

**Erstcharakterisierung
des Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1 Proteins**



Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von
Mirja Maaret Hünenberg
geboren in Helsinki/ Finnland

Würzburg, Januar 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller, Dekan

Gutachter: Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Universität Würzburg vom 15. März 1999:

1. Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
2. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. Weiterhin erkläre ich, dass ich außer den mit Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Januar 2009

Mirja Hünerberg

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	9
SUMMARY	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 Vitamin K und Blutgerinnung	15
1.1.1 Die Blutgerinnung - ein überlebenswichtiger Prozess.....	15
1.1.2 Vitamin K - ein essentieller Faktor bei der Blutgerinnung.....	18
1.1.3 Vitamin K-abhängige Proteine.....	20
1.1.4 Die γ -Glutamyl-Carboxylase - verantwortlich für die Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren.....	22
1.1.5 Der Vitamin K-Zyklus - ein Recyclingprozess zur Bereitstellung von Vitamin K....	25
1.1.6 Das VKORC1-Protein - das zentrale Protein im Vitamin K-Zyklus.....	28
1.1.7 Das Calumenin im γ -Carboxylierungssystem - Inhibitor der VKOR?.....	31
1.1.8 Erblisch bedingter Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren.....	32
1.1.9 Vitamin K-Antagonisten - Therapeutika bei Thromboembolien sowie Mittel zur Nagerbekämpfung.....	33
1.1.10 Warfarinresistenz beim Menschen.....	35
1.1.11 Warfarinresistenz bei Nagern.....	36
1.1.12 Die Stachelmaus (<i>Acomys</i>) - ein Nager mit natürlicher Warfarinresistenz?.....	38
1.2 Methodische Voraussetzungen	40
1.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik.....	40
1.2.2 Die Knockout-Technik zur Generierung einer VKORC1L1-Knockout-Maus.....	43
1.2.3 Konditionale Mutagenese durch das Cre/LoxP-Rekombinasesystem	46
1.3 VKORC1L1 - das paraloge Gen mit unbekannter Funktion	48
1.4 Zielsetzung der Arbeit	49
2 MATERIAL UND METHODEN	50
2.1 Material	50
2.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Enzyme.....	50
2.1.2 Arbeitsgeräte und sonstige Materialien.....	52
2.1.3 Oligonukleotide.....	53
2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien.....	57
2.1.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	62

2.2 Methoden.....	64
2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe durch Phenol/ Chloroform-Extraktion.....	64
2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	64
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	65
2.2.3.1 Nachweis homologer Rekombination bei ES-Zellen mittels PCR.....	67
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	68
2.2.5 Klonierungsstrategie für das VKORC1L1-Gen im pEasyflox-Vektor.....	69
2.2.6 Spaltung des PCR-Produkts und des pEasyflox-Vektors mit Restriktionsendonukleasen.....	69
2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	71
2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	72
2.2.9 TA/ TOPO Cloning Vektor (Invitrogen).....	72
2.2.10 Transformation.....	73
2.2.10.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (XL1 blue)	73
2.2.10.2 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen von <i>E.coli</i>	74
2.2.10.3 Transformation mit chemokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	74
2.2.11 Picken von Bakterienklonen.....	75
2.2.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	75
2.2.13 Plasmid-Isolierung.....	77
2.2.14 Glycerinstocks.....	78
2.2.15 Der Targetingvektor.....	79
2.2.15.1 Testverdau des klonierten pEasyflox- Vektors.....	79
2.2.15.2 Linearisierung des pEasyflox- Vektors für die Transfektion in ES-Zellen.....	80
2.2.15.3 Phenol-Chloroform Aufreinigung des Targeting-Konstrukts.....	80
2.2.16 ES-Zellkultur.....	80
2.2.16.1 Auftauen von embryonalen Feederzellen.....	80
2.2.16.2 Auftauen von ES-Zellen.....	81
2.2.16.3 MMC-Behandlung von Feederzellen.....	81
2.2.16.4 Einfrieren von Feederzellen.....	81
2.2.16.5 Splitten von ES- und Feederzellen.....	81
2.2.16.6 Elektroporation von embryonalen Stammzellen.....	82
2.2.16.7 Picken von ES-Zellklonen.....	82
2.2.16.8 Einfrieren von gepickten Klonen.....	83

2.2.16.9 DNA-Gelatine-Platten.....	83
2.2.16.10 DNA-Extraktion aus gepickten ES-Zellklonen.....	83
2.2.17 Haltung und Zucht von Mäusen.....	83
2.2.18 DNA-Extraktion aus ES-Zellen und Mausschwanzspitzen.....	84
2.2.19 Southern Blot.....	84
2.2.19.1 Sondenherstellung.....	84
2.2.19.2 Verdau genomischer DNA.....	85
2.2.19.3 Southern Blot-Gel, Blotaufbau und – abbau.....	85
2.2.19.4 Prähybridisierung, Labeln von Sonden und Hybridisierung.....	86
2.2.19.5 Southern Blot waschen und Film auflegen.....	87
2.2.19.6 Filmentwicklung.....	87
2.2.19.7 Strippen der Membran.....	87
2.2.20 Karyotypbestimmung von ES-Zellklonen durch SKY-Hybridisierung nach Spektral Imaging	88
2.2.20.1 Vorbereitung der Objektträger.....	88
2.2.20.2 Giemsa-Färbung.....	88
2.2.20.3 Präparation der Proben.....	89
2.2.20.4 Visualisierung und Auswertung der Proben.....	91
2.2.21 Northern Blot.....	92
2.2.21.1 Herstellung der Northern Blot Sonde.....	92
2.2.21.2 Northern Blot – Prähybridisierung und Hybridisierung.....	92
2.2.22 RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe.....	93
2.2.23 c-DNA-Synthese.....	93
2.2.24 Mutagenese.....	93
2.2.25 HEK293-EBNA-Zellkultur.....	95
2.2.25.1 Langzeit-Zellkultur.....	95
2.2.25.2 Transfektion von HEK-Zellen.....	95
2.2.25.3 Ernten der HEK-Zellen.....	96
2.2.26 Epoxidierung von Vitamin K ₂ -Chinon.....	96
2.2.27 VKOR-Aktivitätsmessung bei Warfarinhemmung.....	97
2.2.28 VKOR-Aktivitätsmessung bei verschiedenen Substratkonzentrationen.....	97
2.2.29 High performance/ pressure liquid chromatography HPLC.....	97
2.2.30 Proteinmengenbestimmung nach Lowry.....	99
2.2.31 Berechnung der Proteingesamtmenge.....	100

3	ERGEBNISSE	101
3.1	Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen	101
3.1.1	Klonierung des Targeting-Vektors.....	102
3.1.2	Überprüfung der transfizierten embryonalen Stammzellklone.....	104
3.1.2.1	Nachweis der homologen Rekombination bei den ES-Zellen mittels PCR.....	104
3.1.2.2	Nachweis der homologen Rekombination bei den ES-Zellen mittels Southern Blot.....	107
3.1.3	Transferierte Blastozysten und erhaltene Maus-Chimären.....	110
3.1.4	Karyotypbestimmung der injizierten ES-Zellklone mittels SKY-Analyse.....	114
3.2	Biochemische Charakterisierung des VKORC1L1-Proteins	116
3.2.1	Northern Blot.....	116
3.2.2	Messung der enzymatischen Aktivität von VKORC1L1 mit Vitamin K ₂ -2,3-Epoxid als Substrat.....	118
3.2.3	Quantifizierung der VKOR-Reaktionsprodukte.....	118
3.2.4	Berechnung der Enzymaktivität.....	119
3.2.5	Bestimmung der enzymatischen Reaktionskonstanten von VKORC1L1.....	119
3.2.6	Kinetiken verschiedener Spezies – Berechnung von K _M und V _{max}	120
3.2.7	<i>In vitro</i> Mutagenese des hVKORC1L1-Proteins.....	122
3.2.8	Warfarinhemmstudien für das hVKORC1L1-Protein und die eingeführten Mutationen.....	123
3.2.9	Warfarinhemmung für verschiedene Spezies.....	126
3.3	Bioinformatische Analysen des VKORC1L1-Proteins	127
3.3.1	Multiple Alignments und evolutiver Stammbaum.....	127
3.3.2	Ein Proteinmodell für das VKORC1L1-Protein.....	131
3.3.3	Die menschlichen Chromosomen 7 und 16 im Homologievergleich zu den Chromosomen von verschiedenen Spezies.....	133
4	DISKUSSION	139
4.1	Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen	139
4.1.1	Die chimären Mäuse.....	139
4.1.2	Die SKY-Analyse zur Karyotypbestimmung der injizierten ES-Zellklone.....	141
4.2	Biochemische Charakterisierung des VKORC1L1-Proteins	143
4.2.1	Northern Blot Analysen.....	143
4.2.2	Enzymkinetiken.....	144
4.2.3	Warfarinhemmstudien für Mutationen im humanen VKORC1L1-Protein.....	145

4.2.4	Warfarinhemmstudien für das VKORC1- und VKORC1L1-Protein verschiedener Spezies.....	147
4.3	Bioinformatische Analysen des VKORC1L1-Proteins.....	148
4.3.1	Sequenzvergleiche des VKORC1- und VKORC1L1-Proteins.....	148
4.3.2	Evolutiver Stammbaum.....	149
4.3.3	Homologievergleich von Chromosomen verschiedener Spezies zum Menschen.....	150
4.4	Ausblick.....	152
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	153
	LITERATURVERZEICHNIS.....	155
	POSTERPRÄSENTATIONEN.....	167
	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	168
	DANKSAGUNG.....	169
	CURRICULUM VITAE.....	170

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Kaskaden der Blutgerinnung im Menschen.....15

Abb. 2: Struktureller Aufbau des Vitamin K₁, K₂ und K₃.....19

Abb. 3: Der Aufbau von Vitamin K-abhängigen Proteinen.....22

Abb. 4: Die Struktur der γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX).....23

