregin A., Rost S., Wolz W., Eberl W., Eber S., Lenz E., Schwaab R., Brackmann H. H., Effenberger W., Harbrecht U., Schurgers L., Vermeer C., Müller C. R., 2000: Congenital Deficiency of Vitamin K Dependent Coagulation Factors in Two Families Presents as a Genetic Defect of the Vitamin K-Epoxy-Reductase-Complex. *Thromb. Hemost.* 84: 937-941.

Omdahl J. L., Swamy N., Serda R., Annalora A., Berne M., Rayb R., 2004: Affinity labeling of rat cytochrome P450C24 (CYP24) and identification of Ser57 as an active site residue. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.*;89-90: 159-162.

Orbak Z., Selimoglu A., Doneray H., 2003: Inherited vitamin K deficiency: case report and review of literature. *Yonsei Med. J.* 44: 923-927.

O'Reilly R. A., Aggeler P. M., Hoag M. S., Leong L. S., Kropatkin M. L., 1964: Hereditary transmission of exceptional resistance to coumarin anticoagulant drugs. *New Eng. J. Med.* 271: 809-815.

O'Reilly R. A., 1970: The second reported kindred with hereditary resistance to oral anticoagulant drugs. *New Eng. J. Med.* 282: 1448-1451.

Passarge E., 1994: *Taschenatlas der Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Pauli R. M., Lian J. B., Mosher D. F., Suttie J. W., 1987: Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin ambriopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives. *Am. J. Hum. Genet.* 41: 566-583.

Pechlaner C., Vogel W., Erhart R., Rumpel E., Kunz F., 1992: A new case of combined deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors. *Thromb. Haemost.* 68: 617.

Pelz H.-J., Rost S., Huenerberg M., Fregin A., Heiberg A. C., Baert K., MacNicol A. D., Prescott C. V., Walker A. S., Oldenburg J., Müller C. R., 2005: The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170: 1839-1847.

Powis G., Montfort W. R., 2001: Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30: 421-455.

Prentice C. R., 1985: Acquired coagulation disorders. *Clin Haematol.* 14: 413-442.

Presnell S. R., Stafford D. W., 2002: The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb. Haemost.* 87: 937-946.

Price P. A., Urist M. R., Otawara Y., 1983: Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 765-771.

Price P. A., Williamson M. K., 1993: Substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase: identification of a sequence homology between the carboxylase and the carboxylase recognition site in the substrate. *Protein Sci.* 2:1987-1988.

Rieder M. J., Reiner A. P., Gage B. F., Nickerson D. A., Eby C. S., McLeod H. L., Blough D. K., Thummel K. E., Veenstra D. L., Rettie A. E., 2005: Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Engl. J. Med.* 352: 2285-2293.

Rigby A. C., Baleja J. D., Furie B. C., Furie B., 1997: Three-dimensional structure of a gamma-carboxyglutamic acid-containing conotoxin, conantokin G, from the marine snail *Conus geographus*: the metal-free conformer. *Biochemistry* 36: 6906-6914.

Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hortnagel K., Pelz H.-J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E. G., Müller C. R., Strom T. M., Oldenburg J., 2004 a): Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-541.

Rost S., Fregin A., Koch D., Compes M., Müller C. R., Oldenburg J., 2004 b): Compound heterozygous mutations in the gamma-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Br. J. Haematol.* 126: 546-549.

Rost S., Fregin A., Hünenberg M., Bevans C.G., Müller C.R., Oldenburg J., 2005: Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: Evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb. Hemost.* 94: 780-786.

Rowe F. P., Plant C. J., Bradfield A., 1981: Trials of the anticoagulant rodenticides bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Hyg (Lond)* 87: 171-177.

Saunders, G. R., 1978: Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney. *NSW. Search* 9: 39-40.

Saxena S.P., Israels E.D., Israels L.G., 2001: Novel vitamin K-dependent pathways regulating cell survival. *Apoptosis* 6: 57-68.

Shearer M. J., McBurney A, Breckenridge A. M., Barkhan P., 1977: Effect of warfarin on the metabolism of phylloquinone (vitamin K1):dose-response relationships in man. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52: 621-630.

Shearer M. J., Rahim S., Barkhan P., Stimmler L., 1982: Plasma vitamin K1 in mothers and their newborn babies. *Lancet* 2: 460-463.

Shearer M. J., 1990: Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *Br. J. Haematol.* 75: 156-162.

Shearer M. J., 1992: Vitamin K metabolism and nutriture. *Blood Rev.* 6: 92-104.

Shearer M. J., 1995: Vitamin K. *Lancet* 345: 229-234.

Shearer M. J., 2000: Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3: 433-438.

Siddiqi Z., Blaine W. D, 1982: Anticoagulant resistance in house mice in Toronto, Canada. *Environmental Health Review:* 49-51.

Silverman R. B., Nandi D. L., 1988: Reduced thioredoxin: A possible physiological cofactor for vitamin K epoxide reductase. Further support for an active site disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 1248

Sofi F., Cesari F., Fedi S., Abbate R., Gensini G. F., 2004: Protein Z: "light and shade" of a new thrombotic factor. *Clin. Lab.* 50: 647-652.

Soute B. A., Groenen-van Dooren M. M., Holmgren A., Lundstrom J., Vermeer C., 1992: Stimulation of the dithiol-dependent reductases in the vitamin K cycle by the thioredoxin system. Strong synergistic effects with protein disulphide-isomerase. *Biochem. J.* 281: 255-259.

Soute B. A., Jin D. Y., Spronk H. M., Mutucumarana V. P., Lin P. J., Hackeng T. M., Stafford D. W., Vermeer C., 2004: Characteristics of recombinant W501S mutated human gamma-glutamyl carboxylase. *J. Thromb. Haemost.* 2: 597-604.

Sperling R., Furie B. C., Blumenstein M., Keyt B., Furie B. C., 1978: Metal binding properties of γ -carboxyglutamic acid. *J. Biol. Chem.* 253: 3898-3906.

Spronk H. M. H., Farah R. A., Buchanan G. R., Vermeer C., Soute B. A. M., 2000: Novel mutation in the γ -glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood* 96: 3650-3652.

Stahmann M. A., Huebner C. F., Link K. P., 1941: Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. *J. Biol. Chem.* 138: 513

Stanley T. B., Stafford D. W., Olivera B. M., Bandyopadhyay P. K., 1997: Identification of a vitamin K-dependent carboxylase in the venom duct of a *Conus* snail. *FEBS Lett.* 407: 85-88.

Stanley T. B., Jin D. Y., Lin P. J., Stafford D. W., 1999: The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J. Biol. Chem.* 274: 16940-16944.

Stanton C., Taylor R., Wallin R., 1991: Processing of prothrombin in the secretory pathway. *Biochem. J.* 277: 59-65.

Stenflo J., Fernlund P., Egan W., Roespstorff P., 1974: Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2730-2733.

Stenflo J., Suttie J. W., 1977: Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 157-172.

Strachan T., Read A. P., 1996: *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Stryer L., 1999: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Sun Y. M., Jin D. Y., Camire R. M., Stafford D. W., 2005: Vitamin K epoxide reductase significantly improves carboxylation in a cell line over-expressing factor X. *Blood* [Epub ahead of print].
- Suttie J. W., 1985: Vitamin K. In: *Fat-soluble vitamins: their biochemistry and applications*. (Diplock A. D., Hg.) Heinemann, London.
- Suttie J. W., 1985: Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 459-477.
- Suttie J. W., 1987: The biochemical basis of warfarin therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 214: 3-16.
- Suttie J. W., 1994: Vitamin K Antagonists. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (Colman R. W., Hirsh J., Marder V. J., Salzman E. W., Hg.), J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Taube J., Halsall D., Baglin T., 2000: Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 96: 1816-1819.
- Thijssen H. H., Janssen Y. P., Vervoort L. T., 1994: Microsomal lipamide reductase provides vitamin K epoxide reductase with reducing equivalents. *Biochem. J.* 297: 277-280.
- Thijssen H. H., Pelz H.-J., 2001: Sensitive and selective estimation of coumarin resistance by in vitro vitamin K epoxide reductase assay. In: *Advances in Vertebrate Pest Management II.*, (Pelz, H.-J., Cowan, D. P., Feare, C. J.; Hg.) Filander Verlag, Fürth.
- Thomsen-Zieger N., Pandini V., Caprini G., Aliverti A., Cramer J., Selzer P. M., Zanetti G., Seeber F., 2004: A single in vivo-selected point mutation in the active center of *Toxoplasma gondii* ferredoxin-NADP⁺ reductase leads to an inactive enzyme with greatly enhanced affinity for ferredoxin. *FEBS Lett.* 576: 375-380.

Tie J., Wu S. M., Jin D., Nicchitta C. V., Stafford D. W., 2000: A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 96: 973-978.

Tokunaga F., Wakabayashi S., Koide T., 1995: Warfarin causes the degradation of protein C precursor in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 34: 1163-1170.

Veenstra D. L., You J. H., Rieder M. J., Farin F. M., Wilkerson H. W., Blough D. K., Cheng G., Rettie A. E., 2005: Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet. Genomics* 15: 687-691.

Vermeer C., 1984: The vitamin K-dependent carboxylation reaction. *Mol. Cell. Biochem.* 61: 17-35.

Vermeer C., Hamulyák K., 2004: Vitamin K: lessons from the past. *J. Thromb. Haemos.* 2: 2115-2117.

Vicente V., Maia R., Alberca I., Tamagnini G. P. T., Lopez Borrascas A., 1984: Congenital deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors and protein C. *Thromb. Haemost.* 51: 343-346.

Von Kries R., Hanawa Y., 1993: Neonatal vitamin K prophylaxis. Report of Scientific and Standardization Subcommittee on Perinatal Haemostasis. *Thromb Haemost.* 69: 293-295.

Wallace M. E., MacSwiney F. J., 1976: A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *J. Hyg. (Lond)* 76: 173-181.

Wallin R., Gebhardt O., Prydz H., 1978: NAD(P)H dehydrogenase and its role in the vitamin K-dependent carboxylation reaction. *J. Biochem.* 169: 95-101.

Wallin R., Suttie J. W., 1982: Vitamin K-dependent carboxylase: evidence for cofractionation of carboxylase and epoxidase activities, and for carboxylation of a high-molecular-weight microsomal protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 155-163.

Wallin R., Martin L. F., 1987: Warfarin poisoning and vitamin K antagonism in rat and human liver. Design of a system in vitro that mimics the situation in vivo. *Biochem. J.* 241: 389-396.

Wallin R., Hutson S. M., Cain D., Sweatt A., Sane D. C., 2001: A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J.* 15: 2542-2544.

Warrier I., Brennan C. A., Lusher J. M., 1986: Familial warfarin resistance in a black child. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 8: 346-347.

Wu S.-M., Cheung W.-F., Frazier D. F., Stafford D. W., 1991: Cloning and expression of the cDNA for human γ -glutamyl carboxylase. *Science* 254: 1634-1636.

Wu S.-M., Stafford D. W., Frazier L. D., Fu Y.-Y., High K. A., Chu K., Sanchez-Vega B., Solera J., 1997 a): Genomic sequence and transcription start site for the human γ -glutamyl carboxylase. *Blood* 89: 4058-4062.

Wu S.-M., Mutucumarana V. P., Geromanos S, Stafford D. W., 1997 b): The propeptide binding site of the bovine γ -glutamyl carboxylase. *J. Biol. Chem.* 272: 11718-11722.

Yamada M., Kuliopulos A., Nelson N. P., Roth D. A., Furie B., Furie B. C., Walsh C. T., 1995: Localization of the factor IX propeptide binding site on recombinant vitamin K dependent carboxylase using benzoylphenylalanine photoaffinity peptide inactivators. *Biochemistry* 34: 481-489.

Zipursky, A., 1999: Prevention of vitamin K deficiency bleeding in newborns. *Br. J. Haematol.* 104: 430-437.

6 LISTE DER VORGELEGTEN PUBLIKATIONEN

- Anlage 1** Oldenburg J., Brederlow B., Fregin A., Rost S., Wolz W., Eberl W., Eber S., Lenz E., Schwaab R., Brackmann H. H., Effenberger W., Harbrecht U., Schurgers L., Vermeer C., Müller C. R., 2000: Congenital Deficiency of Vitamin K Dependent Coagulation Factors in Two Families Presents as a Genetic Defect of the Vitamin K-Epoxy-Reductase-Complex. *Thromb. Hemost.* 84: 937-941.
- Anlage 2** Fregin A., Rost S., Wolz W., Krebsova A., Müller C. R., Oldenburg J., 2002: Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood* 100: 3229-3232.
- Anlage 3** Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hortnagel K., Pelz H.-J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E. G., Müller C. R., Strom T. M., Oldenburg J., 2004 a): Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-541.
- Anlage 4** Pelz H.-J., Rost S., Huenerberg M., Fregin A., Heiberg A. C., Baert K., MacNicol A. D., Prescott C. V., Walker A. S., Oldenburg J., Müller C. R., 2005: The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170: 1839-1847.
- Anlage 5** Rost S., Fregin A., Hünerberg M., Bevans C.G., Müller C.R., Oldenburg J., 2005: Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: Evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb. Hemost.* 94: 780-786.
- Anlage 6** Rost S., Fregin A., Koch D., Compes M., Müller C. R., Oldenburg J., 2004 b): Compound heterozygous mutations in the gamma-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Br. J. Haematol.* 126: 546-549.

7 SONDERDRUCKE DER VORGELEGTEN PUBLIKATIONEN

7.1 Anlage 1

Congenital Deficiency of Vitamin K Dependent Coagulation Factors in Two Families Presents as a Genetic Defect of the Vitamin K-Epoxy-Reductase-Complex. *Thrombosis and Hemostasis*.

Rapid Communication

Congenital Deficiency of Vitamin K Dependent Coagulation Factors in Two Families Presents as a Genetic Defect of the Vitamin K-Epoxy-Reductase-Complex

J. Oldenburg^{1,2}, B. von Brederlow^{1,2}, A. Fregin¹, S. Rost¹, W. Wolz¹, W. Eberl³, S. Eber⁴, E. Lenz⁴, R. Schwaab², H. H. Brackmann², W. Effenberger², U. Harbrecht², L. J. Schurgers⁵, C. Vermeer⁵, C. R. Müller¹

From the ¹Institute of Human Genetics, University of Würzburg, Biozentrum, Würzburg
²Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine, University of Bonn, Bonn,
³Städtisches Klinikum Braunschweig, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Braunschweig,
⁴Universitäts-Kinderklinik, Göttingen, Germany;
⁵Department of Biochemistry, University of Maastricht, MD Maastricht, The Netherlands

Key words

Hereditary bleeding disorder, γ -carboxylation, vitamin K epoxide-reductase

Summary

Hereditary combined deficiency of the vitamin K dependent coagulation factors is a rare bleeding disorder. To date, only eleven families have been reported in the literature. The phenotype varies considerably with respect to bleeding tendency, response to vitamin K substitution and the presence of skeletal abnormalities, suggesting genetic heterogeneity. In only two of the reported families the cause of the disease has been elucidated as either a defect in the γ -carboxylase enzyme (1) or in a protein of the vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) complex (2).

Here we present a detailed phenotypic description of two new families with an autosomal recessive deficiency of all vitamin K dependent coagulation factors. In both families offspring had experienced severe or even fatal perinatal intracerebral haemorrhage. The affected children exhibit a mild deficiency of the vitamin K dependent coagulation factors that could be completely corrected by oral substitution of vitamin K. Sequencing and haplotype analysis excluded a defect within the γ -carboxylase gene. The finding of highly increased amounts of vitamin K epoxide in all affected members of both families indicated a defect in a protein of the VKOR-multienzyme-complex. Further genetic analysis of such families will provide the basis for a more detailed understanding of the structure-function relation of the enzymes involved in vitamin K metabolism.

Introduction

Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent coagulation factors II, VII, IX, X, Protein C and Protein S is a rare bleeding disorder that has been reported in only few families (1-11). The pheno-

typic presentation of the disorder shows great variety. Levels of vitamin K dependent proteins ranged from less than 1% to 50%. In some of the families the phenotype could be completely corrected by oral application of vitamin K (11, 12) whereas in other families even a high intravenous vitamin K dosage showed no effect (5, 7). Notably, three families exhibited skeletal abnormalities (2, 9, 11), suggesting the involvement of vitamin K dependent bone related proteins, such as osteocalcin and matrix Gla protein (13).

The phenotype is caused by a defect of the post-translational γ -carboxylation of selected glutamic acids in vitamin K dependent proteins. γ -Carboxy-glutamic acids can bind calcium which is required for the attachment of these proteins to phospholipid membranes, the location of coagulation factor activation (14).

The carboxylase reaction is catalyzed by the γ -glutamyl carboxylase, an integral membrane enzyme located in the rough endoplasmic reticulum. The corresponding gene is located on chromosome 2p1.2 (15) and contains 15 exons encoding a 758 amino acid polypeptide chain (16, 17). Vitamin K hydroquinone (KH₂) functions as a cofactor and is converted to vitamin K epoxide (KO) during carboxylation. To continue carboxylation, vitamin KO is regenerated to vitamin KH₂ by the vitamin K epoxide reductase (VKOR).

A hereditary deficiency of all vitamin K dependent proteins may result from functional deficiency of either the γ -glutamyl carboxylase or the VKOR-complex. So far, the molecular defect has been resolved in a single family, where a missense mutation in the gene coding for the γ -glutamyl carboxylase enzyme has been identified (1). In a second family with additional signs of skeletal abnormalities evidence for a likely involvement of the VKOR-complex has been reported (2).

Here we report another two families with recessively inherited combined deficiency of the vitamin K dependent coagulation proteins. Molecular analysis of the γ -glutamyl carboxylase gene and determination of vitamin KO levels indicated that a dysfunction of a protein related to the VKOR-complex is likely to be causative for the disease.

Methods and Materials

Coagulation Assays

Prothrombin, factor VII, IX and X were determined by one stage assays on a coagulometer Amax C160 (Sigma/Amelung) using commercial immunoadsorbed plasmas. Reagents were purchased from Dade/Behring (Factors VII, IX,

Correspondence to: PD Dr. med. Johannes Oldenburg, Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine, Sigmund-Freud-Str. 25, D-53105 Bonn, Germany – Tel.: 0049-228-287-5188; Fax: 0049-228-287-4320; E-mail: johannes.oldenburg@meb.uni-bonn.de

Table 1 Primers and PCR conditions for sequencing of γ -glutamyl carboxylase gene. Nucleotide positions are given according to Wu et al. (1997)

Exon No.	Annealing Temp. (°C)	Primer	Sequence 5'-3'
Exon I	65	E-I-F	nt687-GTT CAG ACG CGG CAG CTG TG-nt706
		E-I-R	nt780-CGG AGG GCG GGG TCC TAA G-nt798
Exon II	57	E-II-F	nt1151-CCG CCG CAC ACA TAT TTT CT-nt1170
		E-II-R	nt1371-CCA AAT TGC TCC CAC CCA TA-nt1390
Exon III	58	E-III-F	nt3059-AGC TGA GGC CCA ATG ACC AA-nt3078
		E-III-R	nt3271-AGG CCA GTC AAT ATT TCC CA-nt3290
Exon IV	54	E-IV-F	nt3541-CTC TTA ATC CTC TCC CTA CA-nt3560
		E-IV-R	nt3741-TCC CCT TTG TCC CCC CTG AC-nt3760
Exon V	54	E-V-F	nt5881-CTC CCC CCT CCA ATG TTT AC-nt5900
		E-V-R	nt6001-TCC TCC CTC TGT CCT AAA AT-nt6020
Exon VI	54	E-VI-F	nt6519-TTT ATT CTT GCC TAT CTG TA-nt6538
		E-VI-R	nt6820-CTG CTT CTG CTG AAT AGG GA-nt6839
Exon VII	56	E-VII-F	nt7827-CTC CAG TGG GCT GGT GCT TG-nt7846
		E-VII-R	nt8050-TGT GGT TCC TGT TTC CTC CC-nt8069
Exon VIII	55	E-VIII-F	nt8637-GCC AAA CTC CTG AAA TAT GT-nt8656
		E-VIII-R	nt8957-GCC TTT GCT GTA CAC TCC AC-nt8976
Exon IX	57	E-IX-F	nt9058-CAG TGT GAG AAG CAT TGA GC-nt9077
		E-IX-R	nt9285-ACA AAA CCA GAC CCC AAA GC-nt9304
Exon X	55	E-X-F	nt9579-GGT GGG ACT AAT ATG GGG GT-nt9598
		E-X-R	nt9794-CTT GGT AAA AAG AAC TGT GCT-nt9814
Exon XI	55	E-XI-F	nt10105-CCT TAG GAA TGA TGA TGA AA-nt10124
		E-XI-R	nt10441-CAA AAA CAT TCC CTC TCC CC-nt10460
Exon XII	59	E-XII-F	nt10531-TGG GGT GGG ATG ATG AAC TC-nt10550
		E-XII-R	nt10735-TTA CTG GTG TGA GCT ACT GC-nt10754
Exon XIII	52	E-XIII-F	nt11076-ATT TAT CCA TTT CTT CTC CC-nt11095
		E-XIII-R	nt11261-CTA TCT CAG CCC AAA TGT TC-nt11280
Exon XIV	59	E-XIV-F	nt11371-AGG GGA GAG AGT GAT CCA TC-nt11390
		E-XIV-R	nt11665-CCA GGG GAA AGT TAC CAA GC-nt11684
Exon XV	59	E-XV-F	nt12021-ACT TGG TCG GCT TTT TCC TG-nt12040
		E-XV-R	nt12251-CTA CAT CTG CAC CCA ACA TC-nt12270

X) and Bio Merieux (Factor II). Protein C activity was measured on a Cobas Bio (Roche) with the Berichrom test from Dade/Behring.

Serum Vitamin K and KO

Blood was taken before and 5 h after oral substitution of 10 mg vitamin K (Konakion® N Dragee, Hoffmann-La Roche) at the expected peak values for vitamin K and vitamin KO concentrations (Vermeer, pers. communication). Encapsulated form was chosen to allow for easy application and standardized dosage. Blood was centrifuged and aliquoted portions of 1 ml serum were stored frozen at -70°C . Measurement of vitamin K and vitamin KO levels were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method of Thijssen and Drijt-Reijnders (18).

Molecular Analysis of the γ -glutamyl Carboxylase Gene

The 15 exons and their flanking regions of the γ -glutamyl carboxylase gene were screened for mutations using primers and PCR conditions indicated in Table 1. Both strands of the PCR templates were sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method and the sequenase 2.0 DNA sequencing kit (US Biochemical).

Haplotypes of the γ -glutamyl carboxylase gene were constructed using two polymorphisms in exon 8 at nt8762 (Arg[CGA]325Gln[CAA]) and in exon 9 at nt9167 (Arg[CGT]406Arg[CGC]) that have been described by Wu et al (17). Additionally, two novel polymorphic sites in the γ -glutamyl carboxylase gene that were detected in the families during sequence analysis were included. These polymorphic sites were located in exon 7 at nt7980 (Gly[GGC]379 Gly[GGA]) and in exon 9 at nt9191 (Pro[ACC]414 Pro[ACT]), respectively. All four polymorphic sites were investigated by PCR and direct sequence analysis.

Results

Clinical Presentation

Family A is of Libanese origin. Pedigree analysis (Fig. 1A) revealed consanguinity of the parents (first degree cousins). Eight children, seven female and one male, born between 1981 and 1997 are alive. Two children have died, one on day 3 after birth because of an intracerebral haemorrhage and one during the first year of life. Four children (A5, A6, A8 and A10) had experienced severe bleedings in the past. Two of them (A6 and A8) had been transfused with blood components. Patient A5 had received a ventriculoperitoneal shunt after the occurrence of an intracerebral bleed. In the last born boy, a hydrocephalus internus was diagnosed by ultrasonography as a result of an intracerebral bleeding at the beginning of the third trimester of gestation. A ventriculoperitoneal shunt has been implanted directly after birth. Today the boy is suffering from severe mental and physical retardation associated with blindness and epilepsy. No clinical abnormalities apart from those caused by the bleedings were present in any of the affected offspring.

Family B is of German origin. Pedigree analysis and family questionnaire showed no consanguinity. However, consanguinity cannot be ruled out since both maternal and paternal grandparents originate from closely neighbouring regions. The two female offspring were born in 1989 and 1993, respectively. After birth, the first born child (B3) developed a large cephal haematoma. At the age of five months a spastic paresis of the left body side was recognized. Further diagnosis revealed hydrocephalus internus caused by an intracerebral bleeding in the past. During the first years of life several episodes of epilepsy occurred. Mild mental and physical impairment is still present.

Levels of Vitamin K Dependent Coagulation Factors

The levels of the vitamin K dependent coagulation factors II, VII, IX, X and of Protein C are shown in Table 2A. The affected individuals from family A (A3, A5, A6, A8, A10) and family B (B3, B4) showed a mild deficiency of these coagulation factors ranging from 20% to 60% of normal. Patients A3 and B4 had not experienced any bleeding in the past and were assigned as being affected based only on their laboratory values. In all other members of both families, especially in the parents, who are expected to be heterozygous carriers of the disease allele, normal levels of the vitamin K dependent clotting factors were found. Pedigree data and consanguinity in at least one of the families suggest an autosomal recessive inheritance of the disorder.

As shown in Table 2B, the levels of all vitamin K dependent proteins could be completely corrected by oral substitution of vitamin K. Measurement was carried out in family A after substitution of 5 mg vitamin K during three subsequent days and in family B after substitution of 1 mg vitamin K every other day.

Molecular Analysis of the γ -glutamyl Carboxylase Gene

The phenotype of inherited combined deficiency of vitamin K dependent proteins may be caused either by a defect in the γ -glutamyl carboxylase enzyme or a defect in the vitamin K epoxide reductase (VKOR) complex. We decided to start our investigation with the molecular analysis of γ -glutamyl carboxylase gene because the phenotype in both families presented here was similar to that of the family with the reported missense mutation in the γ -glutamyl carboxylase gene (1) with respect to phenotype correction by oral substitution of vitamin K. The only family with a suggested defect in the VKOR-complex (2) showed only partial correction of the clotting factors by vitamin K substitution and also skeletal abnormalities.

Table 2 A Vitamin K dependent factor levels in affected (bold) and non-affected members of families A and B. Family structure is shown in Figures 1A and 1B

(normal range)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	B1	B2	B3	B4
II:C (70-130 U/dl)	114	127	63	103	40	59	88	42	105	79*	88	93	45	44
VII:C (70-130 U/dl)	97	102	47	76	20	55	98	45	79	62*	81	144	29	42
IX:C (70-130 U/dl)	125	120	66	142	52	99	91	40	111	51*	116	137	55	51
X:C (70-130 U/dl)	140	135	40	123	24	49	97	32	116	56*	111	140	33	30
PC:C (70-130 U/dl)	109	n.d.	56	112	61	80	101	43	n.d.	n.d.	91	113	60	55

*= Measured 3-7 days after substitution of Vitamin K, basic coagulation factor levels were not available.
n.d. = not determined

All 15 exons with their flanking intron regions of the γ -glutamyl carboxylase gene were amplified by PCR and directly sequenced in at least one index patient of each family. No causative mutation could be found in the affected probands.

Since a genetic defect in the non-coding region of the γ -glutamyl carboxylase gene could not be excluded, haplotypes of the γ -glutamyl carboxylase gene were constructed to ascertain whether the phenotype in the families is segregating with one allele of the γ -glutamyl carboxylase gene.

For haplotype analysis, we investigated two known polymorphisms (exon 8 at nt8762 Arg[CGA]325Gln[CAA] and exon 9 at nt9167 Arg[CGT]406Arg[CGC]) that have been described previously by Wu et al (17) and two novel polymorphisms (exon 7 at nt7980 Gly[GGC]379 Gly[GGA] and exon 9 at nt9191 Pro[ACC]414 Pro[ACT]) that were detected in our study. As shown in Figs. 1A and 1B there is no single haplotype segregating with the normal or the disease phenotype, thus arguing against the gene locus of the γ -glutamyl carboxylase being causative for the disorder in both families.

Plasma Levels of Vitamin K and Vitamin KO

The finding of a normal γ -glutamyl carboxylase gene in both families points to a defect in a protein of the VKOR-complex. To prove this hypothesis, affected and normal subjects of both families were supple-

Table 2 B Vitamin K dependent factor levels in affected individuals 1 day after oral substitution of 5 mg (A5, A6, A8) and 1 mg (B3) Vitamin K, respectively

(normal range)	A5	A6	A8	B3
II:C (70-130 U/dl)	86	110	96	104
VII:C (70-130 U/dl)	77	107	101	90
IX:C (70-130 U/dl)	135	140	110	87
X:C (70-130 U/dl)	91	138	99	85
PC:C (70-130 U/dl)	n.d.	n.d.	n.d.	66

n.d. = not determined

mented with 10 mg vitamin K1. Blood was taken before and 5 h after oral drug intake at the expected maximum of plasma vitamin K and KO levels. The results are shown in Table 3. While vitamin KO is normally undetectable in serum, all tested individuals of both families with the disease phenotype showed highly increased vitamin KO levels ranging from 19.5 ng/ml to 59.7 ng/ml in family A and from 38.6 ng/ml to 66.2 ng/ml in family B. The vitamin K/KO ratio that includes the information on the vitamin K levels ranged between 2.4 and 4.3 in family A and 7.4 and 10.6 in family B. Vitamin KO could not be detected in the non-affected individuals of families A and B with the exception of individual B2 who exhibited a very low vitamin KO level (VK/VKO ratio 119.3). These findings indicate that a defect of the VKOR-complex is likely to be causative for the deficiency of all vitamin K dependent proteins in both families. These families therefore represent the second and

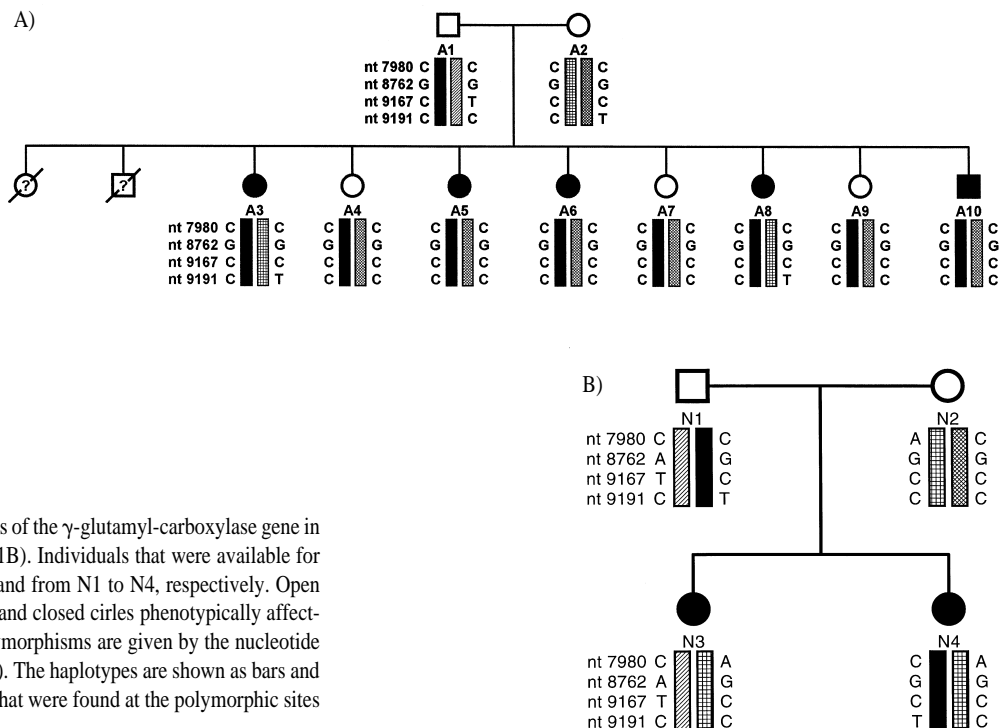


Fig. 1 Haplotype analysis of the alleles of the γ -glutamyl-carboxylase gene in family A (Fig. 1A) and family B (Fig. 1B). Individuals that were available for testing are numbered from A1 to A10 and from N1 to N4, respectively. Open circles indicate phenotypically healthy and closed circles phenotypically affected individuals. The position of the polymorphisms are given by the nucleotide (nt) numbers according to Wu et al. (17). The haplotypes are shown as bars and were constructed from the nucleotides that were found at the polymorphic sites by sequencing

Table 3 Serum concentrations of Vitamin K (VK) and Vitamin K epoxide (VKO) before and 5 h after oral substitution of a 10 mg vitamin K dragee. Affected individuals are indicated with bold letters. The detection limit of VKO is 0.05 ng/ml

	basal serum concentrations (ng/ml)		serum concentrations (ng/ml) 5 h after oral substitution of 10 mg vitamin K		
	VK	VKO	VK	VKO	VK / VKO
A4	0.4	< 0.05	201.8	< 0.05	> 1000
A5	0.4	< 0.05	84.6	19.5	4.3
A6	0.6	< 0.05	219.6	52.6	4.2
A7	0.4	< 0.05	262.5	< 0.05	> 1000
A8	n.d.	n.d.	147.0	59.7	2.5
A9	n.d.	n.d.	607.3	< 0.05	> 1000
B1	0.5	< 0.05	112.5	< 0.05	> 1000
B2	0.5	< 0.05	310.3	2.6	119.3
B3	0.7	< 0.05	490.4	66.2	7.4
B4	0.4	< 0.05	410.7	38.6	10.6

n.d. = not determined.

the third kindreds in whom a defect in the VKOR-complex is suggested to cause this rare coagulation disorder.

Discussion

Variation of Phenotypes and Underlying Genetic Defects

The present study offers a detailed description of the phenotypes of two unrelated families with a combined hereditary deficiency of the vitamin K dependent coagulation factors. Molecular genetic and laboratory findings point to a defect in a protein of the VKOR complex that cause the disease phenotype in both of the families. Involvement of the γ -glutamyl carboxylase gene seems unlikely because neither a mutation in the coding sequence nor a single haplotype of this gene are cosegregating with the disease phenotype. However, the strongest argument for a defect in a protein of the VKOR-complex is given by the high vitamin K epoxid level in the affected individuals of both families.

So far only eleven kindreds with a combined deficiency of vitamin K dependent coagulation factors have been reported in the literature. Some important characteristics of these families are compared to our two kindreds in Table 4.

Such rare disorders with suggested autosomal recessive inheritance, occur predominantly in families with consanguineous marriage. However, only in two of the previously published families consanguinity is known (1, 11). In our family of Lebanese origin consanguinity most likely contributes to the manifestation of the disease. In our second family we found no relation between the parental family branches, but,

all grandparents came from a restricted local area. Therefore a founder mutation may be present. However, two different mutations in the parents and compound heterozygosity in the offsprings may also explain this condition.

The degree of deficiency of vitamin K dependent coagulation proteins varies considerably from very severe forms with activity levels of less than 5% to very mild forms, as in our families, with activity levels ranging from 20% to 60% (Table 4). Interestingly, in some of the families the coagulation factor deficiencies could be completely corrected by oral substitution of vitamin K whereas other families showed only partial or no response.

So far, in three of the families with a moderate to severe deficiency of coagulation factors (2, 9, 11) skeletal abnormalities were associated with the combined decrease of vitamin K dependent proteins (Table 4). These skeletal abnormalities comprised irregular ossification, nasal hypoplasia, distal digital hypoplasia and mild conductive hearing loss, thus resembling the phenotype of warfarin embryopathy. In contrast, none of the four families with a milder form of the disease showed skeletal abnormalities. Although the phenotype may result from a primary pharmacological effect of coumarine derivatives, the report of Pauli et al. (1987) provided evidence that warfarin embryopathy is secondary to the pharmacological effect of warfarin, e. g. inhibition of the VKOR.

Only in two of the previously published families some details of the pathomechanism were discussed. Pauli et al. (2) found increased plasma levels of vitamin K epoxide in the affected proband that point to a defect in the VKOR-protein-complex. Brenner et al (1) showed that a missense mutation within the γ -glutamyl carboxylase gene was causative for the disease phenotype. Both families exhibited a moderate decrease of coagulation factor levels that was associated with skeletal abnormalities in case of the family with a putative defect of the VKOR

Molecular analysis of the γ -glutamyl carboxylase gene and increased vitamin K epoxide levels in the affected probands in both of our families point to a defect in the VKOR causing mild deficiency of all vitamin K dependent coagulation proteins. Thus, the families reported herein represent the second and third families with a suggested defect in the VKOR. Purification and isolation of the VKOR enzyme has been attempted by several groups without success for many years. It now seems that the VKOR represents a multienzyme complex and that purification procedures destroy the protein integrity of this complex and subsequently the VKOR enzyme activity. According to a hypothetical model, the VKOR-complex consists at least of the transmembraneous microsomal epoxide-hydrolase and a further protein originating from the glutathion-S-transferase super family (19, 20). In the two families reported herein we expect a molecular defect in one of these proteins.

Reference	Consanguinity	Degree of deficiency	Correction by vitamin K	Skeletal abnormalities	Cause of Phenotype
Fischer and Zweymuller 1966	n.k.	severe	partially	n.k.	n.k.
Chung et al. 1979, includes [22]	no	severe	partially	no	n.k.
Johnson et al. 1980	no	mild	no	no	n.k.
Goldsmith et al. 1982	no	mild	yes	no	n.k.
Vincente et al. 1984	no	severe	no	no	n.k.
Ekelund et al. 1986	n.k.	severe	no	no	n.k.
Pauli et al. 1987, includes [23]	no	moderate	partially	yes	VKOR
Leonard et al. 1988	n.k.	n.k.	n.k.	yes	n.k.
Pechlaner et al. 1992	no	mild	n.k.	no	n.k.
Boneh and Bar-Ziv 1996	yes	moderate	yes	yes	n.k.
Brenner et al. 1998, includes [12]	yes	moderate	yes	no	Carboxylase
present study	yes	mild	yes	no	VKOR
present study	(no)	mild	yes	no	VKOR

Table 4 Phenotype characteristics of published families with a combined deficiency of vitamin K dependent coagulation factors

VKOR=Vitamin K epoxidase reductase, n. k. = not known or information not given.

Clinical Aspects

The genetic disorder in both of our families became clinically apparent by severe or even fatal perinatal intracerebral bleedings. Severe bleeding at birth is known to be associated with acquired conditions of combined deficiency of vitamin K dependent coagulation factors. A hereditary cause is suggested to be extremely rare and may be masked if vitamin K substitution leads to a temporary normalisation of coagulation factors. Mild reduction of vitamin K dependent coagulation factors, as it was present in our families, may also complicate diagnosis.

Another aspect of clinical relevance is the question of vitamin K substitution in the affected individuals. The deficiency of coagulation factors is only mild and silent during every day life. However, there may be two arguments for a regular substitution of vitamin K:

i) Bleeding complications, predominantly induced by trauma, might occur at a similar frequency as during oral anticoagulant therapy. Risk of bleeding could be completely prevented by substitution of vitamin K.

ii) In the previously published family with a defect in the VKOR (2) additional symptoms of skeletal abnormalities could be found. Recently, Masciotte et al (21) reported a decreased bone mineralisation in children receiving long term oral anticoagulation therapy. In our families no skeletal abnormalities were clinically obvious. Nevertheless, it may be safe to substitute vitamin K in order to minimize risk of mineralisation deficits in the growing children.

In conclusion the present study reports the second and third families with a suggested defect in a protein of the VKOR multienzyme complex. Future genetic analysis of these and further families with similar phenotypes by means of homozygosity mapping and analysis of candidate genes may be useful towards the identification of the causative gene defects and lead to a better understanding of the vitamin K pathway.

Addendum

J. Oldenburg founded the concept of the study, organized the experimental work and wrote the manuscript. B. v. Brederlow, A. Fregin, S. Rost and W. Wolz have performed the molecular genetic experiments on sequencing and haplotyping of the γ -glutamyl carboxylase gene in the two families. W. Eberl, S. Eberl and E. Lenz discovered family B and provided all clinical and laboratory data of this family. Schwaab, HH. Brackmann, W. Effenberger and H. Harbrecht discovered family A and contributed detailed clinical and laboratory information. C. Vermeer and L.J. Schurgers performed measurements of vitamin K1 and vitamin K epoxide levels. CR Müller provided the laboratory infrastructure and contributed substantially to the writing of the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by grants of the Stiftung Hämotherapie-Forschung, the Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung and the DFG (OI 100/3-1) to J.O. and C.R.M.

References

- Brenner B, Sanchez-Vega B, Wu SM, Lanir N, Stafford DW, Solera J. A missense mutation in γ -glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood* 1998; 92: 4554-9.
- Pauli RM, Lian JB, Mosher DF, Suttie JW. Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the pheno-

- type of the warfarin embryopathy: Clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives. *Am J Hum Genet* 1987; 41: 566-83.
- Fischer M, Zweymüller E. Kongenitaler kombinierter Mangel der Faktoren II, VIII und X. *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 1966; 95: 309-23.
- Chung KS, Bezeaud A, Goldsmith JC, McMillan CW, Menache D, Roberts HR. Congenital deficiency of blood clotting factors II, VII, IX and X. *Blood* 1979; 53: 776-87.
- Johnson CA, Chung KS, McGrath KM, Bean PE, Roberts HR. Characterization of a variant prothrombin in a patient congenitally deficient in factors II, VII, IX and X. *Br J Haematol* 1980; 44: 461-9.
- Goldsmith GH Jr, Pence RE, Ratnoff OD, Adelstein DJ, Furie B. Studies on a family with combined functional deficiencies of vitamin K-dependent coagulation factors. *J Clin Invest* 1982; 69: 1253-60.
- Vincente V, Maia R, Alberca I, Tamagnini GPT, Lopez Borrasca A. Congenital deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors and protein C. *Thromb Haemost* 1984; 51: 343-6.
- Ekelund H, Lindeberg L, Wranne L. Combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X: A case of probable congenital origin. *Ped Hematol Oncol* 1986; 3: 187-93.
- Leonard CO. Vitamin K responsive bleeding disorder: A genocopy of the warfarin embryopathy. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center* 1988; 7: 165-6.
- Pechlaner C, Vogel W, Erhart R, Pümpel E, Kunz F. A new case of combined deficiency of vitamin K dependent coagulation factors. *Thromb Haemost* 1992; 68: 617.
- Boneh A, Bar-Ziv J. Hereditary deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors with skeletal abnormalities. *Am J Med Gen* 1996; 65: 241-3.
- Brenner B, Tavori S, Zivelin A, Keller CB, Suttie JW, Tatarsky I, Seligsohn U. Hereditary deficiency of all vitamin K-dependent procoagulants and anticoagulants. *Br J Haematol* 1990; 75: 537-42.
- Hauschka PC, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69: 990-1047.
- Sperling R, Furie BC, Blumenstein M, Keyt B, Furie B. Metal binding properties of γ -carboxyglutamic acid. *J Biol Chem* 1978; 253:3898-906.
- Kuo WL, Stafford DW, Cruces J, Gray J, Solera J. Chromosomal localization of gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12. *Genomics* 1994; 25: 746.
- WU SM, Cheung WF, Frazier D, Stafford DW. Cloning and expression of the cDNA for human γ -glutamyl carboxylase. *Science* 1991; 254:1634-6.
- WU SM, Stafford DW, Frazier D, Fu YY, High KA, Chu K, Sanchez-Vega B, Solera J. Genomic sequence and transcription start site for the human γ -glutamyl carboxylase. *Blood* 1997; 89: 4058-62.
- Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K metabolism and vitamin K1 status in human liver samples: a search for inter-individual differences in warfarin sensitivity. *Br J Haematol* 1993; 84: 681-5.
- Cain D, Hutson SM, Wallin R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 1997; 272: 29068-75.
- Guenther TM, Cai D, Wallin R. Co-purification of microsomal epoxide hydrolase with the warfarin-sensitive vitamin K1 oxide reductase of the vitamin K cycle. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 169-75.
- Masciotte P, Julian J, Webber C, Charpentier K. Osteoporosis: A potential complication of longterm warfarin therapy (abstract). *Thromb Haemost* 1999 (Suppl): 422.
- McMillan CW, Roberts HR. Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. *N Engl J Med* 1966; 274: 1313-5.
- Hall JG, Pauli RM, Wilson KM. Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy. *Am J Med* 1980; 68: 122-40.

Received March 23, 2000 Accepted after resubmission August 3, 2000

7.2 Anlage 2

Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood*.

Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K–dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16

Andreas Fregin, Simone Rost, Werner Wolz, Alice Krebsova, Clemens R. Muller, and Johannes Oldenburg

Familial multiple coagulation factor deficiency (FMFD) of factors II, VII, IX, X, protein C, and protein S is a very rare bleeding disorder with autosomal recessive inheritance. The phenotypic presentation is variable with respect to the residual activities of the affected proteins, its response to oral administration of vitamin K, and to the involvement of skeletal abnormalities. The disease may result either from a defective resorption/transport of vitamin K to the liver, or from a mutation in one of the genes encoding γ -carboxylase or other proteins of the vitamin K cycle. We have recently pre-

sented clinical details of a Lebanese family and a German family with 10 and 4 individuals, respectively, where we proposed autosomal recessive inheritance of the FMFD phenotype. Biochemical investigations of vitamin K components in patients' serum showed a significantly increased level of vitamin K epoxide, thus suggesting a defect in one of the subunits of the vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) complex. We now have performed a genome-wide linkage analysis and found significant linkage of FMFD to chromosome 16. A total maximum 2-point LOD score of 3.4 at $\theta = 0$ was

obtained in the interval between markers D16S3131 on 16p12 and D16S419 on 16q21. In both families, patients were autozygous for 26 and 28 markers, respectively, in an interval of 3 centimorgans (cM). Assuming that FMFD and warfarin resistance are allelic, conserved synteny between human and mouse linkage groups would restrict the candidate gene interval to the centromeric region of the short arm of chromosome 16. (Blood. 2002;100:3229-3232)

© 2002 by The American Society of Hematology

Introduction

Familial multiple coagulation factor deficiency (FMFD, MIM #277450) is a very rare bleeding disorder, with 14 cases described as yet.¹⁻¹³ Clinical symptoms of the disease are episodes of intracerebral hemorrhage in the first weeks of life sometimes leading to a fatal outcome. Deficiency of all vitamin K–dependent clotting factors leads to a bleeding tendency which is usually completely reversed with oral administration of vitamin K. The disease can be caused by intestinal malabsorption of vitamin K,¹⁴ mutations in the γ -glutamyl carboxylase (reported in 2 kindreds^{11,12}), or functional deficiency of the multiprotein complex vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) (reported in 3 kindreds^{7,13}). The pathomechanism of FMFD is based on a reduced hepatic γ -carboxylation of glutamic acid residues of all vitamin K–dependent blood coagulation factors. A number of proteins, such as the procoagulant factors II, VII, IX, and X, the anticoagulant factors protein C, protein S, and nonhemostatic proteins such as matrix gla protein and osteocalcin are subjected to γ -carboxylation.¹⁵ This posttranslational modification enables the calcium-dependent attachment of the modified proteins to the phospholipid bilayer of membranes,^{16,17} which is an essential prerequisite for the mechanism of blood coagulation. Vitamin K1 acts as a cofactor for the vitamin K–dependent carboxylase (γ -glutamyl carboxylase) in liver microsomes.^{18,19} Gamma-carboxylation of Glu-residues is coupled to the stoichiometric formation of

vitamin K 2,3-epoxide.²⁰ The regeneration of the active cofactor vitamin K1 hydroquinone (vitamin K1H₂) is mediated in the vitamin K cycle by either one of 2 pathways. The flavoprotein DT-diaphorase (*NMOR1*, EC 1.6.99.2) reduces only the quinone form²¹ and is of minor importance under physiologic conditions, whereas the multiprotein complex VKOR is capable of reducing the quinone as well as the epoxide form of vitamin K1.²² Cain et al²⁰ presented evidence that a yet unknown member of the glutathione S-transferase (GST) gene family associates with microsomal epoxide hydrolase (*EPHX1*, EC 3.3.2.3) and γ -carboxylase in the endoplasmic reticulum membrane to form the VKOR complex. This complex is the target of warfarin, which is used as an important anticoagulant to prevent thrombosis²³ and in rodent pest control.²⁴ Resistance to warfarin has been reported in mice,²⁵ rats,²⁶ and humans.²⁷⁻²⁹ Resistance seems to be caused by an autosomal dominant mutant allele of vitamin K reductase which either displays a decreased affinity for the coumarin drugs or an increased affinity for vitamin K.

We have recently described 2 pedigrees showing an autosomal recessive transmission of FMFD.¹³ The presence of mutations in γ -glutamyl carboxylase, microsomal epoxide hydrolase, and DT-diaphorase was excluded by sequencing the coding regions of the corresponding genes. Biochemical investigations clearly showed an elevated ratio of vitamin K epoxide/vitamin K hydroquinone in

From the Institut für Humangenetik Universität Würzburg Biozentrum, Würzburg, Germany; the Gene Mapping Centre, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany; the Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Bonn, Germany; and the Institute of Transfusion Medicine and Immune Haematology of the DRK Blood Donor Service, Frankfurt, Germany.

Submitted March 7, 2002; accepted May 12, 2002. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, July 5, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-03-0698.

Supported by grants of the DFG (Ol 100/3-1), Baxter Germany, the Stiftung Hämotherapie-Forschung, and the Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung. The Gene Mapping Centre was supported by a grant-in-

aid from the German Genome Project.

A.F., S.R., and W.W. contributed equally to this work.

Reprints: Johannes Oldenburg, Institute of Transfusion Medicine and Immune Haematology of the DRK Blood Donor Service, Sandhofstr 1, 60526 Frankfurt, Germany; e-mail: joldenburg@bsdhessen.de.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2002 by The American Society of Hematology

affected individuals, which implicates an impaired recycling of the cofactor of γ -glutamyl carboxylation.

In the present study, we performed a genome-wide linkage analysis for the *FMFD* locus in 2 affected pedigrees. As consanguinity was known to occur in one of the families, homozygosity mapping could be used to narrow down the candidate gene region.

Patients, materials, and methods

Patients

Clinical aspects of the 2 nonrelated families suffering from congenital deficiency of all vitamin K-dependent coagulation factors have been described elsewhere.¹³ Figure 2A depicts an abridged pedigree of family A, which is a consanguineous kindred of Lebanese origin with 8 children alive. There were 2 further children (not shown) who died, one on day 3 after birth from intracerebral hemorrhage, and one during the first year of life. There are 4 children (II:3, II:4, II:6, II:8) who experienced severe bleedings in the past. To the best of our knowledge, no consanguinity was present in family B (Figure 2B), which is of German origin. However, distant consanguinity cannot be ruled out since both maternal and paternal grandparents originate from neighboring villages. Hydrocephalus internus caused by intracranial bleeding was diagnosed in the first child (II:1).

The coagulation factor status of family members was determined by measuring the activity of vitamin K-dependent clotting factors II, VII, IX, and X and determination of vitamin K1H₂ and vitamin K 2,3-epoxide.¹³ All affected individuals from both families showed a mild deficiency of the vitamin K-dependent coagulation factors ranging from 20% to 60%. Vitamin K 2,3-epoxide levels of 19.5 ng/mL to 66.2 ng/mL after oral administration of 10 mg vitamin K clearly indicate a defect in one of the proteins of the VKOR complex. Normal levels of vitamin K-dependent clotting factors and vitamin KO were found in all unaffected members of both families, including the parents, who are expected to be heterozygous carriers of the putative disease alleles.

Sequence analysis

Mutation screening was performed by direct sequencing of the candidate genes. In both families, we examined 8 exons and their flanking regions of *microsomal epoxide hydrolase 1* as well as the promoter sequence, and 6 exons and their flanking regions of *NAD(P)H:menadiione oxidoreductase 1* (*NMOR1*, also known as *DT-diaphorase* or *cytochrome b5 reductase*). Mutations in the γ -glutamyl carboxylase gene had already been excluded in a previous report.¹³ Both strands of the polymerase chain reaction (PCR) templates were sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method and the thermo sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit (USB Corporation).