Abb. 5: Mechanismus der Vitamin K-abhängigen γ -Carboxylierung von Glutamatresten ...24

Abb. 6: Der Vitamin K Zyklus.....26

Abb. 7: Das Modell des Enzymkomplexes.....28

Abb. 8: Die Struktur von VKORC1 im endoplasmatischen Reticulum.....29

Abb. 9: Ein molekulares Modell des γ -Carboxylierungssystems31

Abb. 10: 4-Hydroxycoumarin und seine Derivate.....34

Abb. 11: Die dunkle Nilstachelmaus (*Acomys cahirinus cahirinus*).....38

Abb. 12: Das Michaelis-Menten-Diagramm.....42

Abb. 13: Die Generierung einer Knockout-Maus.....44

Abb. 14: Die Doppelsektion bei der homologen Rekombination.....46

Abb. 15: Basensequenz im CEQ-Auswertprogramm nach der Sequenzierung.....77

Abb. 16: Testverdau des Targeting-Konstrukts.....79

Abb. 17: Aufbau des Southern Blots.....86

Abb. 18: Aufbau und Funktionsweise der SKY-Analyse.....91

Abb. 19: Genomische Karte des VKORC1L1-Gens mit den ausgewählten zu klonierenden
Regionen.....101

Abb. 20: Vektorkonstrukt pEasyflox mit den inklonierten Fragmenten des VKORC1L1-
Gens.....103

Abb. 21: PCR-Strategie für das Screening der embryonalen Stammzellklone nach der
Transfektion.....104

Abb. 22: PCR zum Nachweis der loxP-sites.....105

Abb. 23: PCR für die Neo-Kassette.....106

Abb. 24: PCR für die 5'-site.....106

Abb. 25: PCR für die 3'-site.....107

Abb. 26: Southern Blot-Strategie für das Screening der embryonalen Stammzellklone nach
der Transfektion.....108

Abb. 27: Southern Blot für die 5'-site mit einer *Bam*HI-Sonde.....109

Abb. 28: Southern Blot mit einer Neo-Sonde.....110

Abb. 29: Test-PCR der loxP-sites mit den Primern hR-F2 und hR-R2 zum Screenen der Nachkommen aus den Verpaarungen mit den Chimären111

Abb. 30: 15%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.....112

Abb. 31: 30%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.....112

Abb. 32: 70%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.....113

Abb. 33: 20%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.....113

Abb. 34: Spectral Karyotyping-Analyse von Metaphasen des ES-Zellklons 3D für VKORC1L1.....114

Abb. 35: Spectral Karyotyping-Analyse von Metaphasen des ES-Zellklons 10G für VKORC1L1.....115

Abb. 36: mVKORC1L1-cDNA-Sonde.....117

Abb. 37: β -Actin cDNA-Sonde zur Expressionskontrolle.....117

Abb. 38: Vergleich von V_{max}121

Abb. 39: Vergleich von K_M121

Abb. 40: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der hVKORC1L1-Mutationen Y146C, Y146F, R65G, V36L und L135R sowie des Wildtyps.....123

Abb. 41: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der hVKORC1L1-Mutationen Y146C, Y146F und V36L sowie des Wildtyps.....124

Abb. 42: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der hVKORC1L1-Mutationen R65G und L135R sowie des Wildtyps.....124

Abb. 43: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der VKOR-Proteine verschiedener Spezies.....126

Abb. 44: Multiple Alignment der Aminosäuresequenzen des VKORC1- und VKORC1L1-Proteins verschiedener Spezies mit Hilfe des Multalign-Programms.....128

Abb. 45: Evolutiver Stammbaum für die VKORC1- und VKORC1L1-Proteine.....129

Abb. 46: Proteinmodell des VKORC1 mit konservierten Positionen für das VKORC1L1..131

Abb. 47: Homologien zwischen dem humanen Chromosom 16 und 7 und den Chromosomen von Schimpanse, Rind und Maus.....136

Abb. 48: Lokalisation des VKORC1- und des VKORC1L1-Gens auf den Chromosomen des Hundes und des Pferds.....138

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Übersicht zu rodentiziden Wirkstoffen.....	35
Tab. 2: Übersicht der gefundenen Mutationen im VKORC1-Gen bei <i>Rattus norvegicus</i>	37
Tab. 3: Übersicht der gefundenen Mutationen im VKORC1-Gen bei <i>Mus musculus</i>	38
Tab. 4: Die Systematik der Stachelmaus.....	39
Tab. 5: Primer zur Einführung der Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt für den Targeting-Vektor.....	53
Tab. 6: Sequenzierungsprimer für die 3 Fragmente des Targeting-Vektors.....	55
Tab. 7: Zusätze für die PCR.....	55
Tab. 8: Primer mit Restriktionsschnittstellen für die Northern Blot Sonde.....	55
Tab. 9: Primer für die Sonden für den Southern Blot.....	55
Tab. 10: Primer für den TOPO Cloning Kit und den pCep4-Vektor.....	56
Tab. 11: Primer für das Screenen der ES-Klone auf homologe Rekombination und loxP-sites.....	56
Tab. 12: Primer für die VKORC1L1-Mutagenese im pCep4-Vektor.....	56
Tab. 13: Primer für die Klonierung von VKORC1L1 der Spezies in pCep4.....	57
Tab. 14: PCR-Reaktionsbedingungen für die Einführung der Restriktionsschnittstellen	66
Tab. 15: PCR-Reaktionsbedingungen für die Überprüfung der Bakterienklone mit Sequenzierprimern.....	67
Tab. 16: PCR-Bedingungen und erwartete Banden für die homologe Rekombination der ES-Klone	68
Tab. 17: Eingesetzte Enzyme und Puffer für die Klonierung der Fragmente in den Targetingvektor.....	71
Tab. 18: Bedingungen für das Cycle-Sequencing	76
Tab. 19: Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenz- Farbstoffe bei den Maus-Sonden (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000).....	90
Tab. 20: Fluoreszenz-Farbstoff Code.....	90
Tab. 21: Errechnete Werte für V_{max} und K_M für die Proteine VKORC1L1 und VKORC1 zum Vergleich.....	120
Tab. 22: Lokalisation des VKORC1- und des VKORC1L1-Gens auf den Chromosomen von verschiedenen Spezies.....	134

ZUSAMMENFASSUNG

Im Jahre 2004 wurden in unserem Labor zwei Gene einer neuen Proteinfamilie kloniert, deren Charakterisierung seither im Gange ist. Das eine Protein, VKORC1, konnte durch Mutationsanalysen und biochemische Untersuchungen als eine zentrale Komponente des so genannten Vitamin K-Zyklus identifiziert werden. Vitamin K wird für die γ -Carboxylierung der Vitamin K-abhängigen Proteine wie z.B. der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X als Cofaktor der γ -Glutamyl-Carboxylase benötigt. Da Vitamin K essentiell ist, wird seine Epoxidform vom Organismus wieder in eine physiologisch aktive Hydrochinon-Form überführt. Für diese Reaktion wird die Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKORC1) benötigt. Mutationen in VKORC1 führen einerseits zu einem erblich bedingten Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren vom Typ 2 (VKCFD2) mit starken Blutungen durch eine nicht oder nur unvollständig ablaufende Blutgerinnung. Das VKORC1 ist andererseits auch das Ziel von Medikamenten der Coumarin-Gruppe, der sog. Vitamin K-Antagonisten, die zur Verhinderung einer unzeitigen Gerinnung eingesetzt werden. In höheren Dosen wird diese Substanzklasse als Rattenbekämpfungsmittel eingesetzt. Bei manchen Rattenpopulationen, aber auch bei einigen Patienten, ist die Wirksamkeit der Coumarine durch bestimmte Mutationen im VKORC1-Protein, welche eine Warfarinresistenz hervorrufen, erheblich eingeschränkt. Zu diesem VKORC1 existiert ein paraloges Protein, das Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1 Protein (VKORC1L1), dessen Funktion bislang unbekannt ist und welches Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

Es wurden unterschiedliche Methoden angewandt, um das VKORC1L1-Protein zu charakterisieren und seine mögliche Funktion(en) aufzuklären. Zum einen sollte die **Herstellung einer Knockout-Maus** dazu dienen, durch den erhaltenen Phänotyp Hinweise auf die mögliche physiologische Aufgabe zu erhalten. Allerdings gelangten die Versuche nur bis zur Generierung der Chimären, so dass dieses Teilprojekt nicht zum Abschluss gebracht werden konnte. **Die biochemische Charakterisierung** des Proteins zeigte eine Expression des VKORC1L1-Gens in allen untersuchten Geweben, wobei keine starke Expression für ein bestimmtes Gewebe ermittelt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Vitamin K-Epoxid auf gleiche Weise wie das VKORC1 recyceln kann und durch Warfarin gehemmt wird. Einige der in eingeführten VKORC1L1 Mutationen vermitteln darüber hinaus eine Warfarinresistenz. Des Weiteren wurden Enzymkinetiken für die Spezies Maus und Ratte sowie für die Stachelmaus erstellt. Die erhaltenen Werte für die Michaelis-Menten-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit sind untereinander sehr ähnlich und sprechen für

eine Oxido-Reduktase-Aktivität des VKORC1L1-Proteins. **Bioinformatische Analysen** konzentrierten sich auf die Aufklärung von konservierten Aminosäureresten im VKORC1L1. Dadurch konnten funktionell wichtige Positionen des Proteins ermittelt werden. Ein evolutiver Stammbaum konnte weiterhin zeigen, dass die paralogen Proteine VKORC1 und VKORC1L1 sehr wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein bei der Entwicklung der Wirbeltiere aus einer Duplikation entstanden sind und nach der Entstehung der Landwirbeltiere ihre spezifischen Funktionen ausgebildet haben. Ein Homologievergleich zwischen den humanen Chromosomen 7 und 16 und den jeweiligen Chromosomen verschiedener Spezies zeigte, dass sich nach der Duplikation die Gene für das VKORC1 und das VKORC1L1 bei fast allen betrachteten Spezies unabhängig voneinander auf verschiedenen Chromosomen evolutiv entwickelt haben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Duplikation schon sehr lange zurück liegt.