Genotype analysis

Blood samples were collected after obtaining informed consent and genomic DNA was extracted by standard procedures. A genome-wide scan, based on 374 microsatellite markers with an average spacing of 11 cM, was performed on family A at the Max Delbrück Center, Berlin, Germany. Markers were amplified by PCR in a final reaction volume of 10 μ L containing 10 mM Tris, 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M each dNTP, 0.4 U DNA polymerase (Invitex, Berlin, Germany), 7 pmol of each primer, and 20 ng genomic DNA. One of the primers was end-labeled with fluorescent dye. Pooled products were electrophoresed on ABI PRISM 377 automated DNA sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA). Further fine mapping with an additional 54 microsatellites from the pericentromeric region of chromosome 16 was performed in both families. PCR was performed in 25 μ L reactions containing 100 ng genomic DNA, 20 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0% to 4% formamide, 0% to 20% betaine, 1.25 U *Taq* DNA polymerase ([Gibco] Invitrogen, Carlsbad, CA), 200 μ M dNTPs, and 1.0 μ Ci (0.037 MBq) α [³²P]-dCTP. Alleles were resolved on 6% denaturing sequencing gels. After drying, the gels were exposed to Retina x-ray films overnight at room temperature (Retina, Berlin, Germany).

Linkage analysis

Microsatellite data from the whole-genome scan were analyzed using the computer programs GENESCAN v3.0 and GENOTYPER v2.5 (Applied Biosystems). For the calculation of multipoint logarithmic odds (LOD) scores GENEHUNTER 2.0³⁰ was used, while 2-point LOD scores were calculated using the MLINK program of the LINKAGE package 5.20³¹ in the FASTLINK 4.0P implementation.³² Inheritance of the disease was assumed to be autosomal recessive with complete penetrance. According to the low incidence of the disease, the frequency of the disease allele was set to 0.0001. For simplicity, marker allele frequencies were assumed to be equal. Markers in Figure 1 were arranged according to the Genethon microsatellite map.³³ Marker orders in Figure 2 correspond to the current order in the gmap section of the Genetic Location Database (last updated March 2001).

Results

Before starting a genome-wide scan for linkage in the Lebanese family (family A, Figure 2A), we scanned potential candidate genes for FMFD for mutations by direct sequencing. Potential candidate loci for this disease are (1) *microsomal epoxide hydrolase 1* on chromosome 1q42.1, (2) γ -glutamyl carboxylase on chromosome 2p1.2, and (3) *NAD(P)H:menadiione oxidoreductase 1* (*NMOR1*, aka *DT-diaphorase* or *cytochrome b5 reductase*) located on chromosome 16q22.1. Sequence analysis of the promoter and coding regions of these genes revealed no mutations in both families.

A whole-genome linkage analysis of the FMFD locus in family A yielded a multipoint LOD score of 2.78 at $\theta = 0$ for marker D16S415 (Figure 1) indicating location of the FMFD locus in the centromeric region of chromosome 16. The interval with the highest likelihood of harboring the FMFD gene was confined by the markers D16S3131 and D16S419. Fine mapping studies using additional markers (Figure 2A-B) confirmed linkage to this interval in both families, with family B adding another 0.61 LOD scores. In both kindreds all affected individuals share a common region of homozygosity in the pericentromeric region of chromosome 16. Haplotyping allowed the reconstruction of recombination events which define the FMFD candidate gene region. The upper boundary of the critical region is determined by a recombination event in patient A II:3 between D16S3131 and D16S261 while the lower boundary is delimited by a recombination event between D16S409 and D16S419 in patient A II:8 (Figure 2A). These recombination events demarcate a region of homozygosity of approximately

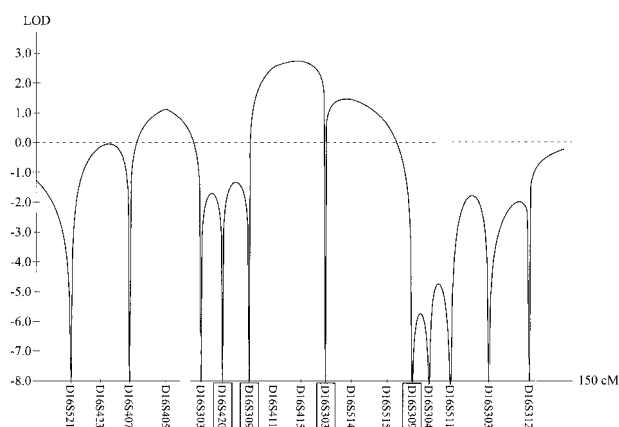
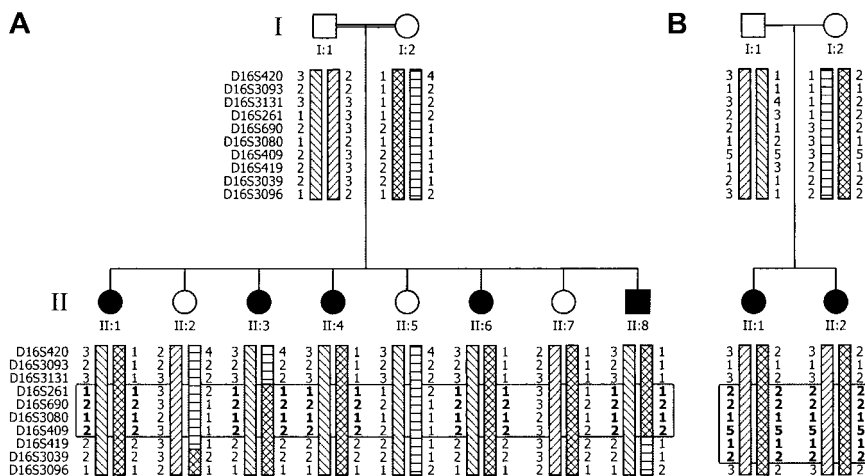


Figure 1. Results of the initial genome scan for chromosome 16. Multipoint LOD scores of the FMFD phenotype in family A (see Figure 2A) were calculated with GENEHUNTER 3.0 and plotted against the Genethon microsatellite map. Markers highlighted with boxes represent backbone markers, which are also shown in Figure 2.

Figure 2. Pedigrees of FMFD families with informative haplotypes from selected markers. For clarity, only a subset of additional markers between the backbone markers of Figure 1 is shown. The open rectangle demarcates the candidate gene region, which comprises only homozygous markers. Markers in the rectangle, presumably inherited identical by descent (IBD), are denoted in bold. The 4 parenteral haplotypes are indicated by the various box patterns. Combination of 2 box patterns in one haplotype indicates a recombination event. Family A (panel A) is of Lebanese origin; the parents are first-degree cousins. Haplotype analysis implies a heterozygous carrier state for individuals II:5 and II:7. However, this cannot be proven since the biochemical assay does not differentiate between wild-type and heterozygous carrier. The nuclear family B (panel B) originates in Germany and parents claim to be not related, although their ancestors lived in neighboring villages.



3 centimorgans (cM) containing 26 homozygous markers (for clarity only some of them are shown in Figure 2). No recombination was observed in family B but an extended overlapping area of homozygosity is apparent from the haplotypes (Figure 2B). Combined 2-point LOD scores for both families are shown in Table 1; a maximum LOD of 3.4 was reached with marker D16S261 at $\theta = 0$, implying significant linkage.

Haplotype analysis provided additional evidence against the potential candidate gene *NAD(P)H:menadiione oxidoreductase 1. NMOR 1* is located between markers D16S514 and D16S515 and microsatellite analysis revealed heterozygosity for these markers in the severely affected individual II:8 (data not shown). Therefore, we were able to exclude mutations in potential *cis*-regulatory elements in the surrounding regions of *NMOR1*.

The presence of an identical haplotype for the interval between D16S261 and D16S419 in the parents of family B (Figure 2B) suggests that these chromosomal segments are identical by descent (IBD) and that the parents are likewise related. An association by chance of the alleles of 26 markers spanning a genetic distance of at least 3 cM is extremely unlikely.³⁴

Discussion

We have assigned a second gene for hereditary combined multiple coagulation factor deficiency (FMFD) to chromosome 16p12-q21 after exclusion of several other potential candidate genes. Homozy-

gosity mapping revealed the pericentromeric region of chromosome 16 as the most likely location of this hereditary bleeding disorder. Missense mutations in another gene involved in γ -carboxylation, namely *γ -glutamyl carboxylase*, have already been described.^{11,12} Cain et al²⁰ suggested that a warfarin-sensitive member of the glutathione-S-transferase (GST) superfamily of proteins is a component of the multienzyme complex VKOR. We have scanned several available gene maps, based on the current working draft (July 2001) of the human genome. Among the approximately 300 annotated genes in the candidate region no novel GST family member has been predicted so far, but presumably there are a number of gaps in the current working draft due to large and complex duplications of genomic material on 16p.³⁵ It is conceivable that mutations in the gene for this unknown GST enzyme would also lead to symptoms comparable to multiple congenital coagulation factor deficiency. It remains to be established whether the FMFD phenotype in the families we studied is based on gene mutations in a still unknown GST or another currently unknown gene product which is involved in vitamin K recycling.

A phenotype related to human coagulation factor deficiency has been described in rats and mice as resistance to the anticoagulant drug warfarin. The genes responsible for warfarin resistance have been mapped in mice (*war*) to chromosome 7 at a position of 62.5 cM from pter (mouse genome informatics) and in rats (*Rw*) to chromosome 1q35-42. Chromosome 7 of mouse and chromosome 1 of rat share extensive areas of synteny (Mouse to Rat Homology Data; see "Appendix"). Fine mapping studies for *Rw* performed by Kohn and

Table 1. Values for 2-point LOD score

Order	Comp	McM	FcM	Logarithm of the odds (LOD score)						
				$\theta = 0$	$\theta = .01$	$\theta = .05$	$\theta = .1$	$\theta = .2$	$\theta = .3$	$\theta = .4$
D16S420	31 130	51.65	43.44	-infini	1.32	1.75	1.71	1.31	0.77	0.25
D16S3093	36 625	52.51	52.12	-infini	-0.74	-0.11	0.09	0.18	0.13	0.04
D16S3131	37 256	52.61	53.17	-infini	-0.15	0.40	0.52	0.45	0.26	0.08
D16S261	40 460	53.69	64.17	3.39*	3.32*	3.03*	2.67	1.91	1.13	0.38
D16S690	52 906	53.69	65.97	3.39*	3.32*	3.03*	2.67	1.91	1.13	0.38
D16S3080	55 810	53.69	66.39	1.88	1.84	1.68	1.48	1.05	0.61	0.20
D16S409	62 310	53.69	67.33	3.08*	3.02*	2.77	2.45	1.78	1.06	0.36
D16S419	63 668	56.83	78.35	-infini	1.32	1.75	1.71	1.31	0.77	0.25
D16S3039	65 124	56.83	92.29	-infini	1.32	1.73	1.68	1.26	0.72	0.23
D16S3096	91 611	69.66	120.05	-infini	-1.39	-0.17	0.20	0.34	0.24	0.08

Values for 2-point LOD score (MLINK) for linkage between familial multiple coagulation factor deficiency (FMFD) and selected chromosome 16 markers based on the 2 families, obtained at different recombination fractions. Male and female map distances are given in centimorgans (McM and FcM, respectively). Comp refers to a composite location in megabases according to the LDB database.

* Indicates LOD scores greater than 3.0, providing an odds ratio of linkage versus free recombination of greater than 1000:1.

Pelz³⁶ revealed several homologous regions on human chromosomes 10q, 12q, and 16p11-13. Similarly, the Human to Mouse Homology Data (see "Appendix") predict homology of mouse chromosome 7 to human chromosomes 10, 11, 15, 16, and 19. The corresponding LOD scores for all these chromosomes (except for 16) in family A are clearly below -2 (data not shown), which excludes linkage of FMFD to these segments of the human genome. Several anchor loci flanking the locus for warfarin resistance, both in mouse and rat (ie, *interleukin 4 receptor*, *alpha (ILAR)*, and *sialophorin [SPN]*) are located on the short arm of human chromosome 16. Colocalization of FMFD in humans and warfarin resistance in mouse and rat on homologous chromosomal segments implies that both phenotypes may be allelic. The fact that a warfarin-sensitive GST is part of the VKOR complex provides further evidence for this notion.²⁰ Alterations in the warfarin binding site of the GST could lead to a phenotype of warfarin resistance, while alterations in another part of the enzyme (influencing the associated catalytic epoxide reductase component) would result in the FMFD phenotype with bleeding tendency due to a lack of recycled vitamin K₁H₂. Assuming a single gene for both phenotypes, mouse-human homology maps would restrict the candidate gene region to the short arm of chromosome 16. Alternatively, there may be 2 genes leading to FMFD and warfarin resistance, which are located on chromosome 16p12-q21.

Since warfarin is a widely used oral anticoagulant in humans and rodents, the isolation of the FMFD gene would be an important

step toward elucidation of the vitamin K cycle and associated abnormalities, including defects of the multienzyme complex vitamin K 2,3-epoxide reductase.

Acknowledgments

We thank A. Reis for the whole-genome scan data and A. Baumer for her invaluable help with preparing the manuscript.

Appendix: electronic database information

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim> (for FMFD [MIM #277 450])

Human to Mouse Homology Data, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology>

Mouse to Rat Homology Data, <http://gapp.gen.gu.se/index.html>

Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>

Order of markers (Genethon), http://www.genlink.wustl.edu/genethon_frame/chr16/

Order of markers (Marshfield), <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>

Order of markers (LDB), <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/pub/chrom16>

References

- McMillan CW, Roberts HR. Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. *N Engl J Med*. 1966;274:1313-1315.
- Fischer M, Zweymuller E. Kongenitaler Mangel der Faktoren II VIII und X. *Zeitschrift fuer Kinderheilkunde*. 1966;95:309-323.
- Johnson CA, Chung KS, McGrath KM, Bean PE, Roberts HR. Characterization of a variant prothrombin in a patient congenitally deficient in factors II, VII, IX and X. *Br J Haematol*. 1980;44:461-469.
- Goldsmith GH Jr, Pence RE, Ratnoff OD, Adelstein DJ, Furie B. Studies on a family with combined functional deficiencies of vitamin K-dependant coagulation factors. *J Clin Invest*. 1982;69:1253-1260.
- Vincente V, Maia R, Alberca I, Tamagnini GPT, Lopez Borrasca A. Congenital deficiency of vitamin K-dependant coagulation factors and Protein C. *Thromb Haemost*. 1984;51:343-346.
- Ekelund H, Lindeberg L, Wranne L. Combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X: a case of probable congenital origin. *Ped Hematol Oncol*. 1986;3:187-193.
- Pauli RM, Lian JB, Mosher DF, Suttie JW. Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin embryopathy: clues to the mechanisms of teratogenicity of coumarin derivatives. *Am J Hum Genet*. 1987;41:566-583.
- Leonard CO. Vitamin K responsive bleeding disorder: a genocopy of the warfarin embryopathy. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center*. 1988;7:165-166.
- Pechlaner C, Vogel W, Erhart R, Pümpel E, Kunz F. A new case of combined deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors. *Thromb Haemost*. 1992;68:617.
- Boneh A, Bar-Ziv J. Hereditary deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors with skeletal abnormalities. *Am J Med Genet*. 1996;65:241-243.
- Brenner B, Sánchez-Vega B, Wu SM, Lanir N, Stafford DW, Solera J. A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*. 1998;92:4554-4559.
- Spronk HM, Farah RA, Buchanan GR, Vermeer C, Soute BA. Novel mutation in the gamma-glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*. 2000;96:3650-3652.
- Oldenburg J, Brederlow B, Fregin A, et al. Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex. *Thromb Hemost*. 2000;84:937-941.
- Prentice CR. Acquired coagulation disorders. *Clin Haematol*. 1985;14:413-442.
- Suttie JW. Mechanism of action of vitamin K: synthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *CRC Crit Rev Biochem*. 1980;8:191-223.
- Esmon CT, Suttie JW, Jackson CM. The functional significance of vitamin K action: difference in phospholipid binding between unusual and abnormal prothrombin. *J Biol Chem*. 1975;250:4095-4099.
- Sperling R, Furie BC, Blumenstein M, Keyt B, Furie B. Metal binding properties of γ -carboxyglutamic acid: implication for the vitamin K-dependent blood coagulation proteins. *J Biol Chem*. 1978;253:3898-4906.
- Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. *Ann Rev Biochem*. 1985;54:459-477.
- Furie B, Furie C. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 1988;53:505-518.
- Cain D, Hutson SM, Wallin R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 1997;272:29068-29075.
- Wallin R, Gebhardt O, Prydz H. NAD(P)H dehydrogenase and its role in the vitamin K-dependent carboxylation reaction. *J Biochem*. 1978;169:95-101.
- Wallin R, Martin LF. Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver: effects of warfarin. *J Clin Invest*. 1985;76:1879-1884.
- Suttie JW. The biochemical basis of warfarin therapy. *Adv Exp Med Biol*. 1987;214:3-16.
- Jackson WB, Ashton AD, Delventhal K. Overview of anticoagulant rodenticide usage and resistance. In: Suttie JW, ed. *Current Advances in Vitamin K Research*. New York, NY: Elsevier; 1988:381-397.
- MacSwiney FJ, Wallace ME. A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *J Hyg*. 1976;76:173-181.
- Greaves JH, Ayres P. Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature*. 1967;215:877-878.
- O'Reilly RA, Aggeler PM, Silvija Hoag M, Leong LS, Kropatkin ML. Hereditary transmission of exceptional resistance to coumarin anticoagulant drugs: the first reported kindred. *N Engl J Med*. 1964;271:809-815.
- O'Reilly RA. The second reported kindred with hereditary resistance to oral anticoagulant drugs. *N Engl J Med*. 1970;282:1448-1451.
- Kereveur A, Leclercq M, Trossaert M, et al. Vitamin K metabolism in a patient resistant to vitamin K antagonists. *Haemostasis*. 1997;27:168-173.
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*. 1996;58:1347-1363.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:3443-3446.
- Cottingham RW Jr, Idury RM, Schaffer AA. Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet*. 1993;53:252-263.
- Dib C, Fauré S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996;380:152-154.
- Nila P, Anthony JB, Berno DA, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science*. 2001;294:1719-1723.
- Loftus BJ, Kim UJ, Sneddon VP, et al. Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q. *Genomics*. 1999;60:295-308.
- Kohn HK, Pelz HJ. A gene anchored map position of the rat warfarin-resistance locus, RW, and its orthologs in mice and humans. *Blood*. 2000;96:1996-1998.

7.3 Anlage 3

Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*.

Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2

Simone Rost^{1,2,*}, Andreas Fregin^{1*}, Vytautas Ivaskevicius³, Ernst Conzelmann⁴, Konstanze Hörtnagel², Hans-Joachim Pelz⁵, Knut Lappegard⁶, Erhard Seifried³, Inge Scharrer⁷, Edward G. D. Tuddenham⁸, Clemens R. Müller¹, Tim M. Strom^{2,9} & Johannes Oldenburg^{1,3}

¹Department of Human Genetics, University of Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany

²Institute of Human Genetics, GSF National Research Center, Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 München-Neuherberg, Germany

³Institute of Transfusion Medicine and Immune Haematology of the DRK Blood Donor Service, Sandhofstrasse 1, Johann Wolfgang Goethe-Universität, 60526 Frankfurt, Germany

⁴Department of Physiological Chemistry II, University of Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany

⁵Federal Biological Research Center for Agriculture and Forestry, Institute for Nematology and Vertebrate Research, Toppheideweg 88, 48161 Münster, Germany

⁶Department of Medicine, Nordland Hospital, 8092 Bodo, Norway

⁷Center of Internal Medicine, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, 60528 Frankfurt, Germany

⁸MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College, London W12 0NN, UK

⁹Institute of Human Genetics, Klinikum rechts der Isar, Technical University, 81675 München, Germany

* These authors contributed equally to this work

Coumarin derivatives such as warfarin represent the therapy of choice for the long-term treatment and prevention of thromboembolic events. Coumarins target blood coagulation by inhibiting the vitamin K epoxide reductase multiprotein complex (VKOR)¹. This complex recycles vitamin K 2,3-epoxide to vitamin K hydroquinone, a cofactor that is essential for the post-translational γ -carboxylation of several blood coagulation factors^{2,3}. Despite extensive efforts, the components of the VKOR complex have not been identified^{4–8}. The complex has been proposed to be involved in two heritable human diseases: combined deficiency of vitamin-K-dependent clotting factors type 2 (VKCFD2; Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 607473), and resistance to coumarin-type anticoagulant drugs (warfarin resistance, WR; OMIM 122700). Here we identify, by using linkage information from three species, the gene *vitamin K epoxide reductase complex subunit 1* (*VKORC1*), which encodes a small transmembrane protein of the endoplasmic reticulum. *VKORC1* contains missense mutations in both human disorders and in a warfarin-resistant rat strain. Overexpression of wild-type *VKORC1*, but not *VKORC1* carrying the VKCFD2 mutation, leads to a marked increase in VKOR activity, which is sensitive to warfarin inhibition.

We previously mapped the locus for VKCFD2 to a 20-megabase (Mb) region on chromosome 16p12–q21 (ref. 9). We noted that a linkage group of genes on 16p11 is orthologous to genes around the warfarin resistance loci *Rw* in rats^{10,11} and *War* in mice¹². This homology led us to propose that VKCFD2 and warfarin resistance may be caused by allelic mutations in the same gene. If so, this would narrow down the critical interval in humans to a region of roughly 4.0 Mb on the short arm of chromosome 16. According to the human genome assembly (build 33, April 2003), this region contains 129 Ensembl genes with roughly 1,100 exons (<http://www.ensembl.org/>).

Using genomic DNA from two VKCFD2 and four WR probands, we carried out a systematic mutation screen by directly sequencing genes from this region and found missense mutations in a gene of

unknown function in all investigated VKCFD2 and WR probands (Fig. 1). This gene (IMAGE3455200) extends over a genomic region of 5,126 base pairs (bp) and comprises three exons encoding a protein of 163 amino acids with a calculated relative molecular mass of 18,000 (M_r 18K). Both non-related VKCFD2 index patients and their affected siblings carried the same homozygous point mutation in the third exon (292C \rightarrow T), whereas the parents were found to be heterozygous (Fig. 1). The mutation caused the replacement of Arg 98 by tryptophan. The families were of Lebanese and German origin. Their haplotypes in the region of homozygosity encompassing the mutated gene were different. Furthermore, cytosine 292 is part of a CpG dinucleotide, which is a known mutation hotspot. Thus, the two mutations most probably arose independently.

Four different heterozygous mutations were detected in the individuals with WR, as expected for the autosomal dominant inheritance of this phenotype. Patient C showed a valine to leucine substitution (Val29Leu), patient D a valine to alanine substitution (V45A), patient E an arginine to glycine replacement (Arg58Gly), and patient F an exchange of leucine to arginine (Leu128Arg). The Arg58Gly mutation was shared by the two affected brothers of patient E. Sequencing the whole coding region in 384 control chromosomes detected no amino acid substitutions but two synonymous single nucleotide polymorphisms (129C \rightarrow T, Cys43Cys; 358C \rightarrow T, Leu120Leu).

Because we had thought that warfarin resistance in rats might be due to mutations in the orthologous gene, we also screened this gene in the rat strain that was used to map *Rw* to chromosome 1 (ref. 10). DNA samples of ten sensitive and ten resistant rats were sequenced. We detected a heterozygous missense mutation, Tyr139Cys (416A \rightarrow G), in ten resistant rats and in one sensitive rat that was absent from the other nine sensitive animals. Warfarin resistance determination by the blood-clotting response test (see Methods) is known to have false-positive and false-negative error rates of at least 0.01 (ref. 13). Under these conditions, linkage between mutation and *Rw* phenotype was still significant with a log likelihood ratio (lod) score of 3.9 at a recombination rate of zero.

We also sequenced 16 resistant and 5 sensitive wild-caught rats¹⁴. The sensitive rats carried a homozygous tyrosine at position 139, whereas 12 and 4 resistant rats were homozygous and heterozygous, respectively, for the mutation Tyr139Cys. The identification of seven independent mutations with two distinct phenotypes in humans and rat, and the absence of mutations from 384 human control chromosomes indicated that mutations in this gene might have a causal role in the pathogenesis of VKCFD2 and warfarin resistance. On the basis of the mutations and the functional data reported below, we named the gene *vitamin K epoxide reductase complex subunit 1* (*VKORC1*).

An orthologue of the *VKORC1* gene was present in mice (NM_178600), and the orthologues in rat and in *Fugu rubripes* (Fig. 2) were established by homology searches and polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR). The corresponding proteins share 79–84% identity with the human protein. Database searches did not detect homology to any known genes or to characterized protein domains. Topology prediction programs anticipated three transmembrane domains. The PSORT II (<http://www.psort.org/>) program predicted a carboxy-terminal endoplasmic reticulum (ER) membrane retention signal (Lys-Lys-X-X or Lys-X-Lys-X-X) in all *VKORC1* proteins¹⁵, in accordance with location of the VKOR activity in the ER membrane fraction (ref. 5 and Fig. 3).

Tblastn searches with *VKORC1* detected paralogous human (BC027734) and mouse (AK009497) genes, each with 50% protein identity. We established the complete complementary DNA sequences in mouse, rat and *Fugu rubripes*. We named these genes *VKORC1-like 1* (*VKORC1L1*). Human, mouse and rat *VKORC1L1* proteins were highly conserved, sharing roughly 97% identity. We also detected a homologous protein in *Xenopus laevis* (AAH43742)

and, with weaker homology, in *Anopheles gambiae* (EAA06271) (Fig. 2). Pseudogenes of *VKORC1* and *VKORC1L1* were present in the human, mouse and rat genomes.

VKORC1 seems to be conserved in vertebrates, as it is present in human, rodents and fish. Notably, a close homologue is present in *Anopheles gambiae* but not in the *Drosophila* genome, although a gene encoding γ -carboxylase has been described in the fruitfly¹⁶. γ -Carboxyglutamate residues have been also found in the peptide venom of the marine snail genus *Conus*¹⁷. Like in vertebrates, γ -carboxylation in the mollusc and *Drosophila* requires reduced vitamin K as a cofactor. Thus, protein modification by γ -carboxylation seems to antedate the evolutionary emergence of *VKORC1*.

The tissue distribution of more than 100 human expressed sequence tags available at UniGene suggested that *VKORC1* is widely expressed. On analysis of fetal and adult human tissues by northern blotting, we detected a single transcript of 1.0 kilobases, providing no evidence for alternative splicing. We found the highest expression in fetal and adult liver, followed by fetal heart, kidney and lung, adult heart and pancreas (data not shown). Thus, like the *GGCX* gene, *VKORC1* is highly expressed in the adult liver; however, its expression seems to be broader. For example, it is clearly transcribed in fetal liver and both fetal and adult heart, where only low expression of *GGCX* has been described¹⁸.