SUMMARY

In 2004 two genes of a new protein family were cloned in our institute. Since then the characterization of this protein family is in progress. Through mutation and biochemical analyses one protein, VKORC1, could be identified as a central component of the so-called vitamin K cycle. Vitamin K is required as a cofactor of the γ -glutamyl carboxylase for the γ -carboxylation of the vitamin K-dependent proteins such as the coagulation factors II, VII, IX and X. As vitamin K is essential, the epoxide form is again transferred by the organism into a physiologically active hydroquinone form. For this reaction vitamin K epoxide reductase (VKORC1) is necessary. On the one hand mutations in VKORC1 lead to a hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors of type 2 (VKCFD2) with heavy bleedings because of missing or insufficient blood coagulation. On the other hand VKORC1 is also the target of medical treatment with the coumarin derivative group, the so-called vitamin K antagonists, which are used for preventing untimely coagulation. In higher doses this class of substances is used as rodenticides. In some rat populations as well as in case of some human patients the efficiency of the coumarins is considerably reduced through specific mutations in the VKORC1 protein leading to a warfarin resistance. There is a paralogous protein to VKORC1, the vitamin K epoxide reductase complex 1-like 1 protein (VKORC1L1), the function of which is not known so far and which is the subject of this study.

Different methods have been applied in order to characterize the VKORC1L1-protein and to explain its potential functions. On the one hand, the **creation of a knockout mouse** was to give information on potential physiological tasks through its specific phenotype. The experiments, however, were only successful as far as the creation of chimeras was concerned. Thus, this part of the project could not be completed totally. The **biochemical characterization** showed an expression of the VKORC1L1-gene in all tissues examined. It was, however, not possible to find a strong expression for a specific tissue. We were able to show that the protein can recycle vitamin K epoxide in the same way as VKORC1 and that it is inhibited by warfarin. Some of the mutations within the VKORC1L1 lead to a warfarin resistance. Moreover, enzyme kinetics were applied for the mouse, rat and *acomys* species. The calculated values of the Michaelis-Menten constant and of the maximal speed V_{\max} are very similar to each other and support an oxido-reductase activity for the VKORC1L1-protein. **Bioinformatic analyses** were focused on the explanation of the conserved amino acids within VKORC1L1. So, functionally important positions could be determined.

Moreover, an evolutionary life tree showed that the paralogue proteins VKORC1 and VKORC1L1 have probably been arisen from a common precursor protein by duplication when vertebrates developed and formed its specific functions after the tetrapod vertebrates came into being. A homological comparison between the human chromosomes 7 and 16 and the corresponding chromosomes of different species showed that the duplication of the genes for VKORC1 and VKORC1L1 evolved independently of each other on different chromosomes within all species examined. This is a further indication that the duplication took place a long time ago.

1 EINLEITUNG

Bei Untersuchungen zur Aufklärung der Blutgerinnungskaskade wurde in den 60er Jahren ein Prothrombin-ähnliches Molekül entdeckt, das keine Blutgerinnungsaktivität und eine beeinträchtigte Fähigkeit zur Calciumbindung zeigte. Es wies jedoch ein identisches Molekulargewicht und die gleiche Aminosäureabfolge wie Prothrombin auf und konnte als dessen inaktive Form identifiziert werden. Für die Umwandlung dieses inaktiven Vorläufermoleküls in seine biologisch aktive Form ist ein Vitamin K-abhängiger Enzymkomplex notwendig. Vitamin K wurde bereits 1929 als essentieller Nahrungsbestandteil entdeckt [Dam, 1929], und in den 40er Jahren wurde seine Rolle als Cofaktor der Blutgerinnung aufgeklärt. Entscheidend war dabei die Entdeckung einer modifizierten Aminosäure Mitte der 70er Jahre, die als γ -Carboxyglutaminsäure (Gla) bezeichnet wird [Nelsestuen, Zytovicz, 1974; Stenflo et al., 1974]. Es zeigte sich, dass Vitamin K als ein Cofaktor in der posttranslationalen Synthese von Gla aus Glutamaresten (Glu), die auch in bestimmten Blutgerinnungsfaktoren vorhanden sind, fungiert [Furie et al., 1999]. Weiterhin stellte man fest, dass im Gegensatz zu anderen fettlöslichen Vitaminen die Körperspeicher für Vitamin K sehr klein sind und diese schnell aufgebraucht werden [Newman, Shearer, 1998; Suttie et al., 1988]. Da Vitamin K in sehr niedrigen Konzentrationen im Gewebe vorhanden ist, aber viele Male innerhalb eines Tages seiner Rolle als Cofaktor nachkommen muss, stellte sich die Frage, wie der Vitamin K-Bedarf ausreichend gedeckt werden kann [Shearer et al., 1974; Usui et al., 1990]. Die Überlegungen führten zur Postulierung eines zyklischen Reaktionsweges, der verbrauchtes, inaktives Vitamin K wieder in seine aktive Form überführt. Dieser Vitamin K-Zyklus ist ein immer noch aktuelles Forschungsgebiet im Hinblick auf die Untersuchung der beteiligten und teilweise unbekanntenen Reaktionskomponenten. In diesem Zusammenhang stieß man auch auf ein paraloges Protein der Vitamin K-Epoxidreduktase (VKORC1), das Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like Protein 1 (VKORC1L1) [Rost et al., 2004]. Seine physiologische Rolle ist noch völlig unbekannt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich daher auf die Charakterisierung und die biochemische Beschreibung des VKORC1L1-Proteins, um seine Funktionen im Organismus verstehen zu können.

Da die Untersuchungen dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Blutgerinnung stehen und das Vitamin K eine spezifische und zentrale Rolle in der Funktionalität der Blutgerinnung einnimmt, wird in der Einleitung im ersten Teil unter 1.1 „Vitamin K und Blutgerinnung“ auf die Blutgerinnungsfaktoren (1.1.1), das Vitamin K (1.1.2) und die Vitamin K-abhängigen

Proteine (1.1.3) eingegangen. Weiterhin werden die γ -Glutamyl-Carboxylase (1.1.4), der Vitamin K-Zyklus (1.1.5), das VKORC1-Protein (1.1.6) und das Calumenin im γ -Carboxylierungssystem (1.1.7) behandelt. Diese Komponenten sind für den Ablauf der Blutgerinnung unerlässlich. Da bezüglich der Blutgerinnung Funktionsstörungen bekannt sind und diese die Identifizierung und Charakterisierung des VKORC1-Proteins ermöglichten, schließen sich Kapitel zu Vitamin K assoziierten Krankheiten (1.1.8), zu den Vitamin K-Antagonisten (1.1.9) und der Warfarinresistenz beim Menschen und bei Nagern (1.1.10 und 1.1.11) an. Die Stachelmaus ist Gegenstand des letzten Kapitels im ersten Teil (1.1.12), da sie zur Betrachtung kinetischer Parameter des VKORC1-Proteins herangezogen wird. Der zweite Teil der Einleitung „methodische Voraussetzungen“ beschäftigt sich mit den notwendigen Techniken der vorliegenden Untersuchungen. So werden im Kapitel 1.2.1 zunächst die Grundlagen der Michaelis-Menten-Kinetik dargestellt, um die kinetischen Ergebnisse diskutieren zu können. Darauf folgen ein Abschnitt zur Knockout-Technik (1.2.2) und ein Kapitel zur konditionalen Mutagenese durch das Cre/loxP-Rekombinasesystem (1.2.3), da die Generierung einer Knockout-Maus ein Ziel dieser Arbeit war. Im dritten Abschnitt der Einleitung „VKORC1L1 – das paraloge Gen mit unbekannter Funktion“ wird das VKORC1L1-Protein vorgestellt, welches Forschungsgegenstand dieser Arbeit ist und charakterisiert werden soll. Die für die empirischen Untersuchungen herangezogenen Methoden werden im Kapitel 2 „Material und Methoden“ erläutert. Die Ergebnisse werden anschließend in drei Teilen im Kapitel „Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen“ (3.1) und im Abschnitt „Biochemische Charakterisierung des VKORC1L1-Proteins“ (3.2) sowie unter „Bioinformatische Analysen des VKORC1L1-Proteins“ (3.3) dargestellt. Im Kapitel 4 werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

1.1 Vitamin K und Blutgerinnung

1.1.1 Die Blutgerinnung – ein überlebenswichtiger Prozess

Ein Wundverschluss nach Endothelverletzungen und bei größeren Wunden ist lebensnotwendig. Dieser Prozess wird durch die primäre und sekundäre Hämostase eingeleitet. Bei der primären Hämostase aggregieren die Thrombozyten an der beschädigten Stelle des Blutgefäßes zu einem Pfropf und setzen Substanzen wie Serotonin frei, die eine Konstriktion des Gefäßes bewirken, so dass es zu einer kurzfristigen Verhinderung von Blutverlust kommt. Der weitaus stabilere Wundverschluss wird durch die sekundäre Hämostase erreicht, bei der unlösliche Fibrinnetze zu einem dauerhaften Wundverschluss führen [Riddel et al., 2007].

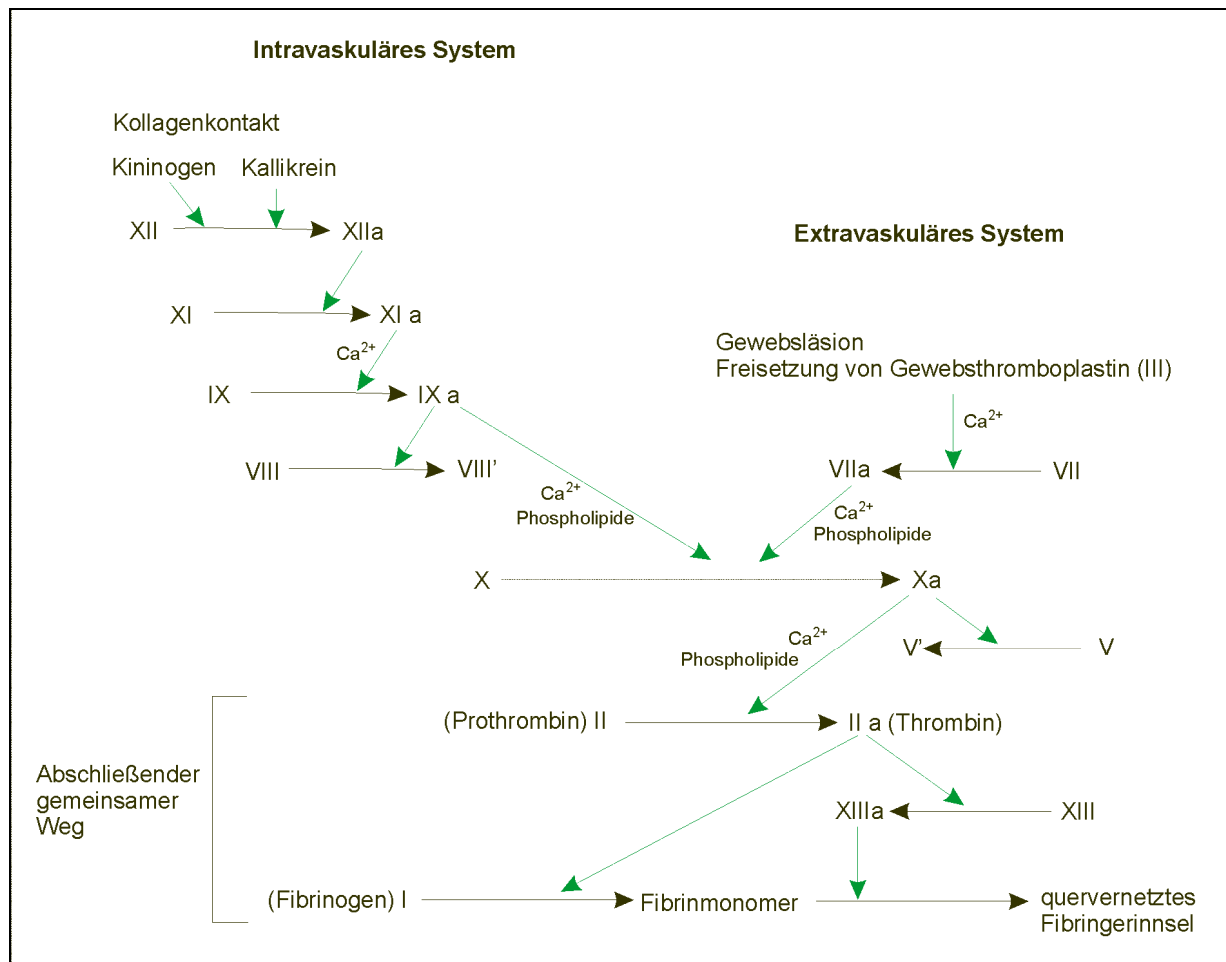


Abb. 1: Kaskaden der Blutgerinnung im Menschen (Penzlin, 1996).

Grüne Pfeile: Aktivierung durch Proteolyse; schwarze Pfeile: Transformation des Proenzym in das aktive proteolytische Enzym bzw. Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. Durch das a hinter der römischen Ziffer (dem Gerinnungsfaktor) wird die aktive Protease gekennzeichnet.

Die sekundäre Hämostase verläuft in einer kaskadenartigen Aktivierung von zahlreichen Faktoren, wobei eine aktivierte Form die Aktivierung des folgenden Faktors katalysiert (Abb. 1). Am Ende bildet sich ein Stoffkomplex, der aus dem aktivierten Faktor X, dem aktivierten Faktor V', Ca^{2+} -Ionen (Faktor IV) sowie Phospholipiden besteht und durch seine proteolytische Aktivität Faktor II (Prothrombin) in Thrombin überführen kann [Penzlin, 1996]. Die Phospholipide können dabei aus zwei verschiedenen Wegen resultieren, die als intrinsisches und extrinsisches System bezeichnet werden. Die Serinproteinase Thrombin interagiert mit dem hochmolekularen, löslichen Fibrinogen (Faktor I) und fällt es zu Fibrinmonomeren aus, die anschließend unter Einwirkung des fibrinstabilisierenden Faktors XIII, einer durch Thrombin aktivierten Transamidase, zu einem Polymer vernetzt werden. Durch das stabilisierte Fibrinnetz erfolgen der Wundverschluss und damit die Blutstillung [Riddel et al., 2007].

Der Auslöser des intravaskulären (intrinsischen) Systems ist der Kontakt des Blutes mit einer negativ geladenen Oberfläche wie dem Kollagen oder der Basalmembran der Blutgefäße. Dabei erfährt der Faktor XII (Hagemann-Faktor) eine Konformationsänderung, wodurch er dem aktivierenden proteolytischen Einfluß des Plasma-Kallikreins ausgesetzt wird und selbst seine enzymatische Aktivität erhält [Silverberg et al., 1980; Espana, Ratnoff, 1983; Reddigari et al., 1993; Citarella et al., 1997]. Kaskadenartig werden im folgenden Faktor XI und IX aktiviert [Ratnoff, Davie, 1962]. Mit Hilfe von Faktor VIII, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden aus den Thrombozyten katalysiert die aktive Form IXa, eine Serinprotease, wiederum die Aktivierung von Faktor X. Die Aktivierung des Faktors XII wird durch das im Plasma vorhandene Kininogen unterstützt. Das extravaskuläre (extrinsische) System wird durch eine Gewebsverletzung ausgelöst. Dabei wird der in der Regel intrazellulär vorliegende Faktor III (Gewebethromboplastin), ein Lipoproteinkomplex, frei [Penzlin, 1996]. Dieser Komplex wandelt in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen den Faktor VII in seine aktive Form VIIa um [Dodds, 1980; Nakagaki et al., 1991]. Faktor VIIa aktiviert mit Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden als Cofaktoren den Faktor X, der zudem in das intrinsische System eingebunden ist [Mann, Lorand, 1993]. An dieser Stelle laufen somit der intra- und extravaskuläre Weg zusammen. Für eine effektive Blutgerinnung sind beide Systeme erforderlich.

Die Proteine C, S und Z sind als Antikoagulantien für die Regulation der Blutgerinnung wichtig. Thrombin aktiviert Protein C, das daraufhin einen Komplex mit Protein S, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden bildet. Das aktivierte Protein C hemmt durch proteolytische

Spaltung die aktivierten Faktoren Va und VIIIa und kontrolliert so die Blutgerinnung [Esmon, 2000]. Das Protein Z wirkt als Cofaktor zur Inaktivierung von Faktor Xa und ist ebenfalls ein wichtiger Inhibitor der Blutgerinnung [Sofi et al., 2004].

Störungen im plasmatischen Gerinnungssystem, die als Koagulopathien bezeichnet werden, können verschiedene Ursachen haben und beeinflussen das komplexe Zusammenspiel der Blutgerinnungsfaktoren erheblich. Die am häufigsten genetisch bedingten Erkrankungen sind mit einer Inzidenz von 1:5000 Hämophilie A, die durch einen Mangel an Faktor VIII-Aktivität verursacht wird, und Hämophilie B mit einer Häufigkeit von 1:20000, bei der ein Faktor IX-Mangel vorliegt [Bowen, 2002; Bolton-Maggs et al., 2003]. Beide Krankheiten werden X-chromosomal rezessiv vererbt und führen zu einer verlangsamten Blutgerinnung und Gelenkeinblutungen. Klinisch äußern sich diese Defekte durch Blutungen in Gelenke und Muskulatur sowie in Weichteile und innere Organe [Bachhuber et al., 2004]. Solche rezidivierenden Blutungen führen ohne Behandlung durch die Schädigung der Gelenke und die dadurch bedingten Muskelveränderungen (Atrophien, Verkürzungen) zu Gehbehinderung und Invalidität. Sie können jedoch durch die Substitution des jeweils verminderten Faktors behandelt werden [Graw et al., 2005]. Das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom ist eine weitere Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:10000, ihm liegt ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde [Robertson et al., 2008]. Die Ursache des Syndroms ist auf eine quantitative und qualitative Störung des von-Willebrand-Faktors zurückzuführen. Dabei ist die primäre Hämostase beeinträchtigt, so dass die Adhäsion der Thrombozyten am Subendothel bei Gefäßverletzungen gestört ist [Gill, 2004]. Erworbene Koagulopathien, wie der Vitamin K Mangel, sind auf verschiedene Grunderkrankungen zurückzuführen und betreffen meist mehrere Faktoren des Blutgerinnungssystems. Ein Mangel an Vitamin K führt beispielsweise zu einer gestörten Synthese der Vitamin K-abhängigen Faktoren II, VII, IX und X sowie der Proteine C, S und Z [Renz-Polster, Krautzig, 2008].

1.1.2 Vitamin K – ein essentieller Faktor in der Blutgerinnung

Die Existenz von Vitamin K wurde im Jahre 1929 von Henrik Dam durch Studien zum Cholesterol-Metabolismus in Hühnern entdeckt [Dam, 1929]. Er beschrieb ein neues Mangelsyndrom in jungen Vögeln, die eine fettarme Diät erhalten hatten. Die charakteristischen Merkmale waren eine verlängerte Blutgerinnungsdauer, Anämie und Blutungen [Dam, 1935]. Zehn Jahre später gelang der Arbeitsgruppe um Doisy die Isolierung und chemische Charakterisierung des Vitamins aus Hexanextrakten [Binkley et al., 1939]. Das „K“ in der Bezeichnung „Vitamin K“ steht für Koagulation und unterstreicht seine essentielle Bedeutung in der Blutgerinnung. Dam und Doisy erhielten 1943 gemeinsam den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung bzw. Aufklärung der chemischen Struktur des Vitamin K.