From biochemical fractionation experiments it is known that the VKOR activity purifies with the microsomal membrane fraction^{5,19}. Furthermore, γ -glutamyl carboxylase has been localized to the membranes of the ER by immunocytochemistry²⁰. To study the subcellular localization of human *VKORC1*, we generated constructs expressing green fluorescent protein (GFP)- and Myc-tagged *VKORC1* fusion proteins for transient transfection of COS-7 cells. Primary antibodies against the epitope tags and fluorochrome-labelled secondary antibodies were used to visualize the fusion proteins; an antibody against the ER-specific protein calnexin was

used as a control. The green immunofluorescence of the *VKORC1* fusion proteins decorated the mesh-like structures of the ER in the cytoplasm and perfectly colocalized with the red label of the ER marker calnexin (Fig. 3). Thus, *VKORC1* seems to be located in the ER.

To study the effect of *VKORC1* on the reduction of vitamin K 2,3-epoxide, we overexpressed wild-type and mutated *VKORC1* in HEK293 cells. VKOR activity was measured by the dithiothreitol (DTT)-dependent conversion of vitamin K 2,3-epoxide to vitamin K quinone. Dose-response curves to warfarin inhibition were measured at final concentrations of 5–80 μ M warfarin¹⁹. Untransfected and mock-transfected cells showed a low basal activity, which was sensitive to warfarin. Overexpression of wild-type *VKORC1* resulted in a marked stimulation of VKOR activity: production of vitamin K quinone was increased 14–21-fold as compared with untreated and mock-transfected cells. The activity was inhibited by warfarin in a dose-dependent manner (Table 1).

We also determined VKOR activity after transfection with constructs expressing mutated *VKORC1* (Table 1). Recombinant expression of the Arg98Trp mutation observed in the two *VKCFD2* families only slightly increased VKOR activity in HEK293 cells. Spontaneous bleeding episodes and high concentrations of serum vitamin K epoxide in these patients suggest that the efficiency of vitamin K recycling is also markedly decreased *in vivo*²¹. The five WR variants showed a reduced VKOR activity ranging from 5% for the Leu128Arg mutation to 96% for the Val29Leu mutation. The Val45Ala, Arg58Gly and Tyr139Cys variants showed, respectively, about 23%, 21% and 48% activity (Table 1).

Reduced VKOR activity associated with higher vitamin K demand and death from spontaneous bleeding has been observed in heterozygous and homozygous *Rw* rats^{13,14,22}. Similarly in our expression system, which mimics homozygous conditions, WR

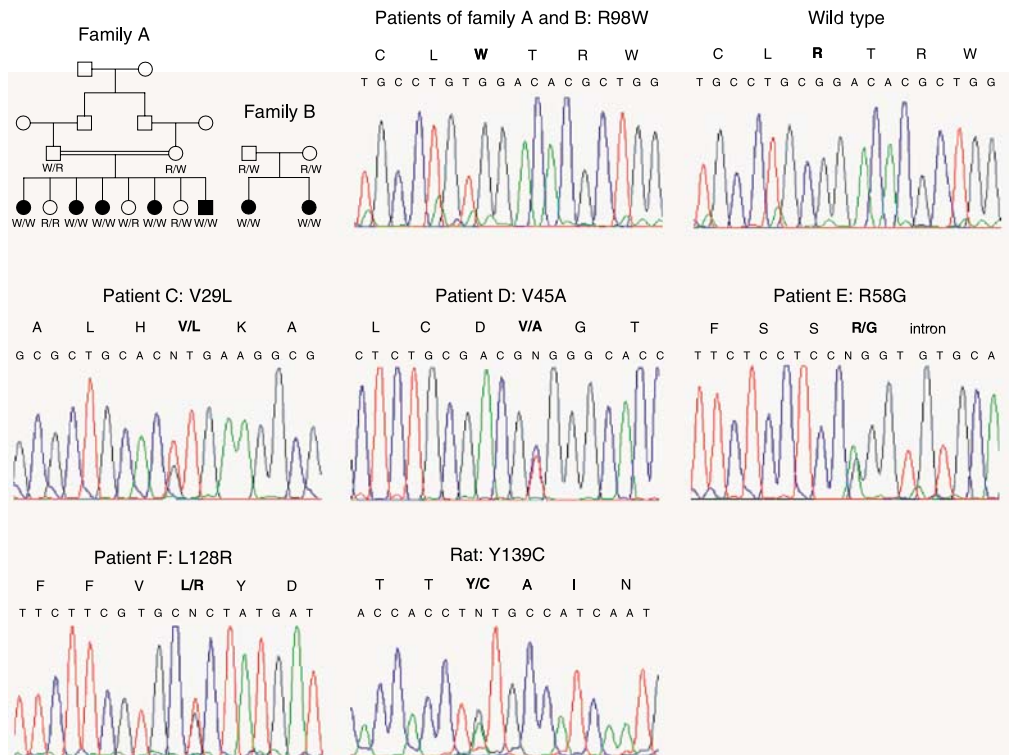


Figure 1 *VKORC1* mutations in individuals with VKCFD2 and WR. Top, segregation of the Arg98Trp mutation in two families with VKCFD2 (left), and the electropherograms for a patient with a homozygous mutation (centre) and a control subject (right). Middle and

bottom, the electropherograms for four WR patients with heterozygous mutations (85G \rightarrow T, 134T \rightarrow C, 172A \rightarrow G, 383T \rightarrow G) and a heterozygous *Rw* rat (416A \rightarrow G).

mutations led to a lower functional efficiency of the VKOR complex. Whereas at the phenotypic level all WR variants showed at least partial resistance towards the anticoagulation effect of warfarin, both wild-type and mutant proteins were sensitive to warfarin *in vitro*. At concentrations above 20 μ M, the Val29Leu and

Tyr139Cys variants retained higher VKOR activities than did the wild type, whereas in the Val45Ala, Arg58Gly and Leu128Arg variants VKOR activity fell below the detection limit (Table 1). Inconsistent response to warfarin has been reported previously in warfarin-resistant rats^{14,22}. Further studies are required to resolve in

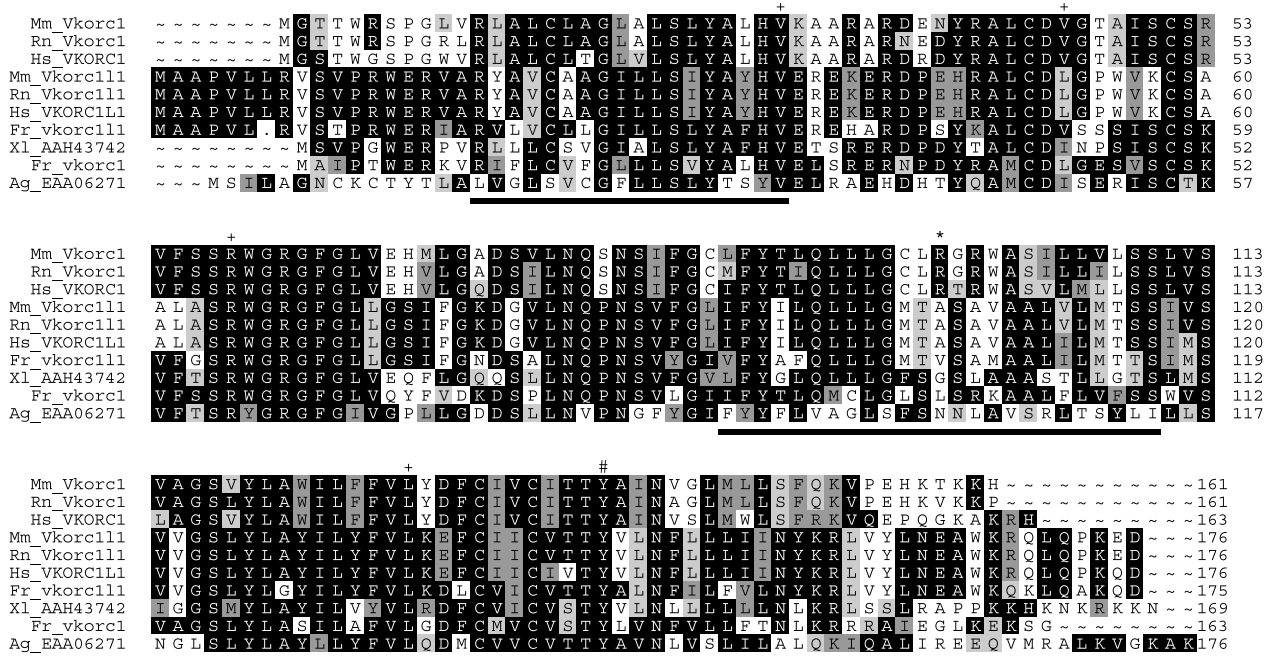


Figure 2 Amino acid sequence alignment of VKORC1 and VKORC1L1. The alignment was generated with ClustalW and Prettybox. Human, mouse and rat VKORC1 and VKORC1L1 proteins share roughly 84% and 97% identity, respectively, and there is about 50% identity between the two groups of proteins. Homologues were also detected in *Xenopus laevis* and *Anopheles gambiae*. The proteins are labelled by their gene symbols or accession codes and a prefix indicating the species (Hs, *H. sapiens*; Mm, *M. musculus*;

Rn, *R. norvegicus*; Fr, *Fugu rubripes*; Xl, *X. laevis*; Ag, *A. gambiae*). Predicted transmembrane domains are indicated by bold lines. Residues 29, 58 and 128 (+), which are mutated in individuals with WR, and residue 139 (#), which is mutated in *Rw* rats, are conserved in all species. WR mutation Val45Ala (+) and Arg 98 (*), which is mutated in individuals with VKCFD2, are conserved in human, rat and mouse VKORC1.

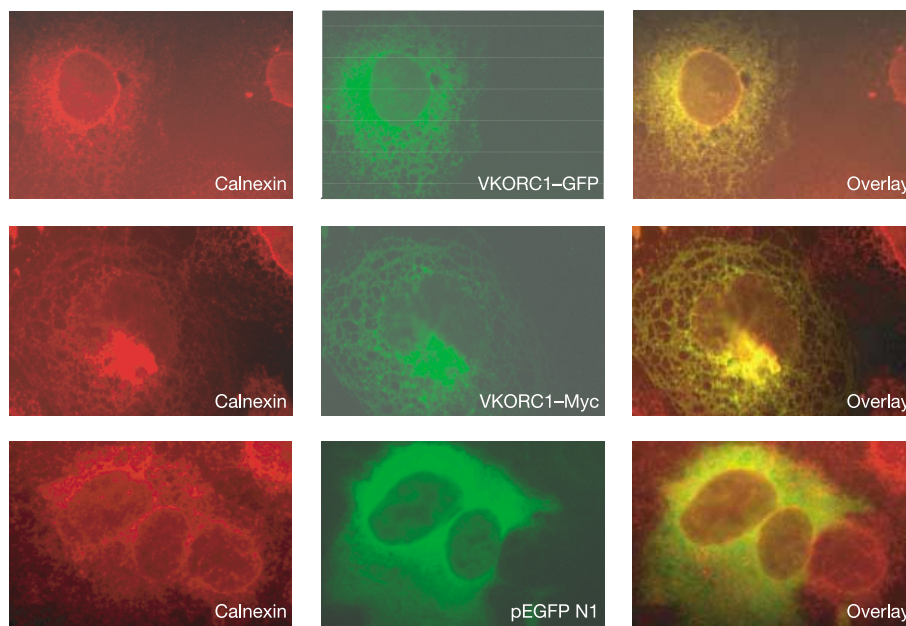


Figure 3 Subcellular location of VKORC1. COS-7 cells transiently transfected with constructs expressing VKORC1 were stained with anti-calnexin (red; left column) and anti-GFP or anti-Myc, respectively (green; middle column). Merged images of the double-

stained cells are shown on the right. Both VKORC1 constructs (tagged with GFP or Myc) colocalize with the ER-specific calnexin staining, whereas the control construct (pEGFP-N1) shows a diffuse pattern of staining throughout the cytoplasm.

Table 1 **VKOR activities* of HEK293 cells transfected with VKORC1 cDNA**

Mutation	Phenotype	Warfarin (μM)					
		0	5	10	20	40	80
Wild type	Normal	20.29	8.66	6.39	4.33	2.71	0.88
Arg98Trp	VKCFD2	1.81	0.73	0.42	0.16	<0.10	<0.10
Val29Leu	WR	19.59	6.34	5.08	5.26	4.69	2.19
Val45Ala	WR	4.67	1.12	1.14	0.57	<0.10	<0.10
Arg58Gly	WR	4.20	1.02	1.03	0.72	0.40	<0.10
Leu128Arg	WR	1.05	0.30	0.30	0.31	<0.10	<0.10
Tyr139Cys	Rw	9.74	10.44	9.47	8.77	8.23	6.71

* Enzymatic activity was determined as described in Methods. Values are given as the percentage of vitamin K epoxide converted into vitamin K quinone (product/[substrate + product]). All tests were done in duplicate. Untransfected and mock-transfected HEK293 cells showed an activity of 1.49 and 0.96%, respectively, and were >90% inhibited by 10 μM warfarin.

more detail the function of VKORC1 in warfarin resistance and VKCFD2.

In summary, by using a positional cloning approach that integrated mapping information from three species, we have identified a gene that is mutated in VKCFD2 and WR. From the segregation data, the absence of mutations in controls and the activity measurements of recombinant proteins, we conclude that mutations in this gene are causative for both VKCFD2 and WR. The molecular characterization of this first component of the VKOR complex will be instrumental in isolating the other subunits of this complex and in resolving the binding mechanisms of substrate and inhibitors. This should lead to a better understanding of the pharmacological action of coumarin drugs and may provide a basis for the rational design of anticoagulants targeting VKOR. □

Methods

Subjects

We carried out mutation screening of candidate genes on DNA samples from two VKCFD2 index patients and three unrelated WR patients. Clinical data of the VKCFD2 families have been described²¹. Patients C, D and F are sporadic cases. Patient E has two brothers suffering from warfarin resistance. Whereas the normal range of weekly warfarin doses is 10–60 mg, patient C required 100 mg, and patient E and his two brothers needed 220–250 mg of warfarin per week to reach therapeutic anticoagulation. Patients D and F did not respond to warfarin at all doses tested. All patients gave informed consent to the study.

Rw rats

An *Rw* rat colony was established as described¹⁰. A male brown Norway rat caught in the wild from the Münsterland area, Germany, that was homozygous resistant to warfarin and bromadiolone was crossed with a Wistar albino female. One F₁ heterozygous resistant male was used to establish a segregating backcross population. At the time of the study, the colony was abandoned. We analysed DNA samples from seven susceptible and eight resistant offspring of four matings between two sixth and seventh generation heterozygous resistant males and Wistar albino rats, and three susceptible and two resistant offspring of a backcross between a seventh generation heterozygous resistant male and his susceptible daughter from an earlier mating. Rats were tested for warfarin and bromadiolone resistance with the blood-clotting response method. Wild-caught rats were characterized for resistance to coumarin-derivatives and VKOR activity as described¹⁴.

Sequence analysis

Genome sequences and annotation were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), University of California Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>) and Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). Primers for mutation screening were designed using Primer3 software integrated into a script to allow for automatic primer design (<http://ihg.gsfc.de/ihg/ExonPrimer.html>). We amplified exon sequences and exon–intron boundaries with intronic primers and sequenced them directly by the BigDye Terminator Cycle sequencing kit (ABI). Primer sequences are available from the authors on request. Topology predictions were done using PHDhtm (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>).

Northern blots

Human multiple tissue northern blots, Fetal Blot 1 (Stratagene) and Human 8-Lane (BD Biosciences Clontech), were hybridized to radiolabelled full-length human VKORC1 cDNA in MiracleHyb high-performance hybridization solution (Stratagene). A β -actin probe supplied with the multiple tissue northern blot was used as a control.

Cloning and construction of expression vectors

The complete coding sequence of VKORC1 was amplified from human liver and kidney cDNA by using Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences Clontech) and primers with added cleavage sites for *HindIII* and *EcoRI* (VKORC1-*HindIII*-F, 5'-ATTAAGCTTCACCA

TGGGCAGCACCTGGGGGAGCCCT-3'; VKORC1-*EcoRI*-R, 5'-ATTGAATTCGGTG CCTCTTAGCCTTGGCCCTG-3'), and cloned into pBluescript II (Stratagene). For immunocytochemistry, we re-cloned the insert into the mammalian expression vectors pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech) and pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen).

For expression studies, the VKORC1 cDNA was cloned into pcDNA3 (Invitrogen) after amplification with the primers VKORC1-pcdna3-F (5'-GGGCGGAAGCTTGAGATAA TGGGCA-3') and VKORC1-pcdna3-R (5'-GCTTGAATTCAGGGCTCAGTGC-3'). Mutagenesis was done with the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). Wild-type and mutated cDNAs were re-cloned for expression in pCEP4 (Invitrogen) using the *HindIII* and *XhoI* sites. We verified all constructs by sequencing.

Cell culture, transient transfection and immunocytochemistry

COS-7 cells (DSMZ) were grown in DMEM medium with 10% fetal calf serum (FCS) on glass coverslips for 18–24 h and transfected with the expression vectors by using Effectene (Qiagen) in accordance with the manufacturer's specifications. After 48–60 h of further culturing, immunostaining was done as described²². Primary antibodies, Living Colors A.v. JL-8 (BD Biosciences Clontech), anti-Myc antibody (Invitrogen) and anti-calnexin (Sigma), were diluted 1:100 in the blocking solution. The same incubation and washing procedures were used for the secondary antibodies fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) and Cy3-conjugated anti-rabbit IgG(ab')₂ fragment (Sigma). Coverslips were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1:500), washed and visualized under a fluorescence microscope (Leica).

Expression studies and VKOR activity measurements

We grew HEK293-EBNA cells (Invitrogen) in MEM medium plus 10% FCS. For each experiment, 6 × 10⁵ cells were plated onto 94-mm Petri dishes. After 30 h at 37 °C and 5% CO₂, transfection (20 μg of DNA construct per dish) was done by the calcium phosphate method. After 40 h at 35 °C and 3% CO₂, transfected cells were washed in PBS, collected and lysed in 0.25 mM imidazole (pH 7.6) plus 0.5% CHAPS. Transfection efficiency was checked by sequencing of RT-PCR products.

VKOR enzymatic activity was measured in whole-cell extracts as described¹⁹ with 5 μM vitamin K 2,3-epoxide as a substrate in the presence of 5 mM DTT. After extraction by isopropanol:hexane (3:2), vitamin K quinone was separated from the epoxide by HPLC on a reversed-phase C₁₈ column. During the extraction procedure, vitamin K hydroquinone was quantitatively oxidized to the quinone form. Measurements were run in duplicate and the activity is given as the percentage of substrate converted into quinone. Vitamin K 2,3-epoxide was prepared by the oxidation of vitamin K quinone (Sigma-Aldrich) with H₂O₂. We added warfarin (Sigma-Aldrich) in dimethyl sulphoxide (<1 vol%).

Received 5 September; accepted 31 October 2003; doi:10.1038/nature02214.

- Suttie, J. W. The biochemical basis of warfarin therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **214**, 3–16 (1987).
- Nelsetuen, G. L., Zytovicz, T. H. & Howard, J. B. The mode of action of vitamin K. Identification of γ -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.* **249**, 6347–6350 (1974).
- Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. & Roepstorff, P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **71**, 2730–2733 (1974).
- Fasco, M. J., Principe, L. M., Walsh, W. A. & Friedman, P. A. Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry* **22**, 5655–5660 (1983).
- Cain, D., Hutson, S. M. & Wallin, R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **272**, 29068–29075 (1997).
- Begent, L. A. et al. Characterization and purification of the vitamin K₁ 2,3-epoxide reductases system from rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 481–486 (2001).
- Lee, J. J. & Fasco, M. J. Metabolism of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide via interaction with a common disulfide. *Biochemistry* **23**, 2246–2252 (1984).
- Wallin, R., Hutson, S. M., Cain, D., Sweatt, A. & Sane, D. C. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J.* **15**, 2542–2544 (2001).
- Fregin, A. et al. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood* **100**, 3229–3232 (2002).
- Kohn, M. H. & Pelz, H. J. Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat. *Mamm. Genome* **10**, 696–698 (1999).
- Greaves, J. H. & Ayres, P. Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature* **215**, 877–878 (1967).
- Wallace, M. E. & MacSwiney, F. J. A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *J. Hyg. (Lond.)* **76**, 173–181 (1976).
- Martin, A. D., Steed, L. C., Redfern, R., Gill, J. E. & Huson, L. W. Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat. *Rattus norvegicus*. *Lab. Anim.* **13**, 209–214 (1979).
- Thijssen, H. H. & Pelz, H. J. in *Advances in Vertebrate Pest Management* (eds Pelz, H. J., Cowan, D. P. & Feare, C. J.) 181–192 (Filander, Fürth, 2001).
- Jackson, M. R., Nilsson, T. & Peterson, P. A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**, 3153–3162 (1990).
- Li, T., Yang, C. T., Jin, D. & Stafford, D. W. Identification of a *Drosophila* vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase. *J. Biol. Chem.* **275**, 18291–18296 (2000).
- Bandyopadhyay, P. K. et al. Gamma-glutamyl carboxylation: an extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods, and chordates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 1264–1269 (2002).
- Romero, E. E., Velazquez-Estades, L. J., Deo, R., Schapiro, B. & Roth, D. A. Cloning of rat vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase and developmentally regulated gene expression in postimplantation embryos. *Exp. Cell Res.* **243**, 334–346 (1998).
- Wallin, R. & Martin, L. F. Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J. Clin. Invest.* **76**, 1879–1884 (1985).
- Presnell, S. R. & Stafford, D. W. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb. Haemost.* **87**, 937–946 (2002).
- Oldenburg, J. et al. 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.* **84**, 937–941 (2000).

22. Fasco, M. J., Preusch, P. C., Hildebrandt, E. & Suttie, J. W. Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats. *J. Biol. Chem.* **258**, 4372–4380 (1983).
23. Hörtnagl, K., Prokisch, H. & Meitinger, T. An isoform of hPANK2, deficient in pantothenate kinase-associated neurodegeneration, localizes to mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 321–327 (2003).

Acknowledgements We thank H. Hermann-Brackmann, W. Eberl, J. Pattinson, A.-N. Parkes and R. Jurgutis for the donation and clinical characterization of patient samples; V. Milenkovic for technical assistance and H. Höhn, T. Meitinger and T. Wienker for discussions and critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Bundesministerium für Bildung und Forschung Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (BMBF/DLR), Baxter Germany, the Stiftung Hämotherapie-Forschung, the Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) and the BMBF projects German National Genome Research Network (NGFN) and Bioinformatics for the Functional Analysis of Mammalian Genomes (BFAM).

Competing interests statement The authors declare competing financial interests: details accompany the paper on www.nature.com/nature.

Correspondence and requests for material should be addressed to J.O. (joldenburg@bsd.hessen.de). The sequences are deposited in GenBank under accession codes AY423042, AY423043, AY423044, AY423045, AY423046, AY423047 and AY423048

Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase

Tao Li¹, Chun-Yun Chang¹, Da-Yun Jin¹, Pen-Jen Lin¹, Anastasia Khvorova² & Darrel W. Stafford¹

¹Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA

²Dharmacon, Inc., 1376 Miners Drive 101, Lafayette, Colorado 80026, USA

Vitamin K epoxide reductase (VKOR) is the target of warfarin, the most widely prescribed anticoagulant for thromboembolic disorders. Although estimated to prevent twenty strokes per induced bleeding episode¹, warfarin is under-used because of the difficulty of controlling dosage and the fear of inducing bleeding. Although identified in 1974 (ref. 2), the enzyme has yet to be purified or its gene identified. A positional cloning approach has become possible after the mapping of warfarin resistance to rat chromosome 1 (ref. 3) and of vitamin K-dependent protein deficiencies to the syntenic region of human chromosome 16 (ref. 4). Localization of VKOR to 190 genes within human chromosome 16p12-q21 narrowed the search to 13 genes encoding candidate transmembrane proteins, and we used short interfering RNA (siRNA) pools against individual genes to test their ability to inhibit VKOR activity in human cells. Here, we report the identification of the gene for VKOR based on specific inhibition of VKOR activity by a single siRNA pool. We confirmed that MGC11276 messenger RNA encodes VKOR through its expression in insect cells and sensitivity to warfarin. The expressed enzyme is 163 amino acids long, with at least one transmembrane domain. Identification of the VKOR gene extends our understanding of blood clotting, and should facilitate development of new anticoagulant drugs.

Numerous proteins require the modification of multiple glutamic acid residues to γ -carboxyglutamate in order to function. Among these vitamin-K-dependent (VKD) proteins, coagulation factors IX (Christmas factor), VII and prothrombin are the best known. The observation that a knockout of the gene encoding matrix Gla protein results in calcification of arteries in the mouse⁵ emphasizes the importance of the vitamin K cycle for proteins with functions other than coagulation. Moreover, Gas6 (ref. 6) and other Gla proteins of unknown function^{7,8} are expressed in neural tissue, and warfarin exposure *in utero* results in mental retardation and

facial abnormalities^{9–11}. This is consistent with the observation that the expression of VKD γ -glutamyl carboxylase, the enzyme that accomplishes the Gla modification^{12,13}, is temporally regulated in a tissue-specific manner with high expression in the nervous system during early embryonic stages¹⁴. Concomitant with carboxylation, reduced vitamin K, a co-substrate of the reaction, is converted to vitamin K epoxide. Because the amount of vitamin K in the human diet is limited, vitamin K epoxide must be converted back to vitamin K by VKOR to prevent its depletion. Warfarin, the most widely used anticoagulation drug, targets VKOR and prevents the regeneration of vitamin K. The consequence is a decrease in the concentration of reduced vitamin K, which results in a decreased rate of carboxylation by the γ -glutamyl carboxylase and in the production of under-carboxylated VKD proteins.