Das fettlösliche Vitamin K gehört zu einer Familie von Naphthochinonderivaten. Die drei verschiedenen Grundformen unterscheiden sich in der Seitenkette am C3-Kohlenstoffatom [Suttie, 1995] (Abb. 2). Das Vitamin K₁ (Phyllochinon), welches eine Phytyl-Seitenkette aus 20 Kohlenstoffatomen besitzt, wird von grünen Pflanzen und Algen unter Lichteinwirkung produziert und überwiegt gegenüber den anderen Derivaten in Nahrungsmitteln. Es ist in besonders hohen Konzentrationen in frischem Obst und Gemüse, wie z.B. Grünkohl (729 µg/100 g), Broccoli (175 µg/100 g) und Spinat (415 µg/100 g), enthalten [Booth, Suttie, 1998]. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Versorgung mit Vitamin K von mindestens 65 µg für Frauen und 80 µg für Männer [Biesalsky, 1999]. Vitamin K₂ (Menachinon) dagegen trägt eine lange ungesättigte Isoprenoidkette, wird hauptsächlich von Darmbakterien synthetisiert und nur in sehr geringen Mengen vom Körper absorbiert [Linnemann, Kühl, 2004]. Weiterhin gibt es das synthetische Vitamin K₃ (Menadion), welches bei der kommerziellen Herstellung von Ölen gebildet wird [Booth, Suttie, 1998].

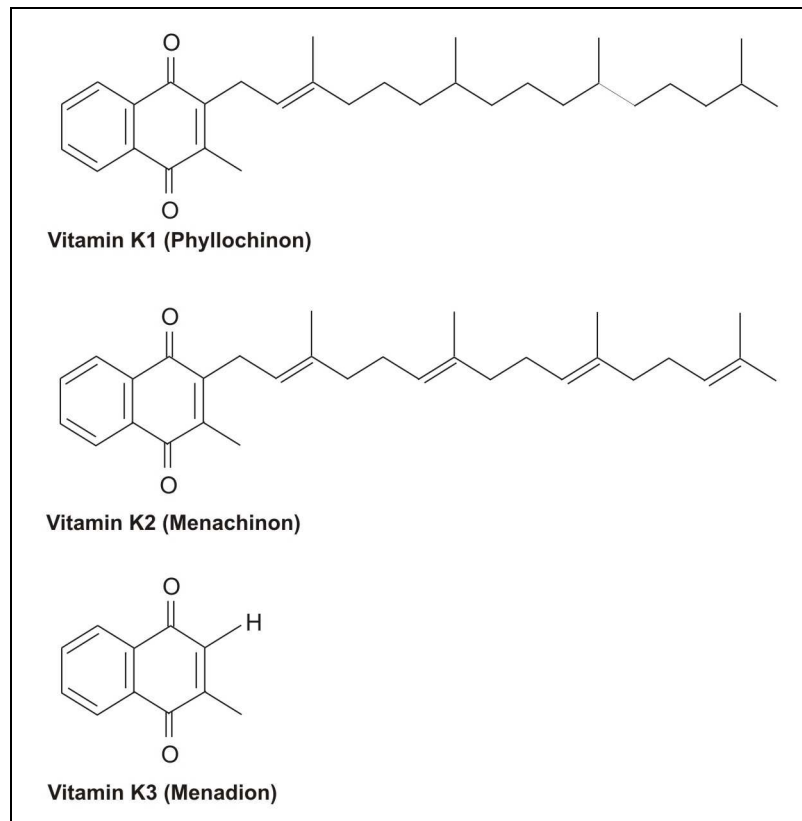


Abb. 2: Struktureller Aufbau des Vitamin K₁, K₂ und K₃

Der Hauptort des Vitamin K-Metabolismus ist die Leber, in der die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren synthetisiert werden [Shaw et al., 1979]. Die Blutgerinnung kann nur mit einer Vitamin K-abhängigen posttranslationalen Modifikation der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und der antikoagulatorischen Proteine C, S und Z normal ablaufen. Einen weiteren wichtigen Stoffwechsel- und Speicherort für Vitamin K bilden die Knochen, in denen die Vitamin K-abhängigen Proteine Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein zu finden sind [Shearer, 2000]. Es wird zudem vermutet, dass Vitamin K₂ eine Rolle bei der Regulation des Knochenmetabolismus spielt und das Risiko von Osteoporose reduziert [Iwamoto et al., 2004; Plaza, Lamson, 2005]. Darüber hinaus ist Vitamin K₂ mit einem verminderten Risiko von koronaren Herzerkrankungen assoziiert [Geleijnse et al., 2004]. Indirekt beeinflusst Vitamin K die Zellproliferation und die Apoptose [Goruppi et al., 1996]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Vitamin K-abhängige Proteine in andere biologische Prozesse wie die Arterienverkalkung, Chemotaxis, Phagozytose und Signaltransduktion involviert sind [Schurgers et al., 2001; Berkner, Runge, 2004].

1.1.3 Vitamin K-abhängige Proteine

Zu den Vitamin K-abhängigen Proteinen gehören die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X wie auch die regulatorischen Proteine C, S und Z. Weiterhin zählen das Matrix Gla Protein (MGP) und Osteocalcin dazu, die beide in der extrazellulären Matrix von Knochen zu finden sind. MGP ist zusätzlich in anderen Geweben wie Lunge, Herz, Nieren und Knorpel präsent [Fraser und Price, 1988] und verhindert auf noch unbekannt Weise die Verkalkung von Knorpel und Arterien [Luo et al., 1997]. Die genaue Funktion von Osteocalcin, welches von Osteoblasten synthetisiert wird, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Man vermutet, dass es an Umbauprozessen des Knochens während der Differenzierung beteiligt ist [Ducy et al., 1996]. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass ein erhöhter Spiegel nicht vollständig carboxylierten Osteocalcins mit einer geringeren Knochendichte und einem erhöhten Risiko für Knochenbrüche und Hüftfrakturen im Alter einher geht („Osteoporose“) [Plaza et al., 2005]. Der Wachstumsfaktor Gas 6 und das Protein S binden als Liganden an spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und aktivieren diese [Saxena et al., 2001]. Über verschiedene Transduktionskaskaden werden so Apoptose, Zellwachstum und Zelltransformation beeinflusst [Goruppi et al., 1996]. Als Gla-Membranproteine mit meist noch unbekannter Funktion wurden die prolinreichen Gla-Proteine PRGP1 und PRGP2 sowie die Transmembranproteine TMG3 und TMG4 beschrieben [Kulman et al., 1997; Kulman et al., 2001]. Das PRGP2-Protein konnte als ein Bindungspartner des transkriptionellen Coaktivators Yes-associated Protein (YAP) identifiziert werden [Kulman et al., 2007]. Als eine Besonderheit wurden Vitamin K-abhängige Conotoxine in Invertebraten entdeckt [Stanley et al., 1997; Rigby et al., 1997; Bush et al., 1999]. Bei diesen Toxinen es handelt sich um neuroaktive Peptide aus marinen Kegelschnecken der Gattung *Conus*, die dieses lähmende Gift in ihre Beute injizieren. Es inhibiert NMDA-Rezeptoren (NMDA = N-Methyl-D-Aspartat) und wirkt so auf das zentrale Nervensystem von Vertebraten [Clark et al., 1981]. Weiterhin wurden sogar in der Seescheide *Ciona intestinalis* 4 Proteine mit Gla-Domänen gefunden (Ci-Gla1 – Ci-Gla4), die während der ganzen Entwicklung auf einem niedrigen Level exprimiert werden [Kulman et al., 2006]. Ci-Gla1 ist homolog zu einer Rezeptor-Tyrosinkinase mit Gla-Domänen (Gla-RTK) bei der verwandten Seescheide *Halocynthia roretzi* [Wang et al., 2003]. Ci-Gla2 besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu den integralen Membranproteinen Jagged 1 und 2 bei Vertebraten, welche die Körperentwicklung regulieren. Ci-Gla4 dagegen ähnelt einer verlängerten Variante des Proteins S und Gas6 [Kulman et al., 2006]. Diese Ci-Gla Proteine beweisen die evolutive Entstehung der Vitamin K-abhängigen

Gla-Domäne vor der Divergenz von Vertebraten und Urchordaten und lassen auf neuartige Funktionen der Gla-Proteine schließen.

Alle Vitamin K-abhängigen Proteine (VKD-Proteine) besitzen eine sogenannte aminoterminaler Gla-Domäne (GLA) (Abb. 3), die drei bis dreizehn Glutamatreste (Glu) beinhaltet und in allen VKD Proteinen homolog ist [Stenflo, Suttie, 1977; Berkner, Pudota, 1998]. An der Gla-Domäne findet eine Vitamin K-abhängige Carboxylierung durch die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) statt, welche die Glutamatreste posttranslational in γ -Carboxyglutamatreste (Gla) umwandelt. Eine der Gla-Domäne vorgelagerte Propeptidsequenz (PRO) dient der GGCX zur Erkennung [Jorgensen et al., 1987]. Dieser hoch konservierte und 18 Aminosäuren umfassende Abschnitt wird als γ -Carboxylase-Erkennungsregion (γ -CRS, γ -carboxylase recognition site) bezeichnet und enthält drei hoch konservierte Aminosäurereste. Mutationen in diesen drei Propeptidresten verringern die Affinität des VKD-Proteins zur γ -Glutamyl-Carboxylase. Nach posttranslationaler Modifikation der VKD-Proteine wird die γ -Carboxylase-Erkennungssequenz im Golgi-Apparat abgespalten. Die Blutgerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie die antikoagulatorischen Proteine C und Z besitzen am N-Terminus ihrer Vorläuferproteine ein Signalpeptid, welches das jeweilige Protein zum Endoplasmatischen Reticulum (ER) dirigiert und dort entfernt wird. Weiterhin besitzen diese Faktoren, bis auf das Prothrombin (Faktor II), alle zwei GF- (Growth factor) Domänen. Das Prothrombin weist stattdessen an dieser Position zwei Kringeldomänen auf. Die prokoagulatorischen Faktoren II, VII, IX und X sowie das Protein C besitzen weiterhin eine Serinprotease- (SP-) Domäne am C-Terminus und können somit enzymatisch aktiv werden. Protein Z hat eine Pseudo-Serinprotease-Domäne ohne katalytische Aktivität. Das gerinnungshemmende Protein S und das Gas 6-Protein (growth arrest specific protein 6), unterscheiden sich in ihrem Aufbau von den beschriebenen Proteinen. Sie besitzen u. a. vier GF-Domänen, und statt der SP-Domäne sind zwei Steroidhormon-Bindungsdomänen (SHBD) vorhanden [Berkner, Runge, 2004]. Die prolinreichen Gla-Proteine und die Transmembranproteine unterscheiden sich von den übrigen Vitamin K-abhängigen Proteinen und ähneln sich in ihrem Aufbau sehr stark untereinander. Sie weisen keine GF- und SP-Domänen auf, sondern besitzen nach der Pro- und Gla- Sequenz jeweils eine Transmembrandomäne (TM) und eine Cytoplasmadomäne (CYT).