VKOR activity was first reported in 1974 (ref. 2). Since this first report, several groups, including ours, have attempted to purify VKOR with little success. Two recent reports suggesting the chromosomal location of the gene for VKOR stimulated us to attempt a different approach to identify the gene for this important enzyme. First, Kohn and Pelz³ mapped warfarin resistance (*R_w*) to rat chromosome 1 between markers *D1Rat193* and *D1Rat130*. In this region, four marker genes (*Il4r*, *Myl2*, *Itgam* and *Fgfr2*) allowed Kohn and Pelz to locate the syntenic regions of mouse and human chromosomes³. They reported that these four markers are found on mouse chromosome 7 at 60–63 centimorgans (cM) and on human chromosomes 10, 12 and 16. A second study⁴ mapped a gene for combined deficiencies of VKD proteins to human chromosome 16p12-q21, between markers *D16S3131* and *D16S419*. We found human genes corresponding to three of the four rat marker genes (*Il4r*, *Myl2* (rat *Myl2* is 97% identical to human *HUMMLC2B*) and *Itgam*) on human chromosome 16p12-q21. Because warfarin resistance and combined deficiency of VKD proteins map to the same region, we focused our search on human chromosome 16. This region between markers *D16S3131* and *D16S419* corresponds to chromosome 16 at 50–65 cM on the genetic map and to 26–46.3 megabases (Mb) on the physical map (<http://www.ncbi.nih.gov/Genomes/>). We analysed the 190 predicted coding sequences in this region by a BLASTX search of the NCBI non-redundant protein database. Those human genes and orthologues from related species with known function were eliminated. Because VKOR seems to be a transmembrane protein¹⁵, the remaining 52 genes were translated

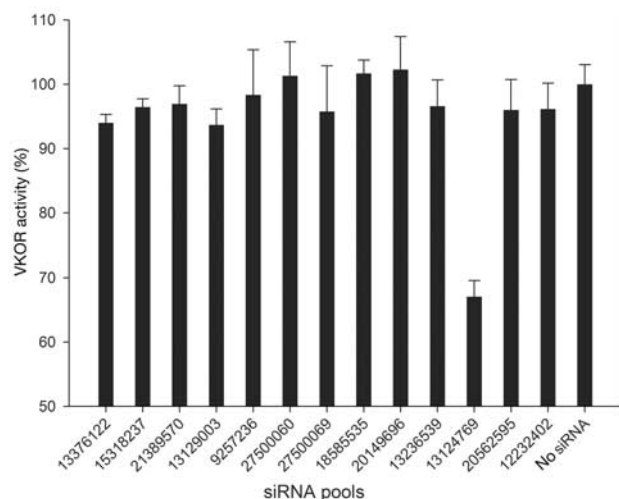


Figure 1 siRNA inhibition of VKOR activity in A549 cells. For each of the 13 siRNA pools, three T75 flasks containing A549 cells were transfected and VKOR activity was determined after 72 h. The VKOR assay used 25 μ M vitamin K epoxide. One siRNA pool specific for gene gi:13124769 reduced VKOR activity by 30–36% in eight repetitions.

7.4 Anlage 4

The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*.

The Genetic Basis of Resistance to Anticoagulants in Rodents

Hans-Joachim Pelz,^{*,1} Simone Rost,^{†,1} Mirja Hünnerberg,[†] Andreas Fregin,[†]
Ann-Charlotte Heiberg,[‡] Kristof Baert,[§] Alan D. MacNicoll,^{**} Colin V. Prescott,^{††}
Anne-Sophie Walker,^{‡‡} Johannes Oldenburg,^{§§} and Clemens R. Müller^{†,2}

^{*}Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde, 48161 Münster, Germany, [†]Institut für Humangenetik, Universität Würzburg, Biozentrum, 97074 Würzburg, Germany, [‡]Danish Pest Infestation Laboratory, Danish Institute of Agricultural Sciences, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark, [§]Institute for Forestry and Game Management, 9500 Geraardsbergen, Belgium, ^{**}Central Science Laboratory, Defra, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom, ^{††}School of Animal and Microbial Sciences, The University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AJ, United Kingdom, ^{‡‡}Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, 78026 Versailles, France and ^{§§}Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, 60526 Frankfurt/M, Germany

Manuscript received December 27, 2004

Accepted for publication March 24, 2005

ABSTRACT

Anticoagulant compounds, *i.e.*, derivatives of either 4-hydroxycoumarin (*e.g.*, warfarin, bromadiolone) or indane-1,3-dione (*e.g.*, diphacinone, chlorophacinone), have been in worldwide use as rodenticides for >50 years. These compounds inhibit blood coagulation by repression of the vitamin K reductase reaction (VKOR). Anticoagulant-resistant rodent populations have been reported from many countries and pose a considerable problem for pest control. Resistance is transmitted as an autosomal dominant trait although, until recently, the basic genetic mutation was unknown. Here, we report on the identification of eight different mutations in the *VKORC1* gene in resistant laboratory strains of brown rats and house mice and in wild-caught brown rats from various locations in Europe with five of these mutations affecting only two amino acids (Tyr139Cys, Tyr139Ser, Tyr139Phe and Leu128Gln, Leu128Ser). By recombinant expression of *VKORC1* constructs in HEK293 cells we demonstrate that mutations at Tyr139 confer resistance to warfarin at variable degrees while the other mutations, in addition, dramatically reduce VKOR activity. Our data strongly argue for at least seven independent mutation events in brown rats and two in mice. They suggest that mutations in *VKORC1* are the genetic basis of anticoagulant resistance in wild populations of rodents, although the mutations alone do not explain all aspects of resistance that have been reported. We hypothesize that these mutations, apart from generating structural changes in the VKORC1 protein, may induce compensatory mechanisms to maintain blood clotting. Our findings provide the basis for a DNA-based field monitoring of anticoagulant resistance in rodents.

THE introduction of warfarin and related anticoagulant compounds in the early 1950s produced a significant change for rodent control practice. The delayed action of such compounds, with mortality occurring days or even weeks after initial bait uptake makes them particularly suitable for the control of phobic species like brown rats (*Rattus norvegicus*). Today, control of commensal rodents, particularly of brown rats, relies predominantly on the use of anticoagulants.

During the same time period, coumarin derivatives have gained a leading role as oral anticoagulants for the treatment and prevention of thromboembolic events in humans. This class of anticoagulants target the vitamin K epoxide reductase (VKOR) complex, which fulfills a basic function in the recycling of vitamin K (LOWENTHAL and MACFARLANE 1964). Vitamin K hydroquinone

is an essential cofactor for the post-translational gamma-carboxylation of several blood coagulation factors (NELSESTUEN *et al.* 1974; STENFLO *et al.* 1974; SADOWSKI *et al.* 1976; CAIN *et al.* 1998) and other vitamin-K-dependent proteins (PRESNELL and STAFFORD 2002). During each carboxylation step, one molecule of vitamin K hydroquinone is oxidized to vitamin K 2,3 epoxide. The recycling of this micronutrient is achieved by the VKOR, and suppression of the VKOR by anticoagulants inhibits carboxylation of clotting factors and thus compromises the coagulation process.

In brown rats (*R. norvegicus*), resistance to the anticoagulants warfarin and diphacinone was first observed in 1958 (BOYLE 1960), and warfarin resistance in the house mouse (*Mus musculus/domesticus*) was evident shortly after (DODSWORTH 1961). The majority of reports came from Europe but resistance in commensal rodents was also documented in the United States, Canada, Japan, and Australia. An overview of the status of warfarin resistance is given in Table 1.

Since anticoagulant resistance caused significant re-

¹These authors contributed equally to this study.

²Corresponding author: Institut für Humangenetik, Universität Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany.
E-mail: crm@biozentrum.uni-wuerzburg.de

TABLE 1
Current status of anticoagulant resistance in commensal rats and house mice

Country	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>M. musculus domesticus</i>	Reference
Belgium	+		+	LUND (1984); BAERT (2003)
Denmark	+	+	+	MYLLYMÄKI (1995); LODAL (2001)
Finland			+	MYLLYMÄKI (1995)
France	+	+	+	MYLLYMÄKI (1995)
Germany	+	+	+	MYLLYMÄKI (1995); PELZ (2001)
United Kingdom	+	+	+	MYLLYMÄKI (1995); KERINS <i>et al.</i> (2001)
Italy	+			ALESSANDRONI <i>et al.</i> (1980)
The Netherlands	+		+	DE JONGE (1994)
Sweden			+	LUND (1984)
Switzerland			+	MUHR (1981)
Canada	+		+	SIDDIQI and BLAINE (1982)
United States	+	+	+	JACKSON and ASHTON (1986)
Japan		+		NAGANUMA <i>et al.</i> (1981)
Australia		+		SAUNDERS (1978)

ductions in the efficacy of control of rat and mouse populations, more potent anticoagulant compounds were developed during the 1970s and 1980s: first difenacoum and bromadiolone, followed later by the more potent “single-feed” compounds brodifacoum, flocoumafen, and difethialone. However, resistance to most of these compounds was reported soon after their introduction (ROWE *et al.* 1981; GREAVES *et al.* 1982; MACNICOLL and GILL 1987; JOHNSON 1988).

Breeding experiments have led to the conclusion that warfarin resistance is based on a single dominant autosomal gene (*Rw*) in brown rats and in house mice (*War*), which could be mapped to orthologous linkage groups on chromosomes 1 and 7, respectively (GREAVES and AYRES 1967; WALLACE and MACSWINEY 1976; KOHN and PELZ 1999). In black rats, resistance was supposed to be multifactorial, judging from its unstable heredity (GREAVES *et al.* 1976). It has been suggested that a second recessive gene was modifying the *Rw* gene to confer difenacoum resistance in some individuals of the Hampshire warfarin-resistant strain (GREAVES and CULLEN-AYRES 1988).

Recently, a first protein of the VKOR complex, named VKORC1 and found to be capable of reducing vitamin K-2,3-epoxide in a warfarin-sensitive manner, was identified (LI *et al.* 2004; ROST *et al.* 2004). Missense mutations at different positions of this protein have been detected in human warfarin-resistant patients and in the German resistant rat strain (ROST *et al.* 2004; Table 2). Upon recombinant expression in human HEK293 cells, mutated VKORC1 showed a reduced enzyme activity and a partial resistance toward warfarin inhibition.

This study compares different resistant laboratory rodent strains and wild-caught rats for mutations in the *VKORC1* gene, which supposedly is the basic gene conferring anticoagulant resistance. We measure VKOR activities of the different mutations in a recombinant

expression system and discuss the physiological, evolutionary, and practical implications of the mutations.

MATERIALS AND METHODS

Animals: *R. norvegicus*: Rats of both sexes were analyzed. Animals of the laboratory outbred strains HW and HH were obtained from two independent laboratory stocks [Central Science Laboratory (CSL), York and Reading University], strains HS and HB1 were from the CSL, and strain HB2 from Reading. Four of these strains were derived from wild stock and were crossed with warfarin-susceptible Wistar-derived Tolworth albino susceptible to incorporate homozygous genes for Scottish (HS; GREAVES and AYRES 1973), Welsh (HW; GREAVES and AYRES 1969), Hampshire (HH; GREAVES and CULLEN-AYRES 1988), and Berkshire (HB1) resistance. The fifth strain was derived from wild Berkshire stock and crossed for four generations onto a warfarin-susceptible line of CD rats (obtained from Charles River UK) to incorporate homozygous genes for Berkshire resistance (HB2; HUSSAIN 1998). A German strain was derived from wild stock and crossed with Wistar susceptibles to incorporate genes for at least warfarin resistance (KOHN and PELZ 1999). Wild rats were caught over the past years in the course of regional resistance monitoring programs and immediately analyzed for resistance by blood clotting response (BCR). They originated from the following geographic areas (Figure 1): Belgium—Flanders; Denmark—Bornholm, Fünen, Jutland, and Zealand; France—Yonne, Eure and Loire; Germany—Münsterland and Emsland; United Kingdom—Yorkshire.

M. musculus/domesticus: The Reading susceptible mouse strain (MHS) was the Swiss mouse, an outbred strain obtained from Charles River UK. The Reading resistant mouse strain (MHR) was homozygous for a resistance gene that had been transferred through six generations onto the Reading susceptible mouse MHS background (C. V. PRESCOTT, unpublished results). The mouse resistance gene was obtained from a wild population of house mice (*M. musculus domesticus*) originally trapped near Reading, United Kingdom (PRESCOTT 1996).

At the CSL (York, UK) a homozygous warfarin-resistant mouse strain was derived by crossing mice of a warfarin-resistant PBI strain, which were direct descendants of the wild

mice reported in 1976 (WALLACE and MACSWINEY 1976), with warfarin-susceptible mice of a LAC-gray strain. Offspring were selected for warfarin resistance and backcrossed to the LAC-gray strain for six generations. Warfarin-resistant mice of the sixth generation were mated with each other and homozygous warfarin-resistant individuals selected to produce a homozygous Cambridge resistant strain.

Blood clotting response test: BCR resistance testing with warfarin was done as described (MARTIN *et al.* 1979) with modifications (MACNICOLL and GILL 1993). BCR testing with bromadiolone was performed according to GILL *et al.* (1994, 1993). In Germany and Denmark, the test solution was administered by intraperitoneal injection instead of oral application, which had proved equally effective (H. J. PELZ, unpublished data) and is not confounded by any mechanism of reduced intestinal absorption. With each series of tests, the activity of the test solution was checked by including a Wistar albino rat as a known susceptible individual.

DNA sequence determination and mutation screening assays: DNA was prepared from fresh or frozen tissue samples by standard procedures. The three exons and flanking intronic sequences of the *VKORC1* gene were amplified by PCR and sequenced as described (ROST *et al.* 2004). For the mutation Tyr139Cys, an amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR test was developed (YE *et al.* 2001) using the outer primers F: ATC CTG AGT TCC CTG GTG TCT GTC GCT G and R: TCA GGG CTT TTT GAC CTT GTG TTC TGG C (2 pmol each) and the inner primers F: TGA TTT CTG CAT TGT TTG CAT CAC CAC ATG and R: CAA CAT CAG GCC CGC ATT GAT GGA AT (10 pmol each). PCR reactions were performed with Taq polymerase and 1× buffer (Invitrogen, San Diego) in the presence of 1.5 mM MgCl₂ and 200 mM betaine for 3 min at 95° followed by 32 cycles of 20 sec at 95°, 20 sec at 62°, 10 sec at 70°, and a final 3 min at 70°. The outer primer pair generates a control band of 168 bp while the inner primers result in a band of 123 bp for the wild type and 101 bp for the mutated sequence, respectively.

The mutation Leu120Gln creates a novel *StuI* restriction site in exon 3. Digestion of the PCR product specific for exon 3 results in fragments of 195 and 135 bp in the presence of the mutation and a single band of 330 bp in the wild type (ROST *et al.* 2004). The mutation Leu128Gln generates a novel site for *BsrI* with fragments of 170 and 160 bp in mutant PCR products. The mutation Tyr139Ser can be detected by *MnII* digestion as a fragment of 110 bp (plus several bands <50 bp) *vs.* 160 bp (plus bands <50 bp) in the wild type.

Expression studies and VKOR activity measurements: VKOR activity was measured in transfected HEK293-EBNA cells (Invitrogen). For each experiment, 6 × 10⁵ cells were plated onto 94-mm petri dishes. After 30 hr at 37° and 5% CO₂, transfection (20 µg of DNA construct/dish) was done by the calcium phosphate method. After 40 hr at 35° and 3% CO₂, transfected cells were washed in PBS, collected, and lysed in 0.25 mM imidazole (pH 7.6) plus 0.5% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS). VKOR enzymatic activity was measured in whole-cell extracts as described (WALLIN and MARTIN 1985). Mutations were introduced into the human cDNA cloned in pCEP4 (Invitrogen) by the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam). All transfection and activity assays were run in triplicate and are given as the mean.

RESULTS

Sequence analysis of resistant laboratory stocks: *R. norvegicus*: Scottish (HS), Welsh (HW), Hampshire (HH), and Berkshire (HB1 and HB2) homozygous resistant

rats obtained from two independent laboratory stocks were analyzed for mutations in the *VKORC1* gene. Three mutations were identified: the Hampshire and both Berkshire strains share a Leu120Gln mutation while resistant animals from the Scottish strain carry a Leu128Gln substitution. In the Welsh strain, tyrosine139 was found mutated to serine (Tyr139Ser). Mutations were absent from the anticoagulant-susceptible background strains.

M. musculus/domesticus: Six mice from a colony established at the CSL in York were found to be homozygous for a Leu128Ser mutation. Four Reading homozygous resistant mice (MHR) carried the Tyr139Cys mutation observed before in rats. Neither sequence change was seen in the respective background strains. Sequencing results are summarized in Table 2.

Sequence analysis of wild-caught resistant brown rats: Rats trapped in the wild in Belgium, Denmark, England, and Germany were tested for warfarin resistance by the blood clotting response test at the time of sampling. Subsequent analysis of the *VKORC1* gene from frozen tissue specimens revealed mutations in all but three resistant animals (Table 2). Forty-three resistant wild rats from Denmark (Jütland, Zealand, Fünen, and Bornholm) showed the mutation Tyr139Cys, which had been previously identified in northwestern Germany (ROST *et al.* 2004). In 14 resistant rats caught in Flanders (Belgium), the same tyrosine139 was found mutated to phenylalanine (Tyr139Phe). Thirteen animals were heterozygous while one was homozygous for this amino acid substitution. None of the 13 susceptible rats caught in Flanders showed this mutation. Of six incidental catches from the regions of Burgundy and Centre in France, five carried this Tyr139Phe mutation homozygously while the sixth was compound heterozygous for Tyr139Phe and a novel variant at Arg35Pro.

Of three wild resistant rats from Yorkshire, two were heterozygous for Tyr139Cys/wild type and one was compound heterozygous for Leu128Gln/Tyr139Cys. The geographic origin of these wild-caught rats and of the resistance genes interbred into the laboratory stocks is depicted in Figure 1.

Since warfarin-resistant laboratory stocks were established from a single founder individual, we tested whether resistance in a wild population was genetically homogeneous or not. A total of 428 rats were trapped in 22 different locations of the resistance area of Münsterland/Emsland, Germany, and warfarin resistance was determined by BCR. Testing for the Tyr139Cys mutation by the ARMS-PCR screening assay (see MATERIALS AND METHODS) revealed that 281 of 286 rats classified "resistant" by BCR testing carried this mutation while the mutation was absent from 137 of 142 individuals classified as susceptible by the BCR test. The full genotypes of the 10 discordant animals were determined by sequencing of the entire *VKORC1* gene. Of the 5 rats testing positive by BCR (that is, resistant) but negative

TABLE 2
VKORC1 mutations found in *Rw*- and *War*-resistant animals

Strain/geographic area	No. of specimens	Codon position	Codon WT	Codon Mut	AA WT	AA Mut
<i>R. norvegicus</i>						
UK, Hampshire resistant	2	120	CTG	CAG	Leu	Gln
UK, Berkshire resistant (Reading)	2	120	CTG	CAG	Leu	Gln
UK, Berkshire resistant (CSL)	2	120	CTG	CAG	Leu	Gln
UK, Scottish resistant (CSL)	2	128	CTG	CAG	Leu	Gln
UK, Welsh resistant (CSL)	2	139	TAT	TCT	Tyr	Ser
UK, Yorkshire, wild	3	139	TAT	TGT	Tyr	Cys
UK, Yorkshire, wild	1 ^a	128	CTG	CAG	Leu	Gln
Denmark, wild	43	139	TAT	TGT	Tyr	Cys
Belgium, wild	14	139	TAT	TTT	Tyr	Phe
France, wild	6	139	TAT	TTT	Tyr	Phe
France, wild	1 ^b	35	CGC	CCC	Arg	Pro
Germany, wild	286	139	TAT	TGT	Tyr	Cys
Germany, wild	2	56	TCC	CCC	Ser	Pro
<i>M. musculus/domesticus</i>						
UK, CSL	6	128	TTA	TCA	Leu	Ser
UK, Reading	4	139	TAT	TGT	Tyr	Cys
<i>Homo sapiens sapiens</i>						
Patient F (ROST <i>et al.</i> 2004)	1	128	CTC	CGC	Leu	Arg

WT, wild-type sequence; Mut, mutated sequence; AA, amino acid.

^a Animal was compound heterozygous for Leu128Gln and Tyr139Cys.

^b Animal was compound heterozygous for Arg35Pro and Tyr139Phe.

by ARMS-PCR (that is, wild type for Tyr139), three animals had no sequence variation in the entire *VKORC1* coding region and thus may be regarded as false-positive BCR tests. In two animals, a sequence change was found in exon 1, leading to a Ser56Pro exchange. One animal each was homo- and heterozygous, respectively. Ser56Pro is, therefore, a second candidate mutation in the Münsterland resistance area. Five animals classified as “susceptible” by BCR were determined heterozygous by ARMS-PCR for the Tyr139Cys mutation. The mutation was confirmed by sequencing in all 5 animals. Thus, these may be seen as false-negative results of the BCR.

In Denmark, of 58 rats from 24 localities in four different regions/islands (Jütland, Zealand, Fünen, Bornholm), 15 were classified “susceptible” and 43 “resistant” according to BCR or feeding tests (WORLD HEALTH ORGANIZATION 1982). All resistant individuals showed the Tyr139Cys mutation and all but one of the sensitive individuals were confirmed “wild type” by ARMS-PCR. Within this sample, 24 of 31 rats from two localities (Horsens, Jütland, and Vordingborg, Zealand) carried the mutation homozygously; the others showed heterozygous genotypes at position 139.

Recombinant expression and VKOR activity measurements: VKOR activity was measured in HEK293 cells transfected with a series of *VKORC1* cDNA constructs and its inhibition by warfarin was determined (Figure

2). All experiments were run in triplicate to compensate for variation in transfection efficiency. Activity of the wild-type protein (0.74 ± 0.23 nmol/mg protein) was set to 100% and was progressively inhibited by warfarin to <4% at 100 μ M. The mutation Tyr139Phe displayed an even higher basal activity (116%) and appeared largely insensitive to warfarin with 87% activity at 100 μ M inhibitor. In comparison, the mutation Tyr139Ser showed 57% of wild-type activity in the absence of warfarin but still 33% residual activity at the highest inhibitor concentrations tested. Basal VKOR activity of mutation Tyr139Cys was ~48% of wild type without warfarin and 25% at 100 μ M. The two mutations Leu120Gln and Leu128Gln had initial activities of 50 and 20% of normal, respectively, and residual activities of 9% each at 100 μ M warfarin. Substitution of Leu128 by serine caused the lowest VKOR activity (17%) and was least resistant to drug inhibition (3% at 100 μ M). Both amino acid substitutions that were observed in individual wild rats, Arg35Pro and Ser56Pro, nearly abolished VKOR activity with <5% in the absence of warfarin. Upon inhibition the activity fell below our detection limit.

DISCUSSION

Previously, the *VKORC1* gene that encodes an essential component of the vitamin K recycling complex was

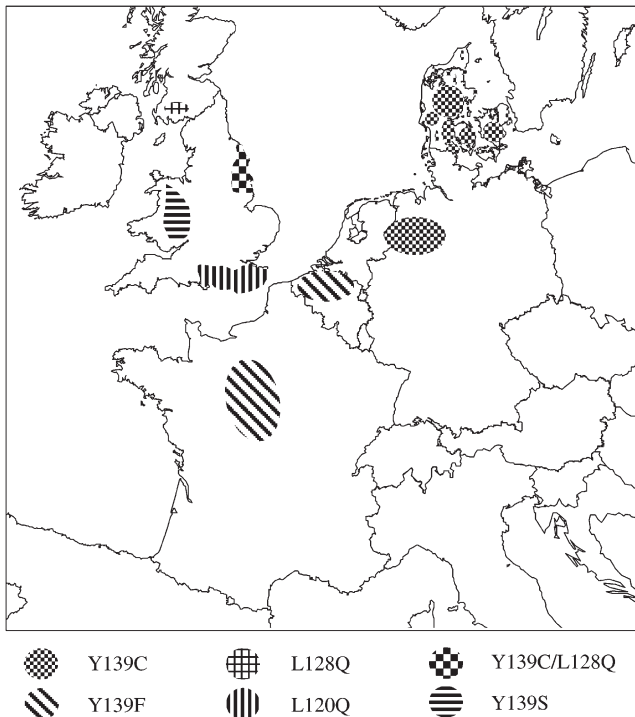


FIGURE 1.—Geographic origin of resistant rodent populations. Warfarin resistance areas in Europe are shown and locations where resistant rats were trapped in the wild are indicated. Different mutations are represented by different hatching.

identified as the gene responsible for warfarin resistance and combined deficiency of vitamin-K-dependent clotting factors in humans (ROST *et al.* 2004). The chromosomal position of human *VKORC1* is orthologous to the *Rw* locus in rats and the *War* locus in mice (WALLACE and MACSWINEY 1976; KOHN and PELZ 1999; FREGIN *et al.* 2002). Thus, *VKORC1* was the prime candidate gene for warfarin resistance in rodents as well. In the present study, we have identified *VKORC1* mutations in all but three warfarin-resistant rodents tested.

Origin of mutations: Apparently, codons 128 and 139 of the *VKORC1* gene represent “hotspots” for mutations as two and three mutations, respectively, were identified in two species, rats and mice. Previously, leucine 128 had been found mutated to arginine in a human patient resistant to coumarin treatment for thrombosis (ROST *et al.* 2004). Interestingly, codon usage at these positions differs among species and none of the codons contains the mutation-prone CpG dinucleotide (Table 2). Thus, the gene sequence does not provide a straightforward explanation for the recurrent mutations.

Although all laboratory strains carrying *Rw* or *War* were established from single founder individuals, the recurrent and independent mutations in *VKORC1* make it highly unlikely that these reflect neutral sequence variation among wild populations of rodents. This is reinforced by data from wild-caught animals, which dis-

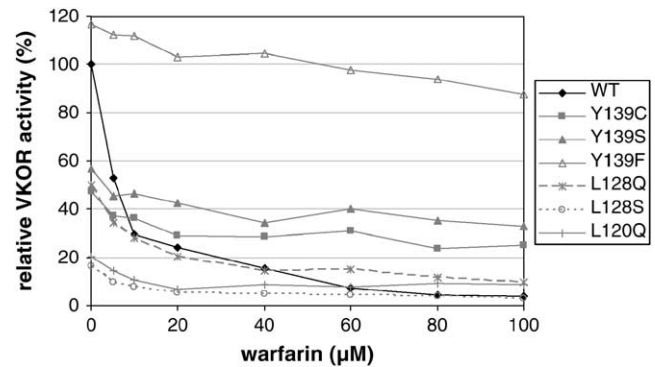


FIGURE 2.—*VKORC1* activity after recombinant expression in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected by *VKORC1* cDNA constructs and enzyme activity was measured as described in MATERIALS AND METHODS. Activity of the wild-type construct in the absence of warfarin was set to 100%. All experiments were run in triplicate.

play an even broader spectrum of resistance mutations with a Tyr139Phe mutation prevalent in Belgium and France, Arg35Pro in France, Ser56Pro as a second mutation in Münsterland, and proof of the Tyr139Cys mutation also occurring in England. In particular, the compound heterozygous rats from Yorkshire (Leu128-Gln/Tyr139Cys) and Burgundy (Arg35Pro/Tyr139Phe) demonstrate that different mutations coexist in the same population. The resistant wild population in Germany (Münsterland, Emsland) appeared genetically rather homogeneous. In this largest field sample 10 discordant results between BCR and genotype as assessed by ARMS-PCR were observed. Upon subsequent sequencing of the entire *VKORC1* coding region in the 10 discordant rats, a novel mutation, Ser56Pro, was found in two animals. Thus, of the 286 BCR-positive (resistant) rats, 3 had no mutations in *VKORC1* and 5 of 147 BCR-negative animals were carriers of the Tyr139-Cys mutation. Although it is possible that the 3 “false-positive” rats had developed resistance by another molecular mechanism, it appears more likely that they reflect failures of the BCR—a complex *in vivo* test, which has proven difficult to standardize. If so, our data allow for a reassessment of sensitivity and specificity of the BCR at 0.989 and 0.965, respectively.