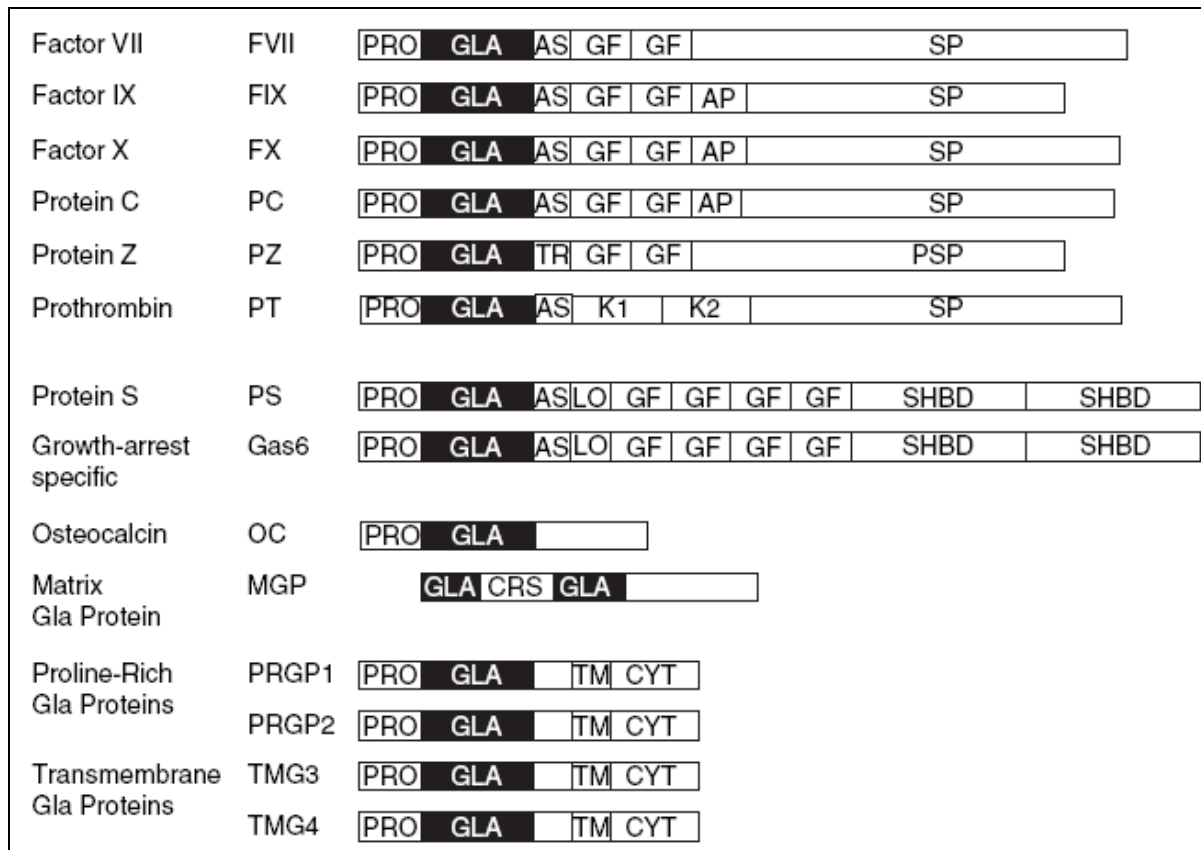


Abb. 3: Der Aufbau von Vitamin K-abhängigen Proteinen (Berkner und Runge, S.2121, 2004).

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

1.1.4 Die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) - verantwortlich für die Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren

Es handelt sich bei der Vitamin K-abhängigen γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) um ein integrales Membranprotein des rauen Endoplasmatischen Reticulums und Golgi-Apparates [Carlisle, Suttie, 1980; Stanton et al., 1991] mit einer molekularen Masse von 95 kDa [Wu et al., 1991]. Sie umfasst 758 Aminosäuren, besitzt 5 Transmembrandomänen (Abb.4) und wird in zahlreichen Geweben wie z.B. der Leber, der Haut, der Lunge und der Niere exprimiert [Tie et al., 2000; Stafford, 2005]. Das GGCX-Gen befindet sich auf Chromosom 2p12 [Kuo et al., 1994] und umfasst 15 Exons auf einer Länge von 13 kb. Im Jahre 2007 gelang die zweidimensionale Kristallisation des Enzyms [Schmidt-Krey et al., 2007].

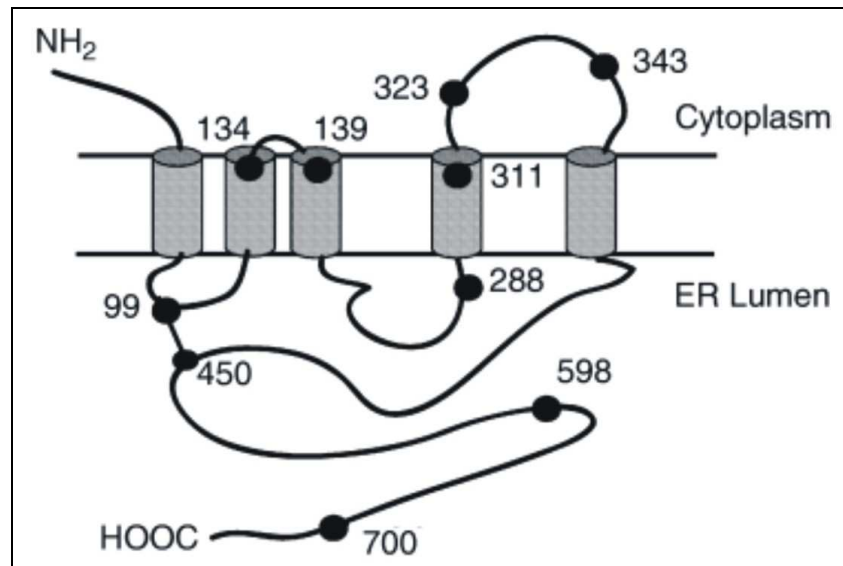


Abb. 4: Die Struktur der γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) (Stafford, S.1874, 2005).

Die schwarzen Kugeln symbolisieren Cysteine. Zwischen den Cysteinen 99 und 450 existiert eine Disulfidbrücke. Insgesamt sind fünf Transmembrandomänen vorhanden.

Das Enzym carboxyliert die Vitamin K-abhängigen Proteine, wobei für die Reaktion Vitamin K-Hydrochinon als Cofaktor benötigt wird. Diese Carboxylierung in der Gla-Domäne der Vorläuferproteine führt zur Umwandlung des schwachen Ca^{2+} -Chelators Glutamat in den stärkeren Ca^{2+} -Chelator γ -Carboxyglutamat. Die verstärkte Ca^{2+} -Bindung ermöglicht eine Proteinkonformationsänderung, so dass sich die Proteine an Phospholipidmembranen verankern können [Borowski et al., 1986]. Hier erfolgt die Komplexbildung mit ihren Aktivatoren, welche die Proteine in ihre katalytisch aktive Form umwandeln.

Das Vitamin K-Hydrochinon wird während der Carboxylierungsreaktion unter Verbrauch von Sauerstoff zu Vitamin K-2,3-Epoxid oxidiert [Morris et al., 1993]. Als Zwischenprodukt bildet sich dabei das kurzlebige Vitamin K-Alkoxid, welches als starke Base dem γ -Kohlenstoff des Glutamatrestes von Vitamin K-abhängigen Proteinen ein Proton entzieht. Durch die Anlagerung von Kohlenstoffdioxid entsteht anschließend das γ -Carboxyglutamat unter der Katalyse der GGCX [Furie et al., 1999]. Dowd und Mitarbeiter [Dowd et al., 1995] postulierten, dass am Anfang dieser Reaktionskette ein Cystein der Carboxylase als schwache Base die erste Deprotonisierung des Vitamin K-Hydrochinons katalysiert. (Abb. 5).