Migration of rat clans and spread of resistance are well-established observations (DRUMMOND 1966). It cannot be ruled out that resistant rats have migrated over considerable distances, *e.g.*, from Denmark to Münsterland or vice versa. Alternatively, the present distribution of variability in *VKORC1* sequence may reflect founder effects in species that are relatively new to Western Europe. Although *R. rattus* has been known in parts of Europe for ~10,000 years, there is evidence that *R. norvegicus* may have been imported for the first time into Denmark from Russia in 1716 (TWIGG 1975). Over the next 80 years they colonized the whole of Western Europe, but there is no information about whether this

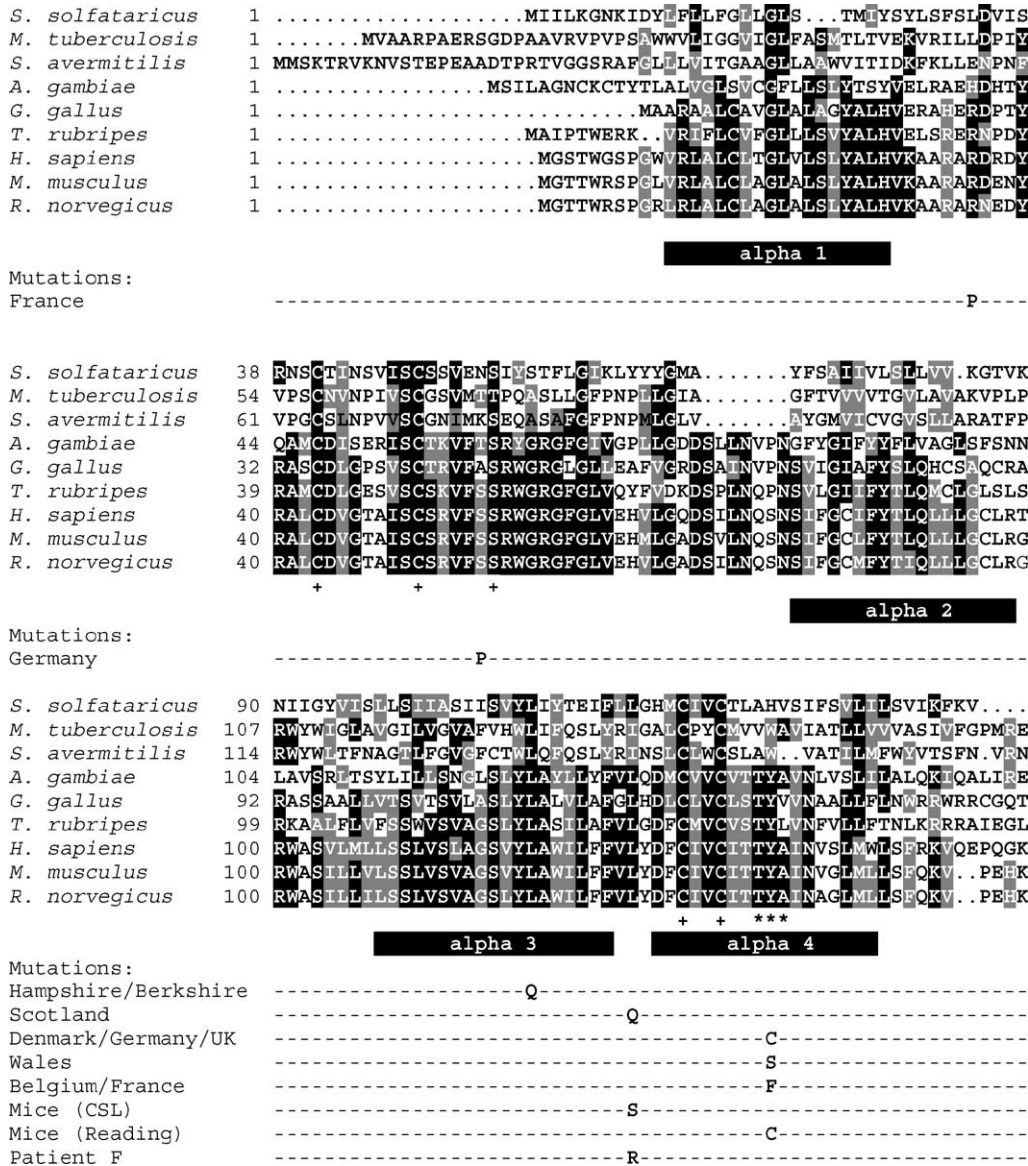


FIGURE 3.—Sequence alignment of selected VKORC1 genes and related sequences. Sequence alignments were done by MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) and Boxshade (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade.html>). Predicted hydrophobic α -helical domains are represented by solid bars below the amino acid sequence. Fully conserved positions (as described by GOODSTADT and PONTING 2004) are indicated by a + sign; the Thr-Tyr-Ala motif is marked by ***. Mutations observed in resistant animals are given by their single-letter amino acid code below the rat wild-type sequence.

was a spread of rats from Denmark or whether other point importations from eastern countries occurred.

To date, mutations in the *VKORC1* gene can be associated with warfarin resistance in three species, humans, rats, and mice. The four human resistant patients identified to date represent independent mutation events (ROST *et al.* 2004). The present data strongly argue for at least seven independent mutation events in *R. norvegicus* and two in mice. Taking into account the extensive use of anticoagulant compounds over >50 years, sequence changes appear to be rare spontaneous events. Apparently, they confer a tremendous selective advantage in the presence of anticoagulant baits.

Effect of mutations on protein function: Upon recombinant expression in HEK293 cells, all but one of the amino acid replacements studied reduced VKORC1 activity and conferred warfarin resistance to varying degrees (Figure 2). The mutation Tyr139Cys showed 50% of wild-type activity in the absence of warfarin. VKOR activity has been measured in liver microsomes from a

subset of 12 wild-caught resistant rats from Münsterland, which were shown to be Cys139 homozygotes. At 2 μ M warfarin, microsomal VKOR activities varied between 72 and 97% of the uninhibited enzyme preparation (THIJSEN and PELZ 2001). This compares well to our *in vitro* data, given that the HEK system may not comprise all the components present in liver (Note that much higher warfarin concentrations are required to inhibit the recombinant enzyme.) All three tyrosine 139 mutations retain higher than wild-type activities in the presence of warfarin even at high concentrations (Figure 2). In contrast, mutations at arginine 35, serine 56, leucine 120, and leucine 128, respectively, reduced VKORC1 activity to very low basal levels. In the presence of an inhibitor, activities of the Leu128, Arg35, and Ser56 mutations fell below our detection limit.

The VKORC1 protein is not fully characterized yet and its catalytic site(s) has not yet been determined experimentally. A multiple sequence alignment of 37 related genes from *archaeobacteria*, *eubacteria*, and *metazoa*

has identified three to four potential hydrophobic transmembrane domains, four cysteines and one serine/threonine to be fully conserved between species, and a CXXC motif known from thioredoxin oxidoreductases (Trx) as an electron donor in a variety of reduction reactions (see Figure 3; GOODSTADT and PONTING 2004; ROST *et al.* 2004). None of these residues is involved in any of the known mutations, but serine 56 immediately precedes the conserved serine/threonine at position 57.

The mutation hotspot at tyrosine139 is part of the hydrophobic sequence motif Thr-Tyr-Ala, which is also found in another dicoumarol and warfarin-sensitive quinone oxidoreductase (NQOR, E.C. 1.6.99.2, previously also known as DT-diaphorase; HALL *et al.* 1972). In NQOR, this tyrosine has been identified as the dicoumarol binding site by photoaffinity labeling and site-directed mutagenesis (MA *et al.* 1992). Given its involvement in three mutation events conferring warfarin resistance, it is tempting to predict that Tyr139 may also be part of the warfarin-binding site in VKORC1.

In the HEK cell system, mutations affecting other amino acid residues have very low enzyme activities even in the absence of warfarin. If this were to reflect the situation *in vivo*, it is hard to conceive how animals could generate sufficient vitamin K_{H2} for effective gamma-carboxylation and clotting activity. Given the great selective pressure of warfarin poisoning, the functional elimination of VKORC1 by mutation may boost the upregulation of other pathways for the recruitment of vitamin K_{H2}. Thus, warfarin resistance could be conferred by knocking down VKORC1 activity while switching to another warfarin-insensitive pathway would secure effective blood clotting for survival. That such compensatory mechanisms may be involved is suggested by the differences observed in dietary vitamin K requirements for some resistant laboratory strains (BELL and CALDWELL 1973; MACNICOLL 1985; THIJSEN 1995). The two Berkshire strains (maintained at CSL, York, and Reading University, respectively) have the same mutation as the Hampshire strain (Leu120Gln), but only the Berkshire colony at Reading has an increased dietary vitamin K requirement that is comparable with that of the Hampshire strain. Furthermore, the Scottish (Leu128Gln) and the Münsterland strains (Tyr139Cys) require low substitution levels whereas the Welsh strain (Tyr139Ser) is dependent on high supplementation doses.

Effect of VKORC1 mutations on rodenticide resistance *in vivo*: From the data presented here, it can be concluded that mutations in VKORC1 are the genetic basis of anticoagulant resistance in all laboratory strains and wild populations of rodents studied. However, at present these mutations alone cannot explain all aspects of resistance that have been reported in the past:

1. The marked difference in vitamin K requirement cannot be deduced from the underlying VKORC1 mutation alone. Further studies are needed to address this question.
2. Resistance to second generation anticoagulants has been reported for a proportion of resistant individuals (ROWE *et al.* 1981; GREAVES *et al.* 1982; MACNICOLL and GILL 1987; JOHNSON 1988) but this cannot be fully explained by variability in VKORC1 sequence data. It has been suggested that secondary or modifier genes confer resistance to second-generation anticoagulants in rats that carry the Rw gene (GREAVES and CULLEN-AYRES 1988; KOHN and PELZ 1999). However, so far all attempts to map the resistance gene(s) for difenacoum or bromadiolone by cross-breeding experiments have failed to identify a single Mendelian locus for the trait(s) (GREAVES and CULLEN-AYRES 1988; A. D. MACNICOLL, unpublished data). Although in recombinant expression systems, VKORC1 alone is capable of reducing vitamin K-2,3-epoxide in a warfarin-sensitive manner (Figure 2; LI *et al.* 2004; ROST *et al.* 2004), it has long been postulated that the enzyme may be part of a larger complex in liver microsomes (CAIN *et al.* 1997). In addition, variation in anticoagulant uptake, metabolism, and clearance may influence the efficacy of rodenticides *in vivo*. Further experiments will address the question whether VKORC1 is sensitive to second-generation anticoagulants.

Rodenticide resistance testing: In this study, we have identified mutations in the VKORC1 gene sequence that correlate very well with the results from BCR tests for warfarin resistance but less well with resistance to second-generation anticoagulants. BCR tests require that rats or mice are trapped alive, transported to a central facility, and subjected to anticoagulant administration and blood sampling, which requires ethical approval and licensing in most countries. We have demonstrated that a PCR-based genetic test for mutations in the VKORC1 gene can successfully identify warfarin-resistant rats trapped in the field. This test could readily be applied to tissue from dead rodents and potentially to host genetic material sloughed off onto fecal pellets, providing a totally noninvasive sampling procedure. This genetic test will provide a simpler, and potentially cheaper, method for monitoring the distribution of warfarin-resistant rats and mice and for evaluating the impact of strategies to manage and overcome resistance.

The authors thank Dagmar Funck, Engelbert Kampling, Ralf Schlieper, and Pam Rummings for technical assistance. Gérard Grolleau greatly helped with his experience of resistance and field contacts to collect samples in France. This work was supported by grants to J.O. from the German National Genome Research Net Cardiovascular Diseases (BMBF-DLR-01GS0424) and from Baxter Germany and a grant from the Water Division of the Ministry of the Flemish Community (K.B.)

LITERATURE CITED

- ALESSANDRONI, P., S. MARCHINI, A. BERNARDO, F. TERRANOVA and P. G. TURILLAZI, 1980 Valutazione della presenza di ratti resistenti al warfarin nella città di Reggio Calabria. *Ann. Ist. Super. Sanita* **16**: 271-286.

- BAERT, K., 2003 *Jaarrapport-Onderzoeksgroep Rattenbestijding*, pp. 18–23. AMINAL afdeling Water, IBW, Geraardsbergen, Belgium.
- BELL, R. G., and P. T. CALDWELL, 1973 Mechanism of warfarin resistance. Warfarin and the metabolism of vitamin K1. *Biochemistry* **12**: 1759–1762.
- BOYLE, C. M., 1960 Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature* **188**: 517.
- CAIN, D., S. M. HUTSON and R. WALLIN, 1997 Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **272**: 29068–29075.
- CAIN, D., S. M. HUTSON and R. WALLIN, 1998 Warfarin resistance is associated with a protein component of the vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in rat liver. *Thromb. Haemost.* **80**: 128–133.
- DE JONGE, J. T., 1994 Resistentieproblemen bij de bestrijding van knaagdieren in Nederland. *Dierplagen en Milieu* **42**: 99–101.
- DODSWORTH, E., 1961 Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic. Engin. Lond.* **3746**: 1668.
- DRUMMOND, D., 1966 Rats resistant to warfarin. *New Sci.* **968**: 771–772.
- FREGIN, A., S. ROST, W. WOLZ, A. KREBSOVA, C. R. MULLER *et al.*, 2002 Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood* **100**: 3229–3232.
- GILL, J. E., G. M. KERINS and A. D. MACNICOLL, 1993 Inheritance of low grade brodifacoum resistance in the Norway rat. *J. Wildl. Manage.* **56**: 809–816.
- GILL, J. E., G. M. KERINS, S. D. LANGTON and A. D. MACNICOLL, 1994 Blood-clotting response test for bromadiolone resistance in Norway rats. *J. Wildl. Manage.* **58**: 454–461.
- GOODSTADT, L., and C. P. PONTING, 2004 Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 289–292.
- GREAVES, J. H., and P. AYRES, 1967 Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature* **215**: 877–878.
- GREAVES, J. H., and P. AYRES, 1969 Linkages between genes for coat colour and resistance to warfarin in *Rattus norvegicus*. *Nature* **224**: 284–285.
- GREAVES, J. H., and P. AYRES, 1973 Warfarin resistance and vitamin K requirement in the rat. *Lab. Anim.* **7**: 141–148.
- GREAVES, J. H., and P. B. CULLEN-AYRES, 1988 Genetics of difenacoum resistance in the rat, pp. 389–397 in *Current Advances in Vitamin K Research*, edited by J. W. SUTTIE. Elsevier, Amsterdam.
- GREAVES, J. H., R. REDFERN and B. ANASUYA, 1976 Inheritance of resistance to warfarin in *Rattus rattus* L. *J. Stored Prod. Res.* **12**: 65–70.
- GREAVES, J. H., D. S. SHEPERD and R. QUY, 1982 Field trials of second-generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J. Hyg.* **89**: 295–301.
- HALL, J. M., C. LIND, M. P. GOLVANO, B. RASE and L. ERNSTER, 1972 Structure and function of oxidation-reduction enzymes, pp. 433–443, edited by A. AKESSON and A. EHRENBERG. Pergamon Press, Oxford.
- HUSSAIN, I., 1998 Susceptibility to anticoagulants and the development of physiological resistance in *Rattus norvegicus* and *Bandicota bengalensis*. Ph.D. Thesis, University of Reading, Reading, UK.
- JACKSON, W. B., and A. D. ASHTON, 1986 Case histories of anticoagulant resistance, pp. 355–369 in *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, edited by National Research Council. National Academy Press, Washington, DC.
- JOHNSON, R. A., 1988 Performance studies with the new anticoagulant rodenticide, flocoumafen, against *Mus domesticus* and *Rattus norvegicus*. *Eur. Bull. Plant Protect. Org.* **18**: 481–488.
- KERINS, G. M., N. DENNIS, H. ATTERBY, J. E. GILL and A. D. MACNICOLL, 2001 Distribution of resistance to anticoagulant rodenticides in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in England 1995–98, pp. 149–159 in *Advances in Vertebrate Pest Management II*, edited by H.-J. PELZ, D. P. COWAN and C. J. FEARE. Filander Verlag, Fürth, Germany.
- KOHN, M. H., and H. J. PELZ, 1999 Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat. *Mamm. Genome* **10**: 696–698.
- LI, T., C. Y. CHANG, D. Y. JIN, P. J. LIN, A. KHVOROVA *et al.*, 2004 Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* **427**: 541–544.
- LODAL, J., 2001 Distribution and levels of anticoagulant resistance in rats (*Rattus norvegicus*) in Denmark, pp. 139–148 in *Advances in Vertebrate Pest Management II*, edited by H.-J. PELZ, D. P. COWAN and C. J. FEARE. Filander Verlag, Fürth, Germany.
- LOWENTHAL, J., and J. A. MACFARLANE, 1964 The nature of the antagonism between vitamin K and indirect anticoagulants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **143**: 273–277.
- LUND, M., 1984 Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides. *Proc. Vertebrate Pest Conf.* **11**: 89–94.
- MA, Q., K. CUI, F. XIAO, A. Y. LU and C. S. YANG, 1992 Identification of a glycine-rich sequence as an NAD(P)H-binding site and tyrosine 128 as a dicumarol-binding site in rat liver NAD(P)H:quinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**: 22298–22304.
- MACNICOLL, A. D., 1985 A comparison of warfarin resistance and liver microsomal vitamin K epoxide reductase activity in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **840**: 13–20.
- MACNICOLL, A. D., and J. E. GILL, 1987 The occurrence and significance of rodenticide resistance in the UK, pp. 85–95 in *British Crop Protection Council Monograph*, No. 37. British Crop Protection Council, Thornton Heath, UK.
- MACNICOLL, A. D., and J. E. GILL, 1993 Revised methodology for a blood clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Eur. Plant Protect. Org. Bull.* **23**: 701–707.
- MARTIN, A. D., L. C. STEED, R. REDFERN, J. E. GILL and L. W. HUSON, 1979 Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Lab. Anim.* **13**: 209–214.
- MUHR, A. C., 1981 Zur Problematik der Hausmausbekämpfung, resistenzprobleme und möglichkeiten ihrer überwindung, pp. 93–109 in *Aktuelle Probleme der Bekämpfung und Abwehr von Ratten und Hausmäusen*, edited by I. IGLISCH. Pentagon Publishing, Frankfurt, Germany.
- MYLLYMÄKI, A., 1995 Anticoagulant resistance in Europe: appraisal of the data from the 1992 Eppo questionnaire. *Pesticide Sci.* **43**: 69–72.
- NAGANUMA, K., A. FUJITA, N. TANIGUCHI and S. TAKADA, 1981 Warfarin susceptibility in the roof rat, *Rattus rattus*, in some locations of Tokyo. *Japan. J. Sanit. Zool.* **32**: 243–245.
- NELSESTUEN, G. L., T. H. ZYTKOVICZ and J. B. HOWARD, 1974 The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.* **249**: 6347–6350.
- PELZ, H. J., 2001 Extensive distribution and high frequency of resistance to anticoagulant rodenticides in rat populations from north-western Germany, pp. 161–170 in *Advances in Vertebrate Pest Management II*, edited by H.-J. PELZ, D. P. COWAN and C. J. FEARE. Filander Verlag, Fürth, Germany.
- PRESCOTT, C. V., 1996 A preliminary study of the genetics of resistance in house mice, pp. 83–87 in *Proceedings of the 17th Vertebrate Pest Conference*, edited by R. M. TIMM and A. C. CRABB. University of California, Davis, CA.
- PRESNELL, S. R., and D. W. STAFFORD, 2002 The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb. Haemost.* **87**: 937–946.
- ROST, S., A. FREGIN, V. IVASKEVICIUS, E. CONZELMANN, K. HOERTNAGEL *et al.*, 2004 Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* **427**: 537–541.
- ROWE, F. P., C. J. PLANT and A. BRADFIELD, 1981 Trials of the anticoagulant rodenticides bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus* L.). *J. Hyg.* **87**: 171–177.
- SADOWSKI, J. A., C. T. ESMON and J. W. SUTTIE, 1976 Vitamin K-dependent carboxylase. Requirements of the rat liver microsomal enzyme system. *J. Biol. Chem.* **251**: 2770–2776.
- SAUNDERS, G. R., 1978 Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney, NSW. *Search* **9**: 39–40.
- SIDDIQI, Z., and W. D. BLAINE, 1982 Anticoagulant resistance in house mice in Toronto, Canada. *Environ. Health Rev.* **32**: 49–51.
- STENFLO, J., P. FERNLUND, W. EGAN and P. ROEPSTORFF, 1974 Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 2730–2733.
- THIJSEN, H. H. W., 1995 Warfarin-based rodenticides: mode of action and mechanism of resistance. *Pesticide Sci.* **43**: 73–78.
- THIJSEN, H. H. W., and H.-J. PELZ, 2001 Sensitive and selective estimation of coumarin resistance by in vitro vitamin K epoxide reductase assay, pp. 181–192 in *Advances in Vertebrate Pest Manage-*

- ment II*, edited by H.-J. PELZ, D. P. COWAN and C. J. FEARE. Filander Verlag, Fürth, Germany.
- TWIGG, G., 1975 *The Brown Rat*. David & Charles, Newton Abbot, UK.
- WALLACE, M. E., and F. J. MACSWINEY, 1976 A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *J. Hyg.* **76**: 173–181.
- WALLIN, R., and L. F. MARTIN, 1985 Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J. Clin. Invest.* **76**: 1879–1884.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1982 Instructions for determining the susceptibility or resistance of rodents to anticoagulant rodenticides. WHO Vector Biology and Control Series 82, Vol. 843, p. 9.
- YE, S., S. DHILLON, X. KE, A. R. COLLINS and I. N. DAY, 2001 An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* **29**: E88–88.

Communicating editor: C. A. KOZAK

7.5 Anlage 5

Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: Evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thrombosis and Hemostasis*.

Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis

Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1

Evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin

Simone Rost¹, Andreas Fregin¹, Mirja Hünerberg¹, Carville G. Bevans², Clemens R. Müller¹, Johannes Oldenburg^{1,3,4}

¹Institute of Human Genetics, University of Würzburg, Biocenter, Würzburg, Germany

²Department of Structural Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main, Germany

³Institute of Transfusion Medicine and Immunohaematology, DRK Blood Donor Service Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt/M, Germany

⁴Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine, University Clinic Bonn, Bonn, Germany

Summary

Coumarin and homologous compounds are the most widely used anticoagulant drugs worldwide. They function as antagonists of vitamin K, an essential cofactor for the posttranslational γ -glutamyl carboxylation of the so-called vitamin K-dependent proteins. As vitamin K hydroquinone is converted to vitamin K epoxide (VKO) in every carboxylation step, the epoxide has to be recycled to the reduced form by the vitamin K epoxide reductase complex (VKOR). Recently, a single coumarin-sensitive protein of the putative VKOR enzyme complex was identified in humans (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, VKORC1). Mutations in VKORC1 result in two different phenotypes: warfarin resistance (WR) and multiple coagulation factor

deficiency type 2 (VKCFD2). Here, we report on the expression of site-directed VKORC1 mutants, addressing possible structural and functional roles of all seven cysteine residues (Cys16, Cys43, Cys51, Cys85, Cys96, Cys132, Cys135), the highly conserved residue Ser/Thr57, and Arg98, known to cause VKCFD2 in humans. Our results support the hypothesis that the C132-X-X-C135 motif in VKORC1 comprises part of the redox active site that catalyzes VKO reduction and also suggest a crucial role for the hydrophobic Thr-Tyr-Ala motif in coumarin binding. Furthermore, our results support the concept that different structural components of VKORC1 define the binding sites for vitamin K epoxide and coumarin.

Keywords

Vitamin K, VKOR, warfarin, CXXC motif, mutagenesis

Thromb Haemost 2005; 94: 780–6

Introduction

Coumarins are widely used for oral anticoagulant therapy in humans and, in much higher dosage relative to body mass, also as rodenticides for pest control. They act as antagonists of vitamin K, which functions as a coenzyme for the posttranslational carboxylation of glutamate residues to γ -carboxyglutamate (Gla) in vitamin K-dependent proteins, as first characterized for prothrombin (1). Gla-containing proteins are not only involved in hemostasis (coagulation factors FII, FVII, FIX, FX; Proteins C, S and Z (Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-Dependent Biosynthesis of γ -Carboxyglutamic Acid. Blood 1999;93:1798–808), but also in bone metabolism (osteocalcin [2]), soft-tissue calcification (matrix Gla-protein [3]), as well as in cell proliferation and apoptosis (growth-arrest-specific pro-

tein 6, Gas6 [4]) and in direct intercellular signalling and homeostasis at gap junctions (5). Modification of these proteins is catalysed by the endoplasmic γ -glutamyl carboxylase, which dually functions as an epoxide synthase because it converts the cofactor vitamin K hydroquinone into vitamin K epoxide (6). Overall, the carboxylation process is dependent on rapid recycling of vitamin K by the vitamin K epoxide reductase (VKOR) complex, which has been enriched in native membrane fractions and studied by several groups (7–9).

Recently, a first single protein component of the putative VKOR enzyme complex has been identified by genetic linkage analysis and positional cloning based on sequence similarity between rat and human (10) and, independently, by serial siRNA knockdown of a number of genes from the genetic locus identified for VKCFD2 in humans (11). The identified protein, vit-

Correspondence to:
Johannes Oldenburg, MD, PhD
Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine
University Clinic Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn, Germany
Tel.: +49-228-287-5176, Fax: +49-228-287-6087
E-mail: Johannes.oldenburg@ukb.uni-bonn.de

Received February 2, 2005
Accepted after resubmission July 16, 2005

Grant support:
The study was supported by grants from the DFG (01-100/3), the National Genome Research Net Cardiovascular Diseases (BMBF-DLR-01GS 0424) and Baxter to J.O.

Prepublished online September 10, 2005 DOI: 10.1160/TH05-02-0082

amin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1), was concomitantly identified as the molecular target for coumarin drugs (10, 11). Mutations in VKORC1 result either in resistance to coumarin derivatives (warfarin resistance, WR) or in a rare bleeding disorder known as multiple coagulation factor deficiency type 2 (VKCFD2) (10, 12).

VKORC1 is an 18 kDa hydrophobic protein resident in the endoplasmic reticulum membrane and without significant homology to other proteins. Hydrophobicity plots and secondary structure predictions suggest a topology including 3 to 4 α -helical transmembrane segments (13, 14). With exception of the amino acid residues which were found to be mutated in WR and VKCFD2, functionally relevant domains have yet to be identified. In a bioinformatic analysis of 36 VKORC1 homologous protein sequences from plants, bacteria, archaea, vertebrates and arthropods, Goodstadt and Ponting (14) identified Cys43, Cys51, Cys132, Cys135 and Ser57 as completely conserved in all species they surveyed. Because of the absence of other conserved polar residues, they proposed that these five amino acids should comprise catalytic site residues for the VKORC1 protein. Cys132 and Cys135 were predicted to form a thioredoxin-like CXXC motif, which is known to be involved in numerous redox reactions (15). The physiologically relevant electron donor for the VKOR reaction has not yet been identified, but a thioredoxin-like system has been proposed to provide reducing equivalents to VKORC1 (16, 17). Goodstadt and Ponting (14) suggest that sulfhydryl groups of the Cys132-X-X-Cys135 motif may initiate the reduction of vitamin K-epoxide by a mechanism similar to thioredoxin oxidoreductases.

The development of more effective VKORC1-targeted anticoagulants will depend on the elucidation of the structure and function of VKORC1. As a first step toward reaching this goal, we have used site-directed mutagenesis and recombinant expression to produce mutant VKORC1 proteins in order to test the requirement for highly conserved individual amino acid residues in maintaining protein structure (e.g., disulfide bonds), enzyme activity, and for preserving binding and pharmacological efficacy of warfarin.

Materials and methods

Site directed mutagenesis

Individual amino acid residues of the VKORC1 protein were altered by site-directed mutagenesis and VKOR activities were measured after recombinant expression in eukaryotic cells. Mutations were introduced according to the instructions for the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam, NL) to the human VKORC1 cDNA (NM_024006) cloned in the pCEP4 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, California) with or without addition of an N-terminal FLAG tag (M-DYKDDDDK). Mutagenic primer pairs were about 30 base pairs in length and flanked the desired mutation located in the middle of both complementary sequences. Primer sequences are available on request.

Expression studies

HEK293-EBNA cells (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were grown in MEM medium containing 15% fetal bovine serum and 250 μ g/ml geneticin (GIBCO, Paisley, UK) under growth con-

ditions as stated by the supplier. Cells that were 20%-30% confluent were transfected with wildtype and mutated cDNA constructs by the calcium phosphate method. For each 10 cm culture dish, 10 μ g cDNA construct was added to 250 mM CaCl₂ in a total volume of 500 μ l distilled water. The same volume of buffer containing 50 mM BES, 280 mM NaCl and 1.4 mM Na₂HPO₄, was added dropwise while mixing gently. After incubation at room temperature for 20 min in order to form a precipitate, the transfection mix was added to the cells. Medium was changed after 12 h. After another 24 h, transfected cells were harvested by scraping. Cell pellets were lysed in 25mM imidazole (pH 7.6), 0.5% CHAPS and 50% glycerol.

VKOR activity assay

VKOR enzymatic activity was measured in whole-cell extracts according to published procedures (18). For each reaction, 30 μ l of lysed cells, 8 μ M vitamin K 2,3-epoxide (in ethanol) as substrate, 5 mM dithiothreitol providing reducing equivalents, and 5 mM CaCl₂ were dissolved in buffer B (25mM imidazole (pH 7.6), 0.5% CHAPS) to a final volume of 500 μ l. After incubation at 30°C for 1 h, the remaining substrate and the product (vitamin K quinone) were extracted with isopropanol:hexane (3:2), dried under vacuum and redissolved in methanol. Subsequently, vitamin K quinone was separated from the epoxide by isocratic HPLC on a reversed phase C-18 column using methanol as the mobile phase. During the extraction procedure, vitamin K hydroquinone was quantitatively oxidized to the quinone form. Measurements were run in triplicate and VKOR activity was calculated as percent of vitamin K epoxide converted into vitamin K quinone. Vitamin K 2,3-epoxide was prepared by oxidation of vitamin K quinone (Sigma-Aldrich) with H₂O₂. Warfarin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in DMSO (< 1 % of final activity assay volume) was added prior to adding vitamin K epoxide for samples used to determine warfarin inhibition.

Western blotting

Microsomal proteins were prepared from cultured cells and separated on 4–12% NuPAGE gels (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After semi-dry blotting to nitrocellulose membranes (Hybond N+, Amersham-Bioscience, Freiburg, Germany), the FLAG peptide was detected by monoclonal antibody M2 (Sigma-Aldrich) and developed with an alkaline phosphatase-coupled secondary antibody (Cell signalling technologies, Beverly, MA, USA).

Bioinformatic analysis of CXXC motifs

The NCBI Structure database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=structure>) was queried with the term "thioredoxin" to search for high resolution structures including the CXXC motif. Selected thioredoxin PDB structure files (e.g., 1T00, 1XWC) were downloaded from the PDB Structure Explorer website (<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1T00>) and viewed using Swiss-PdbViewer v.3.7 (19; <http://www.expasy.org/spdbv/>) in order to determine the local environment (i.e., secondary structure and bulk solvent accessibility) of these motifs. Predictions of secondary structure and transmembrane sequences were determined for the VKORC1 published primary sequence (10, 11) using online

VKOR activities of Cys51Ser, Cys132Ser and Cys135Ser were almost not detectable by our assay, whereas proteins mutated at Cys16Ser, Cys43Ser, Cys85Ser and Cys96Ser showed 15–30% of wildtype activity. The latter four cysteine residues were also substituted by the small neutral amino acid alanine (Fig. 2). Except for Cys85Ala, which exhibited 70% of VKOR activity, all other alanine variants exhibited VKOR activity that did not differ significantly from that of the serine variants. In a second experiment, a highly conserved Ser/Thr residue at position 57 was substituted by alanine resulting in an almost complete loss of VKOR activity (Fig. 2).

Since the lack of enzyme activity in some mutants could potentially be due to their interference with proper protein expression or folding, we monitored for expression efficiency by Western blotting. Wildtype and mutant cDNAs for Cys51Ser, Ser57Ala, Cys132Ser and Cys135Ser were re-cloned into an expression vector containing a FLAG tag upstream of the VKORC1 cDNA (see *Materials and methods*). VKOR activities of the FLAG-tagged constructs were found similar to non-tagged constructs (data not shown). An aliquot of each transfection assay was subject to Western blotting with anti-FLAG antibody M2. As shown in figure 3, equivalent amounts of recombinant VKORC1 protein were expressed from the various constructs.

Three different naturally occurring mutations at tyrosine 139 have been detected in warfarin resistant rats and mice: Tyr139Cys, Tyr139Ser, Tyr139Phe (20). In a third experiment, glycine, the amino acid with the smallest side chain, was substituted at this position in addition to the three warfarin resistant phenotype residues and VKOR activities were measured (Fig. 4). All four Tyr139 variants retained VKOR activity ranging from 50 to 110% compared to that of the wildtype and demonstrated strong resistance to warfarin inhibition of VKOR activity.

The substitution of arginine98 by tryptophan has been found to completely abolish VKOR activity in patients exhibiting the VKCFD2 phenotype (10). In a fourth experiment, Arg98 was substituted by amino acids structurally more similar to it than to tryptophan: Arg98Lys, Arg98Gln, Arg98Asn, Arg98Glu, Arg98Asp. The recombinant proteins exhibited a broad range of VKOR activity ranging from 20% (Arg98Glu and Arg98Asp) to more than 120% (Arg98Lys) of wildtype in the absence of warfarin (Fig. 5). Upon addition of warfarin, each Arg98 variant displayed graded VKOR activity inhibition that scaled proportionally to the relative uninhibited activities at warfarin concentrations up to 100 μ M, the highest inhibitor concentration tested.

Discussion

In this study, the roles of 12 conserved amino acid residues of the human VKORC1 protein were investigated by site-directed mutagenesis and heterologous expression of the resulting mutant VKORC1 proteins in HEK 293 cells. Firstly, we addressed the roles of the cysteine residues. Based on their evolutionary conservation, four of the seven cysteines in VKORC1 (Cys43, Cys51, Cys132 and Cys135) have been predicted to be essential for the protein's structure and/or function (14). Generally, the sulfhydryl groups of closely adjacent cysteine residues can form intramolecular or intermolecular disulfide bonds, which confer stability on protein structure, alternatively occurring singly in re-

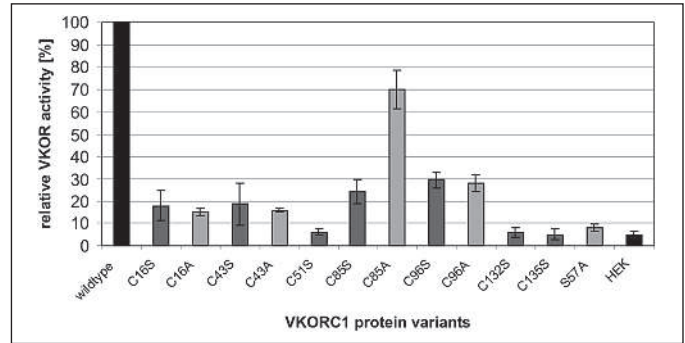


Figure 2: Relative VKOR activities of VKORC1 proteins mutated at cysteine residues and the conserved serine at position 57 after expression in HEK293 cells. Each bar represents the mean (\pm S.E.M.) of three measurements. VKOR activity of the wildtype VKORC1 protein was set to 100% (first bar). Serine variants are shown in dark grey, alanine variants in light grey. VKOR activity in untransfected HEK293 cells is indicated by the last bar. After subtraction of VKOR activity in untransfected HEK293 cells, almost no VKOR activity is remaining in the C51S, C132S, C135S and S57A variants.

duced or oxidized form. Substitution of cysteine's sulfhydryl group by serine's hydroxyl group, for example, eliminates the ability to form disulfide bonds and radically alters the ionization potential of the distal hydrogen. At positions 51, 132 and 135 a substitution of cysteine by serine or alanine substantially abolished VKOR enzymatic activity (Fig. 2). Cys132 and Cys135 have been predicted to be part of a redox center motif which could catalyze the reduction of vitamin K epoxide to vitamin K quinone. If so, the substitution of serine for either cysteine should dramatically reduce or even eliminate VKORC1 activity. Our data from human VKORC1 mutants indicate (Fig. 2), consistent with previous results from the group of Wajih (21) for the rat enzyme, that the replacement of Cys132 or Cys135 by serine substantially eliminates VKOR activity. To explain the very low,

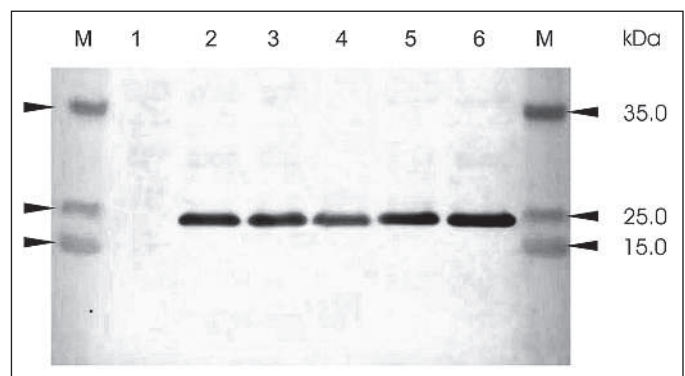


Figure 3: Wildtype and mutated VKORC1 proteins are equally expressed in HEK-293-cells. The VKORC1-pCEP4 construct was fused with an N-terminal FLAG-tag and subjected to mutagenesis. By Western-blot analysis, FLAG-tagged VKORC1 proteins could be detected by the M2 antibody as bands of approximately 23 kDa. No protein is detectable in untransfected HEK-293 cells (lane 1). Wildtype (lane 2) and mutated constructs C51S (lane 3), S57A (lane 4), C132S (lane 5) and C135S (lane 6) produced comparable amounts of protein, suggesting that efficiency of protein expression was not influenced by mutations.

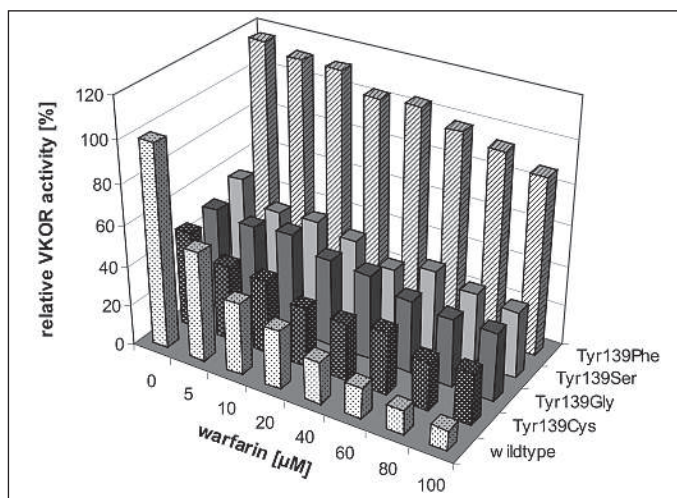


Figure 4: Relative VKOR activities of four Tyr139 protein variants compared to the VKORCI wildtype protein. Basal activity (without inhibitor) of the wildtype was set to 100%. For inhibition studies, warfarin was added to the enzymatic assay at a final concentration of 0 to 100 μM . All activity assays were run in triplicate and are presented as the mean value of each set of replicate measurements.

but detectable, levels of reduced vitamin K that contributed to non-zero basal levels of VKOR activity for these mutants, we cannot rule out the presence of other reductase enzymes capable of reducing vitamin K epoxide that might have been present in the whole-cell extracts that we used for these studies. However, the maximal levels of VKOR activity representing such non-VKOR enzymatic conversion of epoxide to quinone would be bracketed between 0 % and ~5 % as indicated by the negative control HEK cell data (Fig. 2, bar at far right). Thus, the two cysteines of the CIVC motif appear to be essential for VKORCI's re-

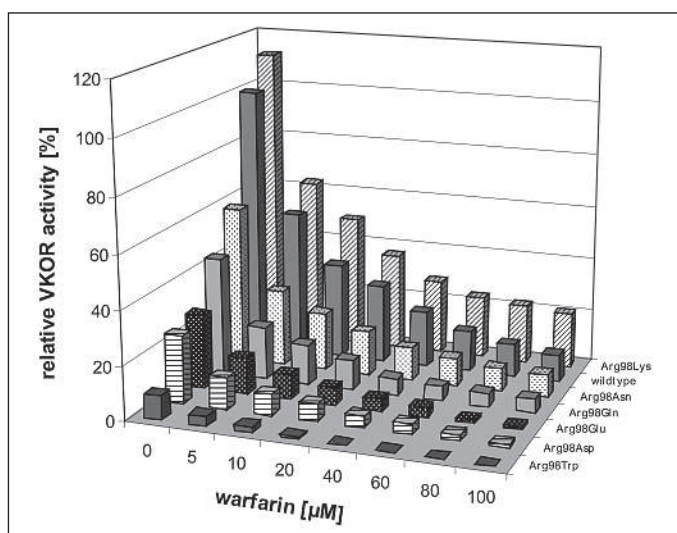


Figure 5: Relative VKOR activities of Arg98 protein variants before and after warfarin inhibition. The Arg98Lys variant shows the highest VKOR activity compared to the wildtype protein. Almost no VKOR activity was measured in the VKORCI protein with the Arg98Trp substitution, a naturally occurring mutation.

ductase activity. We therefore inspected protein sequence databases for similar CIVC motifs and used web-based algorithms that predict protein secondary structure and transmembrane domains. Members of one family of highly conserved proteins, the C-subunits of the Na^+ -transporting NADH:ubiquinone oxidoreductase complexes (NqrC) found in archaea and in pathogenic prokaryotes (22), contain the CIVC motif in the active redox catalytic site buried in the lipid bilayer in a transmembrane α -helix. Additionally, upon inspection of available high resolution thioredoxin structures, we noted that the CXXC motifs of thioredoxins, which are cytoplasmic soluble proteins, were exclusively found at a helix-turn at the bulk solvent-accessible surface of the protein. It was noted that the two residues flanked by the pair of cysteines frequently included a proline (functioning as a "helix breaker") or a polar and nonpolar residue pair, but never two compact, nonpolar residues as for the CIVC motif in VKORCI. The search for other NqrC subunit orthologs revealed the following similar motifs at the redox reaction centre buried in the single transmembrane α -helix: CIVC (*Microbulbifer degradans*); CVVC (*Rhodopirellula baltica* SH 1, *Pirellula* sp.); CLVC (*Nitrosomonas europaea* ATCC 19718, *Azotobacter vinelandii*, *Psychrobacter* sp. 273–4). Similarly, the CXXC motifs of VKORCI and its orthologs (14) notably include the following variations: CIVC (human, rat, silkworm and *Sulfolobus solfataricus*); CVVC (mosquito, *Trypanosoma brucei*); CLVC (fruitfly). VKORCI homolog CXXC motif variations among additional species include CLYC, CFFC, CPYC, CWYC, CSYC, CPWC, CLWC, CGLC, CIFC, and CIYC. All of the VKORCI homologous CXXC motifs are predicted to be found in transmembrane α -helices. Taken together, the similarities in both sequence and predicted location in transmembrane α -helices of the CXXC motifs common between VKORCI orthologs/homologs and NqrC orthologs suggest that the CIVC motif in the VKORCI protein might play a direct role in vitamin K epoxide reduction at the VKOR active site.

At Cys43, and at the less conserved positions 16, 85 and 96, the introduction of a serine resulted in reduced activities of 18, 16, 25 and 30 %, respectively compared to the activity level of wild-type VKORCI. Similar results were obtained when the cysteines were substituted by alanine, with the notable exception of position 85 for which the alanine construct exhibited 74 % of wildtype activity (Fig. 2). Of the two other fully conserved cysteines at positions 43 and 51, only Cys51 appears to be indispensable for full reductase activity, whereas replacement of Cys43 – and the less conserved cysteines 16, 85 and 96 – by serine or alanine resulted in reduced levels of VKOR activity relative to activity of the wild-type. These residues may not be directly involved in the reductase reaction, but may be important for the structural integrity of the protein.

A fully conserved serine/threonine at position 57 was predicted to be part of the reaction centre (14). Its substitution by alanine reduced VKOR activity to background levels (Fig. 2). Serines are generally known to be important residues in active sites of reductases. For example, a single serine-to-arginine substitution in the active site of the ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR) leads to an enzymatically inactive protein with greatly enhanced affinity for its ligand ferredoxin (23). In rat cytochrome P450C24 (CYP24), a single serine residue was identified by af-

finity labelling to be responsible for substrate (vitamin D) binding (24). By analogy, the highly conserved Ser57 in VKORC1 is a potential candidate for the binding site of the substrate vitamin K epoxide.

A mutation screening of warfarin-resistant rodents identified tyrosine 139 as a mutational hot-spot (20). All four mutations of tyrosine 139 studied here exhibited a high VKOR basal activity and resistance to warfarin compared to the wildtype protein (Fig. 4). Tyr139 is located in the hydrophobic linear sequence Thr-Tyr-Ala. The same Thr-Tyr-Ala motif exists in NQOR, another quinone oxidoreductase, which is also sensitive to coumarins and warfarin (25). Photoaffinity labelling and site-directed mutagenesis of NQOR have identified the tyrosine of the Thr-Tyr-Ala motif as the dicoumarol binding site (26). In VKORC1, the Tyr139Phe variant exhibited almost complete warfarin resistance with greater basal VKOR activity than the wildtype. Tyrosine and phenylalanine differ only by a hydroxyl group. Thus, it can be inferred that the hydroxyl group of Tyr139 plays an essential role in warfarin binding to VKORC1.

Arginine 98 was found to be substituted by tryptophan in VKCFD2 patients and VKOR activity was absent for this protein variant (10). Since tryptophan and arginine are structurally very different amino acids, we have replaced Arg98 by structurally more similar amino acids and measured VKOR activities of the mutant proteins. Size and charge of lysine are similar to that of

arginine. Surprisingly, the Arg98Lys variant exhibited even greater VKOR activity than that of the wildtype protein. Glutamine and asparagine are structurally less related to arginine than lysine, but share an uncharged amide group. Arg98Gln and Arg98Asn variants retained about 50% basal VKOR activity. Possessing negatively charged side chains, glutamate and aspartate further reduced VKOR activity to about 20% of wildtype (Fig. 5). Thus, a long, positively charged side chain at position 98 of the VKORC1 protein appears to be essential for efficient function, either for coordination of the substrate, vitamin K epoxide, or for correct protein folding. As shown in figure 6, the hydrophobicity plots are strikingly different for the various substitutions studied here with the most dramatic change seen for Arg98Trp. Apparently, the aromatic ring structure of tryptophan does not fulfill structural or functional requirements for VKOR activity. All Arg98 protein variants examined were sensitive to warfarin (Fig. 5). Thus, Arg98 does not appear to be involved in warfarin binding.

In conclusion, our results support the notion by Wajih et al. (21) that the CIVC motif in VKORC1 is required for VKOR enzymatic activity. By analogy to the NqrC protein family, we suggest that the CIVC motif of VKORC1 is part of the redox centre itself, rather than an electron donor providing reducing equivalents for subsequent reduction of VKO. Our data are also in line with the concept of different binding sites for vitamin K

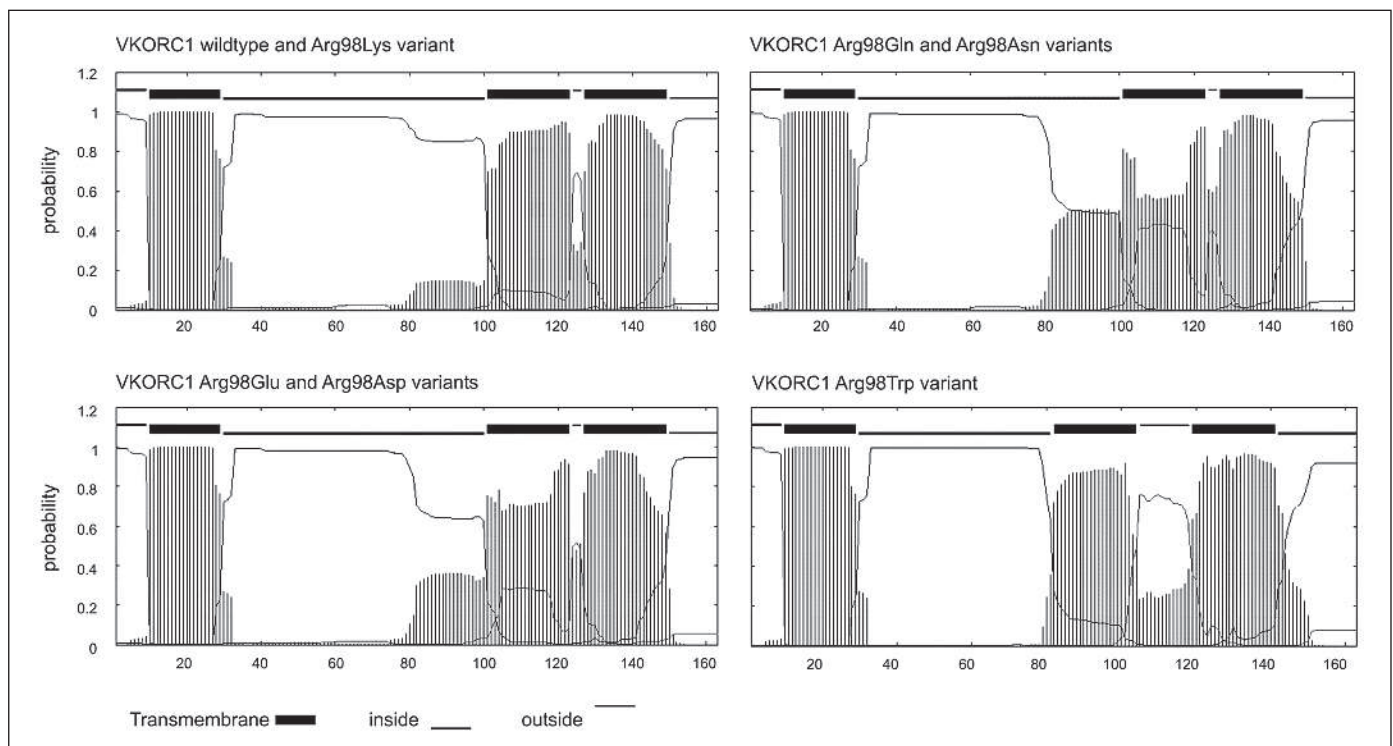


Figure 6: Hydrophobicity plots of VKORC1 proteins mutated at residue 98. The hydropathy (HP) profile of VKORC1 predicts three transmembrane segments (TM) flanking a long luminal loop. Arg98 is located at the boundary between the luminal loop and TM2. Replacement of the basic side chain of Arg98 by Lys does not change the HP profile (top left panel) and even enhances VKOR activity (Fig. 5). The neutral residues Asn and Gln disturb the sharp rise in hydrophobicity between

the loop and TM2 (top right panel). While the HP profile of the acidic residues Glu and Asp does not appear much different, their negative effect on VKOR activity may be due to the change in charge (bottom left panel). Tryptophan at position 98 shifts TM2 and TM3 to the left and to introduce a novel hydrophilic loop between them (bottom right panel). HP plots were generated by the online program TMHMM at <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>.

epoxide and for coumarins as had been postulated from kinetic experiments with partially purified VKOR (9). They further suggest a crucial role for the central tyrosine in a hydrophobic Thr-Tyr-Ala motif in coumarin binding. Since we do not know the physical location of the vitamin K epoxide and warfarin/coumarin binding sites, we are not able to discern between the possibilities that the binding sites occupy overlapping positions within the protein structure or that the binding sites are at distinctly separate locations.