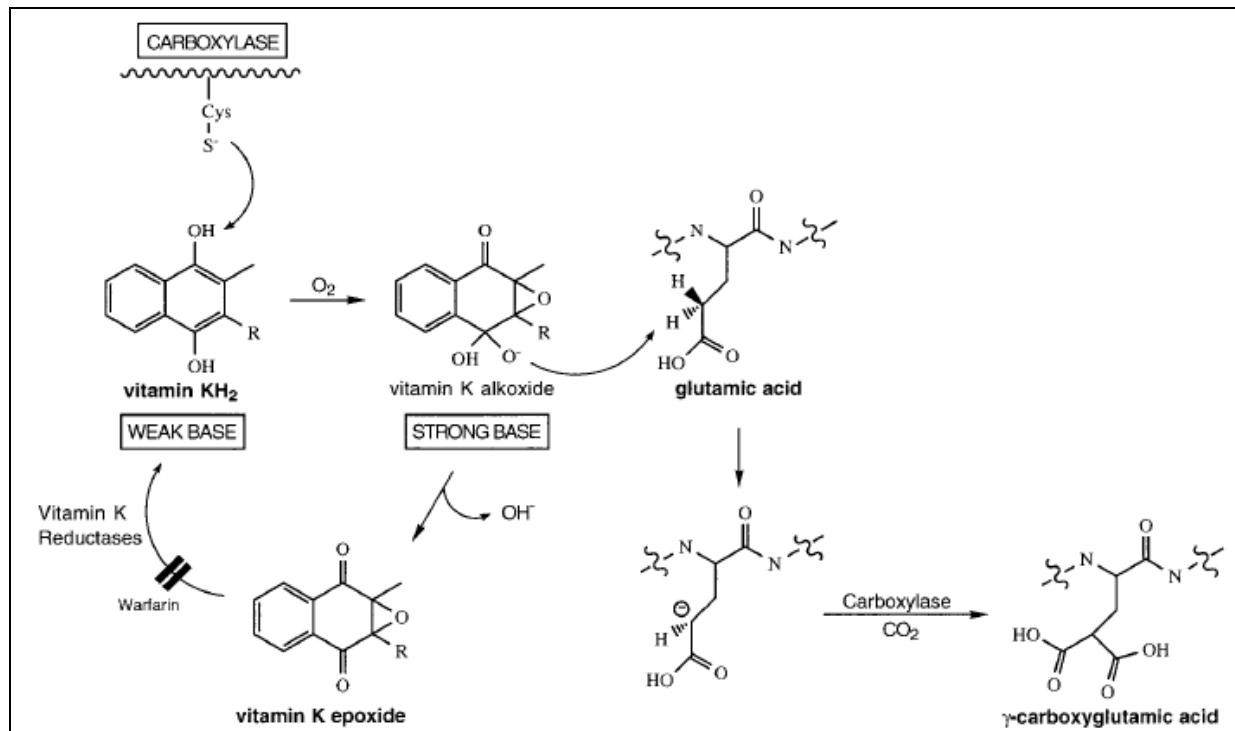


Abb. 5: Mechanismus der Vitamin K-abhängigen γ -Carboxylierung von Glutamatresten (Furie et al., S. 1799, 1999).

Ein Cystein (Cys) der GGCX (carboxylase) entzieht dem Vitamin K-Chinon (vitamin KH_2) ein Proton, so dass mit Hilfe von Sauerstoff (O_2) Vitamin K-Alkoxid (vitamin K alkoxide) entsteht. Dieses Intermediat fungiert als starke Base (strong base) und deprotoniert die Glutamatreste (glutamic acid), so dass sich das reaktive Carbanion bildet. Die Addition von CO_2 an das Carbanion bildet unter der Katalyse der GGCX das Produkt γ -Carboxyglutamat (γ -carboxyglutamic acid). Das instabile Vitamin K-Alkoxid wird in Vitamin K-Epoxid (vitamin K epoxide) umgewandelt, welches wiederum in einer warfarin-sensitiven Reaktion zu Vitamin K-Chinon recycelt wird.

Neuere Untersuchungen scheinen allerdings dieses Modell von Dowd teilweise zu widerlegen. Sie zeigten über *in vitro* Mutagenese und einen Aktivitätsassay, dass eine Carboxylase, in der alle Cysteine nach Alanin substituiert wurden, weiterhin ihre Aktivität behält und ein aktiviertes Amin für die Deprotonierung des Vitamin K-Hydrochinons verantwortlich ist [Rishavy et al., 2004]. Eine durchgeführte Brønsted-Analyse, mit welcher der Effekt von Aminen mit unterschiedlichen pK_a -Werten gemessen werden kann, zeigte darüber hinaus, dass ein Lysin an Position 218 die essentielle Base in der γ -Carboxylase für die Initiation der Deprotonierungsreaktion von Vitamin K-Hydrochinon ist [Rishavy et al., 2006].

1.1.5 Der Vitamin K-Zyklus - ein Recyclingprozess zur Bereitstellung von Vitamin K

Seit der Entdeckung der Vitamin K-Epoxid-Reduktase-Reaktion (VKOR) im Jahre 1970 durch Bell und Matschiner [Bell, Matschiner, 1970] wurden die Komponenten und Mechanismen des Vitamin K-Zyklus intensiv untersucht. Dieser Redoxzyklus wird in hepatischen Mikrosomen durchlaufen und ermöglicht die effiziente Rückgewinnung und Bereitstellung von reduziertem Vitamin K als essentiellen Cofaktor für die γ -Glutamyl-Carboxylase (Abb. 6). Die γ -Carboxylierung eines Glutamatrestes ist verbunden mit der Bildung eines Moleküls Vitamin K-Epoxid. Um einen weiteren Carboxylierungsschritt durchführen zu können, muss das Vitamin K-Epoxid über die Chinon-Form zum Vitamin K-Hydrochinon recycelt werden. Für diese Reduktion konnten zwei voneinander unabhängige, dithiol-gekoppelte Enzyme nachgewiesen werden [Wallin et al., 1987]. Zum einen handelt es sich um die DT-Diaphorase, eine NAD(P)H-Dehydrogenase, welches ausschließlich die Umsetzung von Chinon zu Hydrochinon katalysieren kann [Wallin et al., 1978]. Da für seine Aktivität unphysiologisch hohe Konzentrationen an Vitamin K-Chinon erforderlich sind, kommt diesem Enzym unter physiologischen Bedingungen vermutlich jedoch keine entscheidende Rolle im Vitamin K-Zyklus zu [Furie et al., 1998]. Das zweite Enzym ist in der Lage sowohl das Vitamin K-Epoxid als auch das Chinon zu reduzieren und ist bereits bei niedrigen Vitamin K-Epoxid- und Chinonkonzentrationen aktiv [Cain et al., 1998]. Es wird als Vitamin K-Epoxid-Reduktase bezeichnet und stellt die essentielle Komponente des Vitamin K-Zyklus dar (vgl. Kap. 1.1.6).

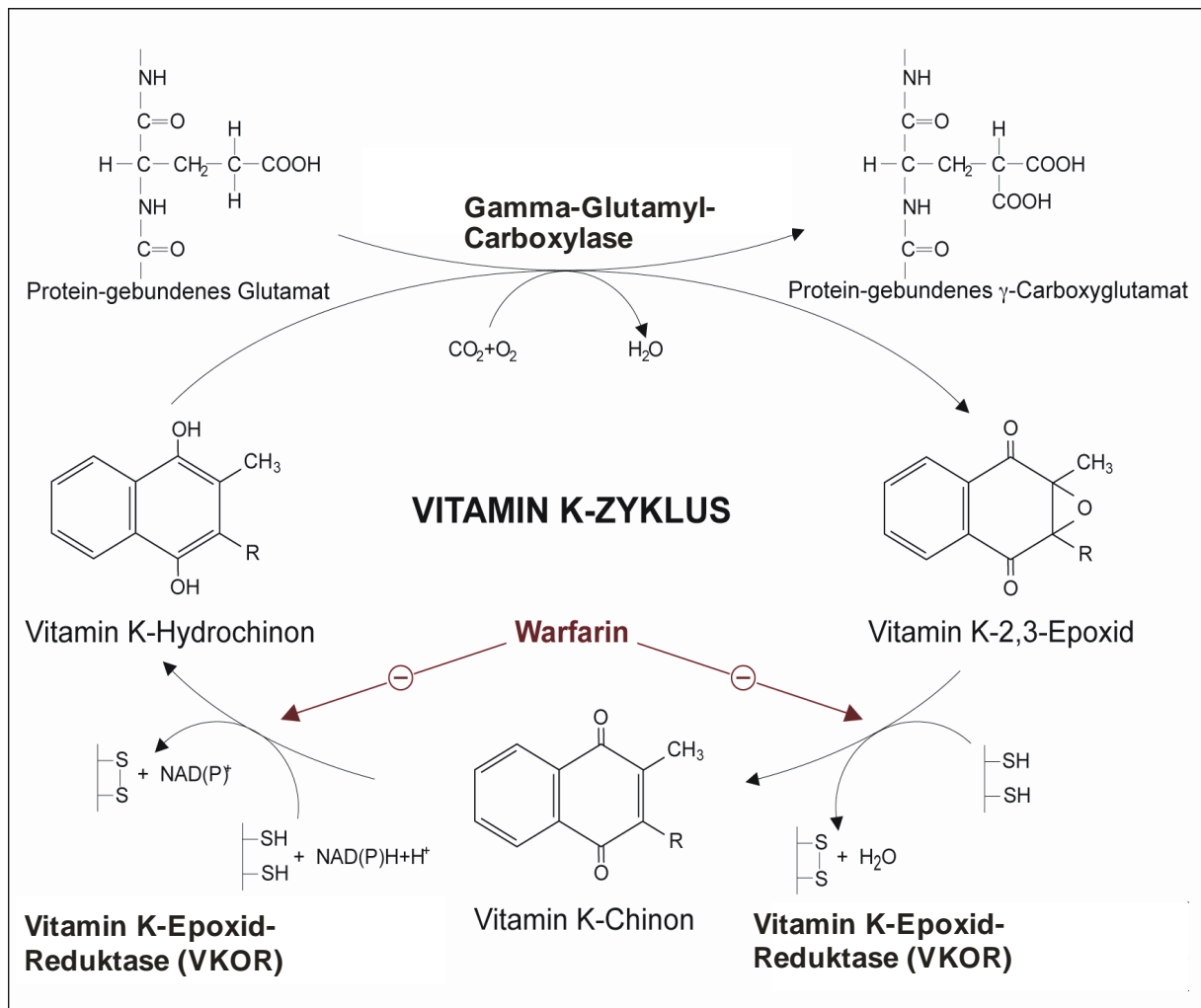


Abb. 6: Der Vitamin K-Zyklus (nach Wallin und Martin, 1987).