Finally, although coumarin derivatives are in extensive world-wide use and represent the only available class of orally administered anticoagulants, significant side-effects (the rate of adverse reactions has been estimated at 10–17%, including 2–5% of major bleedings [27]) remain a major hurdle to overcome in patient treatment. Understanding the structure and function of the VKORC1 protein will be key to the development of new anticoagulant drugs that target the vitamin K cycle with improved efficacy and reduced side effects.

References

1. Stenflo J, Fernlund P, Egan W et al. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 2730–3.
2. Hauschka PV, Reid ML. Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. *J Biol Chem* 1978; 253: 9063–8.
3. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 765–71.
4. Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1996; 12: 471–80.
5. Locke D, Koreen IV, Hertzberg EL et al. Isoelectric focusing and post-translational modifications of Cx26 and Cx32. *Mol Biol Cell* 2004; 15S: 266a.
6. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr* 2000; 130: 1877–80.
7. Mukharji I, Silverman RB. Purification of a vitamin K epoxide reductase that catalyzes conversion of vitamin K 2,3-epoxide to 3-hydroxy-2-methyl-3-phytyl-2,3-dihydronaphthoquinone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2713–7.
8. Cain D, Hutson SM, Wallin R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 1997; 272: 29068–75.
9. Begent LA, Hill AP, Steventon GB et al. Characterization and purification of the vitamin K1 2,3 epoxide reductases system from rat liver. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 481–6.
10. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537–41.
11. Li T, Chang CY, Jin DY et al. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004; 427: 541–4.
12. Oldenburg J, von Brederlow B, Fregin A et al. Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex. *Thromb Haemostasis* 2000; 84: 937–41.
13. Tie JK, Nicchitta C, von Heijne G et al. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J Biol Chem* 2005; 280: 16410–6.
14. Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 289–92.
15. Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 30: 421–55.
16. Soute BA, Groenen-van Dooren MM, Holmgren A et al. Stimulation of the dithiol-dependent reductases in the vitamin K cycle by the thioredoxin system. Strong synergistic effects with protein disulphide-isomerase. *Biochem J* 1992; 281: 255–9.
17. Thijssen HH, Janssen YP, Vervoort LT. Microsomal lipoamide reductase provides vitamin K epoxide reductase with reducing equivalents. *Biochem J* 1994; 297: 277–80.
18. Wallin R, Martin LF. Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J Clin Invest* 1985; 76: 1879–84.
19. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18: 2714–23.
20. Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 2005; May 6; [Epub ahead of print].
21. Wajih N, Sane DC, Hutson SM et al. Engineering of a recombinant vitamin K-dependent -carboxylation system with enhanced -carboxyglutamic acid (Gla) forming capacity: Evidence for a functional CXXC RedOx center in the system. *J Biol Chem* 2005; 280: 10540–7.
22. Häse CC, Fedorova ND, Galperin MY et al. Sodium ion cycle in bacterial pathogens: Evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 353–70.
23. Thomsen-Zieger N, Pandini V, Caprini G et al. A single in vivo-selected point mutation in the active center of *Toxoplasma gondii* ferredoxin-NADP+ reductase leads to an inactive enzyme with greatly enhanced affinity for ferredoxin. *FEBS Lett* 2004; 576: 375–80.
24. Omdahl JL, Swamy N, Serda R et al. Affinity labeling of rat cytochrome P450C24 (CYP24) and identification of Ser57 as an active site residue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89–90: 159–62.
25. Hall JM, Lind C, Golvano MP et al. In: Akenson A, Ehrenberg A, editors. *Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes*. Oxford: Pergamon Press 1972; 433–43.
26. Ma Q, Cui K, Xiao F et al. Identification of a glycine-rich sequence as an NAD(P)H-binding site and tyrosine 128 as a dicumarol-binding site in rat liver NAD(P)H:quinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 22298–304.
27. Kuijper PM, Hutten BA, Prins MH et al. Prediction of the risk of bleeding during anticoagulant treatment for venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 1999; 159: 457–60.

7.6 Anlage 6

Compound heterozygous mutations in the γ -glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors.

British Journal of Haematology.

Compound heterozygous mutations in the γ -glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors

Simone Rost,¹ Andreas Fregin,¹ Dieter Koch,² Markus Compes,³ Clemens R. Müller¹ and Johannes Oldenburg^{1,4,5}

¹Institute of Human Genetics, University Würzburg, Würzburg, ²Kliniken der Stadt Köln, Children Hospital, Köln, ³Kliniken der Stadt Köln, Krankenhaus Merheim, Institute of Transfusion Medicine, Köln, ⁴Institute of Transfusion Medicine and Immunohaematology, University Clinic Frankfurt, Frankfurt, and ⁵Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine, University Clinic Bonn, Bonn, Germany

Received 24 March 2004; accepted for publication 19 May 2004

Correspondence: Johannes Oldenburg, Institute of Transfusion Medicine and Immunohaematology, DRK Blood Donor Service Baden Württemberg-Hessen, University Clinic Frankfurt, Sandhofstr. 1, D-60528 Frankfurt, Germany.
E-mail: joldenburg@bsdhessen.de

Summary

Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent coagulation factors II, VII, IX, X, protein C, S and protein Z (VKCFD) is a very rare autosomal recessive inherited bleeding disorder. The phenotype may result from functional deficiency of either the γ -glutamyl carboxylase (GGCX) or the vitamin K epoxide reductase (VKOR) complex. We report on the third case of VKCFD1 with mutations in the γ -glutamyl carboxylase gene, which is remarkable because of compound heterozygosity. Two mutations were identified: a splice site mutation of exon 3 and a point mutation in exon 11, resulting in the replacement of arginine 485 by proline. Screening of 100 unrelated normal chromosomes by restriction fragment length polymorphism and denaturing high-performance liquid chromatography analysis excluded either mutation as a frequent polymorphism. Substitution of vitamin K could only partially normalize the levels of coagulation factors. It is suggested that the missense mutation affects either the propeptide binding site or the vitamin K binding site of GGCX.

Keywords: VKCFD, γ -glutamyl carboxylase gene, mutation analysis, vitamin K.

Vitamin K functions as a cofactor for the conversion of glutamic acid (Glu) to γ -carboxyglutamic acid (Gla) in the Gla domains of vitamin K-dependent precursor proteins (Furie *et al*, 1999). This post-translational modification is catalysed by the microsomal enzyme, vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase (GGCX), a membrane protein of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus (Suttie *et al*, 1980). Purification, isolation and molecular cloning of the human γ -carboxylase (Wu *et al*, 1991a,b) identified a single polypeptide chain of 758 amino acids with a molecular mass of about 94 kDa. The human gene for γ -carboxylase is localized on the short arm of chromosome 2 (2p12), spans about 13 kb and contains 15 exons (Kuo *et al*, 1994; Wu *et al*, 1997a).

Carboxylation enables the blood coagulation factors II, VII, IX and X and the blood coagulation regulatory proteins C, S and protein Z to bind Ca^{2+} by their Gla residues. After a subsequent metal-dependent conformational change, these proteins can associate with phospholipid membranes (Sperling *et al*, 1978; Borowski *et al*, 1986), which is essential for their full activation.

Each enzymatic reaction that converts one Glu to a Gla results in the oxidation of one molecule vitamin K hydroquinone (KH_2) to vitamin K epoxide ($\text{K} > \text{O}$) because of the additional epoxidase function of the GGCX. For a sufficient carboxylation of vitamin K-dependent proteins a continuous recycling of $\text{K} > \text{O}$ to KH_2 is required, and is accomplished by the warfarin-sensitive vitamin K epoxide reductase (VKOR) complex (Cain *et al*, 1997).

Combined deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors (VKCFD) is a rare bleeding disorder that can be caused either by a mutation in the γ -carboxylase gene (VKCFD1) or by a defect in the VKOR complex (VKCFD2) (Pauli *et al*, 1987; Oldenburg *et al*, 2000). Only three cases of VKCFD1 caused by defects in the γ -carboxylase have been described to date (Brenner *et al*, 1998; Spronk *et al*, 2000; Mousallem *et al*, 2001). Brenner *et al* (1998) detected a missense mutation in exon 9 of the GGCX gene resulting in the substitution of arginine 394 by leucine. The patients reported by Spronk *et al* (2000) and Mousallem *et al* (2001) originated from the same region of Lebanon and carried a point mutation in exon 11

leading to the conversion of a tryptophan codon to a serine codon at position 501. In all three cases, homozygous base exchanges inherited from consanguineous asymptomatic parents were responsible for the bleeding symptoms, demonstrating the autosomal recessive inheritance of this disease.

Here, we report on the first case of compound heterozygosity in the γ -carboxylase gene leading to VKCFD1. We detected a heterozygous splice site mutation in exon 3 and an additional point mutation in exon 11 resulting in the replacement of an arginine by a proline.

Patients and methods

Case report

A one-year-old boy from Germany underwent a surgical intervention because of persistent Ductus Arteriosus Botalli. Preoperative coagulation testing revealed a prolonged prothrombin time with a corresponding decrease of the activities of all vitamin K-dependent coagulation factors to 21–42% of normal: e.g. factor (F) II, 21%; FVII, 42%; and FX, 36%. Liver dysfunction was excluded by normal values for FV, cholinesterase and total protein. Sonography of the liver showed no abnormalities. After birth the boy presented with a slightly dysmorphic face, resembling Williams–Beuren syndrome. However, genetic testing did not confirm the diagnosis and later physical and mental development of the boy was normal. Retrospectively, the dysmorphic face might be explained as very mild symptoms of a warfarin embryopathy due to the deficiency of vitamin K-dependent proteins. There was no bleeding history, although the patient underwent diagnostic heart catheterization. Oral substitution of 2 mg vitamin K/d led to partial restoration of coagulation factor activities to about 60% (FII 40%, FVII 62% and FX 65%), but factor levels did not normalize during a 6-week period of vitamin K substitution. The non-consanguineous parents exhibited normal coagulation parameters and the family history was negative for bleeding episodes.

Molecular analysis of the γ -carboxylase gene

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of all 15 exons, including intron–exon borders, of the γ -carboxylase gene was performed using primers and conditions according to Oldenburg *et al* (2000) and both strands of the PCR templates were screened for mutations by direct sequencing (Beckman Coulter CEQ2000). Informed consent was given according to the Declarations of Helsinki.

The presence of mutations in the normal population was tested by either restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis or denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). RFLP analysis was carried out for the splice site mutation in exon 3 by digestion of the PCR templates with DdeI (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). Subsequently, the fragments were separated on an ethidium bromide-stained 2% agarose gel.

The point mutation in exon 11 was analysed after PCR amplification by DHPLC using a denaturing temperature of 60°C and an acetonitrile gradient of 52–61%.

Results

Two novel mutations were identified in the γ -carboxylase gene of the VKCFD patient. The first one is a splice site mutation of exon 3, a G to T transversion of the last nucleotide of intron 2 (Fig 1A). As this mutation is associated with the loss of a cleavage site of the restriction enzyme DdeI, we were able to test the patient's parents by RFLP analysis, which showed that this mutation was transmitted by the father (Fig 1B). Further sequence analysis revealed a point mutation in exon 11, resulting in the conversion of an arginine codon (CGT) to a proline codon (CCT) at residue 485 (Fig 2A–C). DHPLC analysis was used for mutation screening. As expected, the R485P mutation was inherited from the mother (data not shown). Neither mutation was found in 100 control chromosomes of unrelated healthy Europeans.

Discussion

This is the latest of now four reported cases with a defect in the γ -carboxylase gene leading to VKCFD1, in which compound heterozygosity occurred. The heterozygous splice site mutation concerning exon 3 may lead to a truncated protein with reduced or lost function. The second point mutation in exon 11, resulting in a substitution of an arginine by a proline at residue 485 is interesting because of several features. First, it is

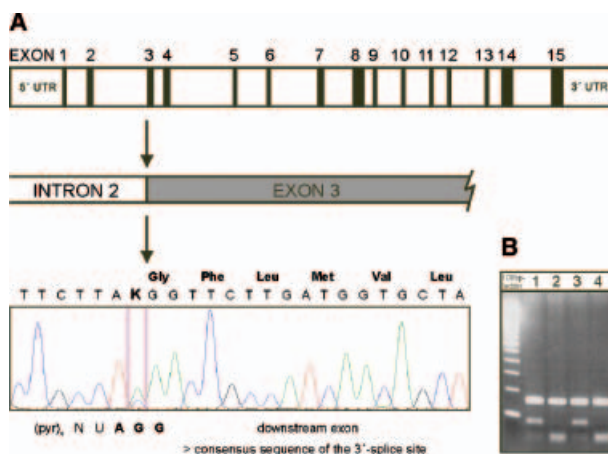


Fig 1. Identification of the splice site mutation. (A) Schematic gene structure of the γ -glutamyl carboxylase and the splice-acceptor site of intron 2 in detail. The electropherogram shows a G–T transversion of the 3'–splice site in intron 2, which causes a loss of exon 3 in the protein. (B) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the splice site mutation using the restriction enzyme DdeI. This digestion either leads to 79 bp and 153 bp fragments in case of mutation (lane 1, patient; lane 3, father) or to 36, 43 and 153 bp fragments in the wildtype (lane 2, mother; lane 4, negative control).

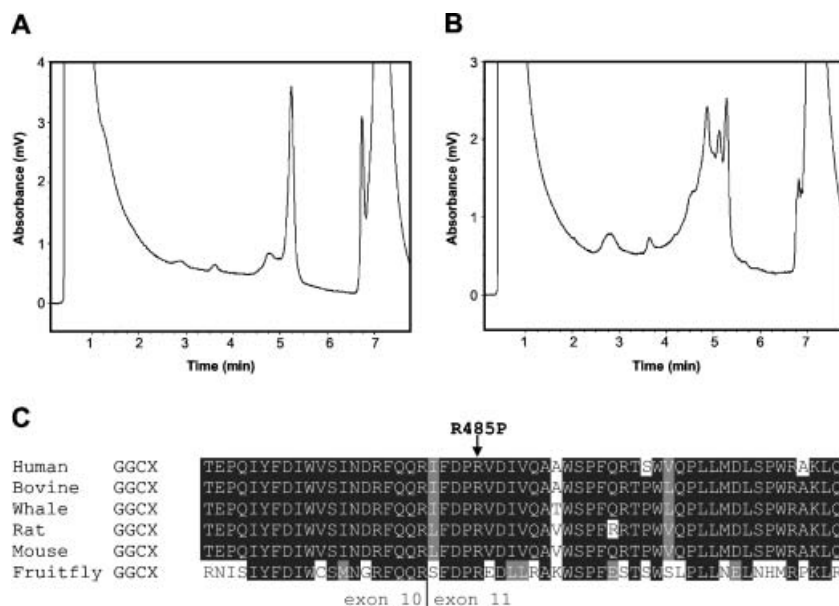


Fig 2. Analysis of the R485P mutation. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) analysis of exon 11 of the *GGCX* gene in a negative control (A) and in the index patient (B). Hundred healthy blood donors were screened for the R485P mutation using this method. (C) Sequence alignment of parts of exon 10 and 11 in the *GGCX* protein of human, bovine, whale, mouse, rat and fruitfly. The mutated arginine 485 lies within a highly conserved region of the protein indicating an important role of this *GGCX* domain.

located in a conserved motif of the γ -carboxylase between residues 365 and 496 (Begley *et al*, 2000). In particular, the arginine at residue 485 is conserved in human, bovine, rat, mouse and whale, suggesting that this amino acid is important for enzyme activity. Second, the positively charged arginine is altered to the 'imino' acid proline, which is known to break α -helices and thus has a distinct influence on protein architecture. Third, the R485P mutation may affect either the propeptide binding site or the vitamin K binding site. The propeptide binding site has been mapped to amino acids 50–225 of the γ -carboxylase (Yamada *et al*, 1995), to amino acids 349–500 (Wu *et al*, 1997b) and to amino acids 495–513 (Lin *et al*, 2002). Site-directed mutagenesis demonstrated that regions around residues 234, 406 and 503 partly define the propeptide binding site (Sugiura *et al*, 1996). According to Wu *et al* (1997b) and Lin *et al* (2002), the R485P mutation would be located close to or directly in the propeptide binding site of the γ -carboxylase. Most recently, Soute *et al* (2004) demonstrated, by expression studies in two patients with a W501S mutation, that this mutation decreased the affinity of the γ -carboxylase for the propeptide of its substrates. The clinical description of the R485P patient with respect to only partial normalization of coagulation factor activities after substitution of vitamin K is similar to the W501S patient. Thus the R485 phenotype might be caused by the same mechanism of a reduced propeptide binding. This should result in a shorter residence time of the substrate on the γ -carboxylase, leading to poorly carboxylated, partially inactive products (Mutucumarana *et al*, 2000).

Vitamin K administration only partially normalized the levels of coagulation factors in the examined patient, suggesting the R485P mutation may also affect vitamin K binding. The affinity of vitamin K binding depends on the covalent attachment of the propeptide to the propeptide binding site and the subsequent binding of the Gla domain

(Knobloch & Suttie, 1987; Soute *et al*, 1992). Therefore, the mutation need not be located within the vitamin K binding site in order to have an effect on vitamin K binding. Under physiological conditions the concentration of vitamin K is near or even below its K_m . Vitamin K administration may increase the carboxylation rate, leading to a partial correction of the combined deficiency of vitamin K-dependent proteins (Spronk *et al*, 2000).

Recombinant expression studies will further help to relate these mutations to the functional properties of the enzyme.

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG OI 100/4-1) and the University Clinic Bonn (BONFOR).

References

- Begley, G.S., Furie, B.C., Czerwiec, E., Taylor, K.L., Furie, G.L., Bronstein, L., Stenflo, J. & Furie, B. (2000) A conserved motif within the vitamin K-dependent carboxylase gene is widely distributed across animal phyla. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36245–36249.
- Borowski, M., Furie, B.C., Bauminger, S. & Furie, B. (1986) Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 14969–14975.
- Brenner, B., Sanchez-Vega, B., Wu, S.-M., Lanir, N., Stafford, D.W. & Solera, J. (1998) A missense mutation in γ -glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*, **92**, 4554–4559.
- Cain, D., Hutson, S.M. & Wallin, R. (1997) Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 29068–29075.

- Furie, B., Bouchard, B.A. & Furie, B.C. (1999) Vitamin K-dependent biosynthesis of γ -carboxyglutamic acid. *Blood*, **93**, 1798–1808.
- Knobloch, J.E. & Suttie, J.W. (1987) Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the 'propeptide' region of factor X. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 15334–15337.
- Kuo, W.L., Stafford, D.W., Cruces, J., Gray, J. & Solera, J. (1994) Chromosomal localization of the gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12. *Genomics*, **25**, 746–748.
- Lin, P.J., Jin, D.Y., Tie, J.K., Presnell, S.R., Straight, D.L. & Stafford, D.W. (2002) The putative vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase internal propeptide appears to be the propeptide binding site. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 28584–28591.
- Mousallem, M., Spronk, H.M., Sacy, R., Hakime, N. & Soute, B.A.M. (2001) Congenital combined deficiencies of all vitamin K-dependent coagulation factors. *Thrombosis and Haemostasis*, **84**, 937–941.
- Mutucumarana, V.P., Stafford, D.W., Stanley, T.B., Jin, C.-Y., Solera, J., Brenner, B., Azerad, R. & Wu, S.-M. (2000) Expression and characterization of the naturally occurring mutation L394R in human γ -glutamyl carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 32572–32577.
- Oldenburg, J., von Brederlow, B., Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Eberl, W., Eber, S., Lenz, E., Schwaab, R., Brackmann, H.H., Effenberger, W., Harbrecht, U., Schurgers, L.J., Vermeer, C. & Müller, C.R. (2000) Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex. *Thrombosis and Haemostasis*, **84**, 937–941.
- Pauli, R.M., Lian, J.B., Mosher, D.F. & Suttie, J.W. (1987) Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of warfarin embryopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives. *American Journal of Human Genetics*, **41**, 566–583.
- Soute, B.A.M., Ulrich, M.M.W., Watson, A.D.W., Maddison, J.E., Ebberink, R.H.M. & Vermeer, C. (1992) Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats. *Thrombosis and Haemostasis*, **68**, 521–525.
- Soute, B.A.M., Jin, D.Y., Spronk, H.M., Mutucumarana, V.P., Lin, P.J., Hackeng, T.M., Stafford, D.W. & Vermeer, C. (2004) Characteristics of recombinant W501S mutated human γ -glutamyl carboxylase. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **2**, 597–604.
- Sperling, R., Furie, B.C., Blumenstein, M., Keyt, B. & Furie, B.C. (1978) Metal binding properties of γ -carboxyglutamic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **253**, 3898–3906.
- Spronk, H.M.H., Farah, R.A., Buchanan, G.R., Vermeer, C. & Soute, B.A.M. (2000) Novel mutation in the γ -glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*, **96**, 3650–3652.
- Sugiura, I., Furie, B., Walsh, C.T. & Furie, B.C. (1996) Profactor IX propeptide and glutamate substrate binding sites on the vitamin K-dependent carboxylase identified by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 17837–17844.
- Suttie, J.W., Canfield, L.M. & Shah, D.V. (1980) Microsomal vitamin K-dependent carboxylase. *Methods in Enzymology*, **67**, 180–185.
- Wu, S.-M., Morris, D.P. & Stafford, D.W. (1991a) Identification and purification to near homogeneity of the vitamin K-dependent carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 2236–2240.
- Wu, S.-M., Cheung, W.-F., Frazier, D.F. & Stafford, D.W. (1991b) Cloning and expression of the cDNA for human γ -glutamyl carboxylase. *Science*, **254**, 1634–1636.
- Wu, S.-M., Stafford, D.W., Frazier, L.D., Fu, Y.-Y., High, K.A., Chu, K., Sanchez-Vega, B. & Solera, J. (1997a) Genomic sequence and transcription start site for the human γ -glutamyl carboxylase. *Blood*, **89**, 4058–4062.
- Wu, S.-M., Mutucumarana, V.P., Geromanos, S. & Stafford, D.W. (1997b) The propeptide binding site of the bovine γ -glutamyl carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 11718–11722.
- Yamada, M., Kuliopulos, A., Nelson, N.P., Roth, D.A., Furie, B., Furie, B.C. & Walsh, C.T. (1995) Localization of the factor IX propeptide binding site on recombinant vitamin K dependent carboxylase using benzoylphenylalanine photoaffinity peptide inactivators. *Biochemistry*, **34**, 481–489.

8 WEITERE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

8.1 Zusätzliche Veröffentlichungen

Oldenburg J., Rost S., El-Maarri O., Leuer M., Olek K., Müller C. R., Schwaab R., 2000: De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 96: 2905-2906.

Oldenburg J., Ivaskevicius V., Rost S., Fregin A., White K., Holinski-Feder E., Müller C. R., Weber B. H., 2001: Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J. Biochem. Biophys. Methods* 4: 39-51.

Ivaskevicius V., Jurgutis R., Rost S., Muller A., Schmitt C., Wulff K., Herrmann F. H., Müller C. R., Schwaab R., Oldenburg J., 2001: Lithuanian haemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *Br. J. Haematol.* 112: 1062-1070.

8.2 Vorträge

„Vitamin K-Stoffwechsel und Blutgerinnung“, Auszeichnung mit dem Nachwuchspreis des Biozentrums der Universität Würzburg, Januar 2004.

„Neue Mutationen im γ -Glutamyl-Carboxylase Gen“, 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) in Hamburg, Februar 2004.

„Mutations in the VKORC1 gene cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2“, Humangenetikkonferenz der European Society of Human Genetics (ESHG) in München, Juni 2004.

„Mutationen in der Vitamin K-Epoxid-Reduktase verursachen Warfarinresistenz und multiple coagulation factor deficiency type 2“, Beiratssymposium des Biozentrums der Universität Würzburg, Oktober 2004.

8.3 Posterpräsentationen

„Genetic and Physical Characterization of the Chromosomal Region Containing the Target Protein of the Oral Anticoagulant Marcumar“, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Leipzig, September 2002.

„First Case of Compound Heterozygosity in the γ -Glutamyl Carboxylase Causing Combined Deficiency of all Vitamin K-Dependent Blood Coagulation Factors“, 33. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2002.

„Novel and recurrent mutations in the gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) gene“, 34. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2003.

„Site-directed mutagenesis of VKORC1, the target protein of coumarin-type anticoagulants“, 16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Halle/Saale, März 2005.

„Expression of the γ -glutamyl carboxylase (GGCX) containing the Arg485Pro mutation found in two unrelated VKCFD1 patients“, 36. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2005.

9 CURRICULUM VITAE

Simone Esther Rost

Diplom-Biologin

geboren am 07.02.1973 in Schweinfurt

SCHULAUSBILDUNG UND BERUFSAUSBILDUNG

- 1983 - 1992 Besuch des Siebold-Gymnasiums Würzburg
Leistungskurse: Mathematik und Biologie
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1994 - 1996 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin (BTA)
an der Rheinischen Akademie e.V. Köln
Abschluss: Staatlich geprüfte BTA
-

BERUFSERFAHRUNG

- 1996 - 1998 Anstellung als BTA am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg
- 1998 - 2001 Nebentätigkeit als BTA am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg
-

STUDIUM UND PROMOTION

- 1993 - 1994 /
1998 - 1999 Grundstudium Biologie an der Universität Würzburg
- 1999 - 2001 Hauptstudium Biologie an der Universität Würzburg
Hauptfach: Biochemie, Nebenfächer: Humangenetik und Mikrobiologie
- 2001 - 2002 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg
Thema: Genetische und physikalische Charakterisierung der Kandidatenregion für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase im perizentrischen Bereich von Chromosom 16
- 2002 - 2005 Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg
Thema: Molekulare Ursachen Vitamin K-abhängiger Gerinnungsstörungen
- Jan. - Juni 2003 abgeordnet an das Institut für Humangenetik des GSF-Forschungszentrums in Neuherberg, München
- Mai - Juli 2005 USA-Aufenthalt im Labor von Prof. Dr. Stafford, Department of Biology, University of North Carolina in Chapel Hill, NC