Im Vitamin K-Zyklus wird das Vitamin K-2,3-Epoxid über die Chinonform zum Vitamin K-Hydrochinon recycelt. Dieses reduzierte Vitamin K₁ wird von der γ -Glutamylcarboxylase als Cofaktor neben CO_2 und O_2 benötigt, um die Carboxylierung von spezifischen Glutamatresten zu Carboxyglutamat umzusetzen. Die beiden warfarinsensitiven Reduktionsschritte von Vitamin K₁ werden von der Vitamin K-Epoxid Reduktase (VKOR) katalysiert.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass es sich bei der Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKOR) um einen Multienzymkomplex handelt, der die Recyclingreaktionen des Vitamin K bewerkstelligt. Cain et al. postulierten ein Modell, nach welchem eine mikrosomale Epoxidhydrolase und ein noch unbekanntes Mitglied der Glutathion-S-Transferase (GST-Familie) die VKOR-Aktivität ausmachen [Cain et al., 1997]. Die Klonierung und Charakterisierung des VKORC1-Proteins stellte das hypothetische Modell in Frage und bekräftigte die Annahme, dass dieses Protein allein für die VKOR-Aktivität verantwortlich ist. So zeigen Knockout-Mäuse ohne mikrosomale Epoxidhydrolasen bzw. ohne Glutathion-S-Transferasen keine verminderte Blutgerinnung [Miyata et al., 1999; Stafford, 2005]. Des Weiteren wurde nach Aufreinigung des VKORC1-Proteins nachgewiesen, dass das Enzym

die Reduktion von Vitamin K-Epoxid zum Chinon ausführt. Im Vergleich zur VKOR in Mikrosomen ist dabei die Aktivität von aufgereinigtem VKORC1 nicht erniedrigt [Chu et al., 2006]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Reduktion von Vitamin K-Chinon in seine Hydrochinonform vom VKORC1 übernommen wird [Jin et al., 2007]. Ein direkter Nachweis ist allerdings schwierig, da es sich beim Hydrochinon um eine sehr instabile Verbindung handelt.

Damit der Vitamin K-Recyclingprozess ablaufen kann, werden Elektronen für die Reduktion des Vitamin K-Epoxids am Redoxzentrum der VKOR benötigt. Bislang wurde angenommen, dass Lipoamid [Thijssen et al., 1994] oder das Thioredoxinsystem [Soute et al., 1992] als *in vivo* Reduktionsmittel fungieren. Die Arbeitsgruppe um Wallin vermutet, dass die Reduzierung von Vitamin K-Epoxid mit der dithiolabhängigen oxidativen Faltung von Proteinen im ER an die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) gekoppelt ist [Wajih et al., 2007]. Bei der PDI handelt es sich um eine thioredoxin-ähnliche Oxidoreduktase, welche in hohen Konzentrationen im Lumen des endoplasmatischen Reticulums vorkommt und fünf Domänen (a, a', b, b', c) besitzt. In den Domänen a und a' findet man das CXXC-Motiv als CGHC-Motiv (Cystein-Glycin-Histidin-Cystein), welches das Thiol-Redoxzentrum des Enzyms ausmacht. Hier wird die thiolabhängige oxidative Faltung von neu synthetisierten Proteinen katalysiert. Die b-b'-Domäne stellt die hydrophobe Bindungsstelle für die PDI-Substrate dar, mit der auch die VKOR interagieren könnte. Das hypothetische Modell für die Elektronenbereitstellung nach Wajih ist in Abb. 7 dargestellt. Die PDI überträgt Elektronen im PDI-VKORC1-Komplex an das CXXC-Motiv der VKOR, wo die Reduzierung von Vitamin K-Epoxid zu Vitamin K-Chinon stattfindet. Die bereitgestellten Elektronen stammen aus der oxidativen Faltung von neu synthetisierten Proteinen, die im Thiol-Redoxzentrum der PDI abläuft. Bei dieser Reaktion wird die PDI selbst reduziert. Die Reoxidation des Redoxzentrums der PDI ist an die Reduktion der Endoplasmatischen-Retikulum-Oxidase 1 (ERO 1) gekoppelt. Um diese wiederum für einen weiteren Durchlauf zur Verfügung zu stellen, ist ihre Oxidation an die Bildung von H₂O₂ aus Sauerstoff gebunden.

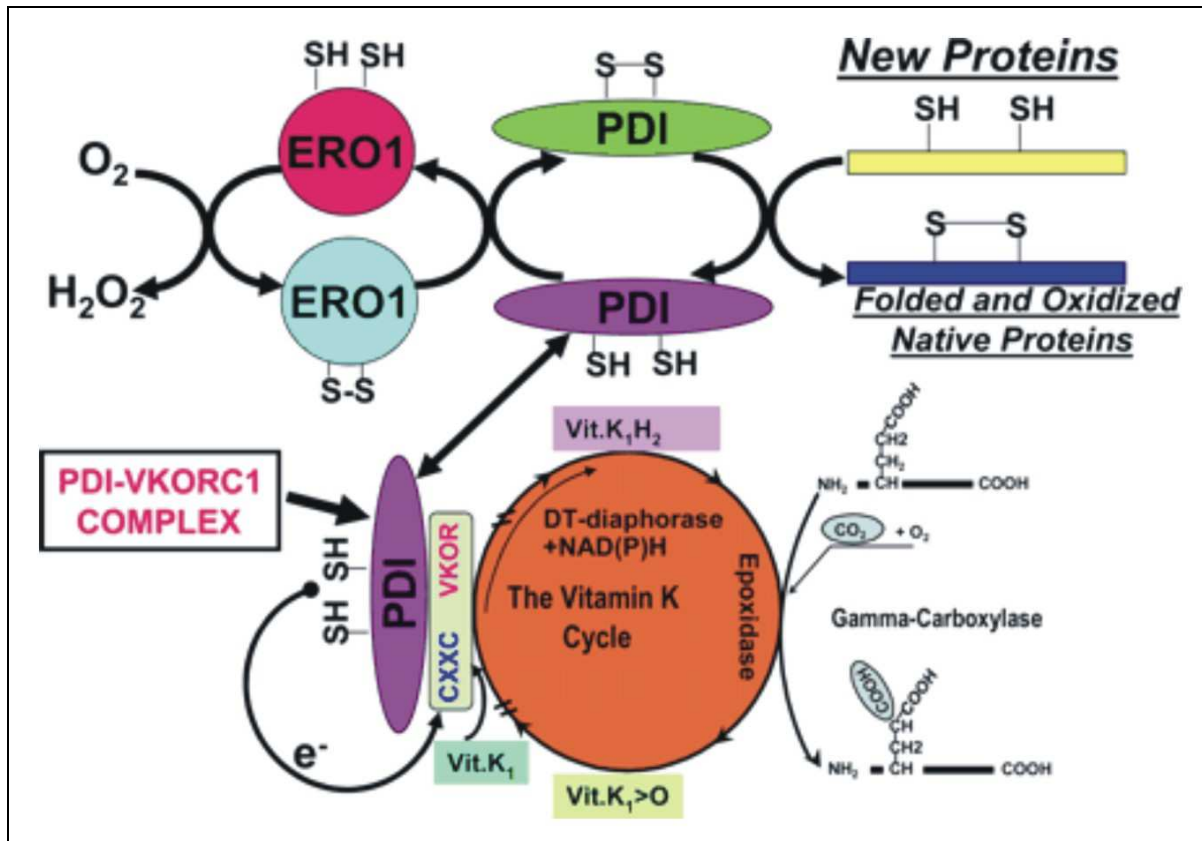


Abb. 7: Das Modell des Enzymkomplexes (Wajih et al., S. 2633, 2007).

Elektronenbereitstellung für das CXXC-Motiv des VKORC1-Proteins durch die PDI.

ERO1 = Endoplasmatische-Retikulum-Oxidase 1, new proteins = neu synthetisierte Proteine, PDI = Protein-Disulfid-Isomerase, e⁻ = Elektronen

1.1.6 Die Vitamin K-Epoxid Reduktase (VKORC1) - das zentrale Protein im Vitamin K-Zyklus

Das VKORC1-Gen, das für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase codiert, konnte durch eine Kopplungsanalyse auf Chromosom 16p12-q21 identifiziert werden [Fregin et al. 2002, Rost et al. 2004]. Zeitgleich beschäftigte sich die Arbeitsgruppe von Stafford ebenfalls mit der Identifizierung des Gens [Li et al., 2004]. Der Nachweis von Mutationen im VKORC1-Gen bei Patienten mit VKCFD2 und Warfarin-Resistenz (vgl. Kap. 1.1.8 und 1.1.10) sowie bei warfarinresistenten Ratten zeigte die Bedeutung dieses Proteins im Vitamin K-Stoffwechsel. Das VKORC1-Protein stellt somit die zentrale Komponente im Vitamin K-Zyklus beim Recycling des Vitamin K-Epoxids dar [Jin et al., 2007]. Das VKORC1-Gen erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 5126 bp, wobei drei Exons die codierende Sequenz von 492 bp umfassen. Das exprimierte Protein setzt sich aus 163 Aminosäuren zusammen und besitzt eine molekulare Masse von 18 kDa. Die subzelluläre Lokalisation des VKORC1 im endoplasmatischen Reticulum konnte über immunfluoreszierende Antikörper nachgewiesen werden [Rost, Fregin, 2004]. Weiterhin lassen sich für das Enzym drei bis vier Transmembrandomänen vorhersagen [Rost et al., 2004; Goodstadt, Ponting, 2004]. Dabei

sind im Modell mit drei Transmembrandomänen die erste und zweite Transmembrandomäne durch einen langen cytoplasmatischen Loop und die zweite und dritte Domäne durch einen lumenalen Loop von 7 Aminosäuren verbunden. Das N-terminale Ende ist im Lumen des ER zu finden, das C-terminale Ende der Aminosäuresequenz, an dem sich ein ER-Retentionssignal befindet, ist cytosomal lokalisiert (Abb. 8). Über Northern Blot Analysen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die höchste Expression des VKORC1-Gens in fötaler und adulter Leber zu finden ist, gefolgt von fötalem Herzen sowie von adulter Niere, Lunge und Pankreas.

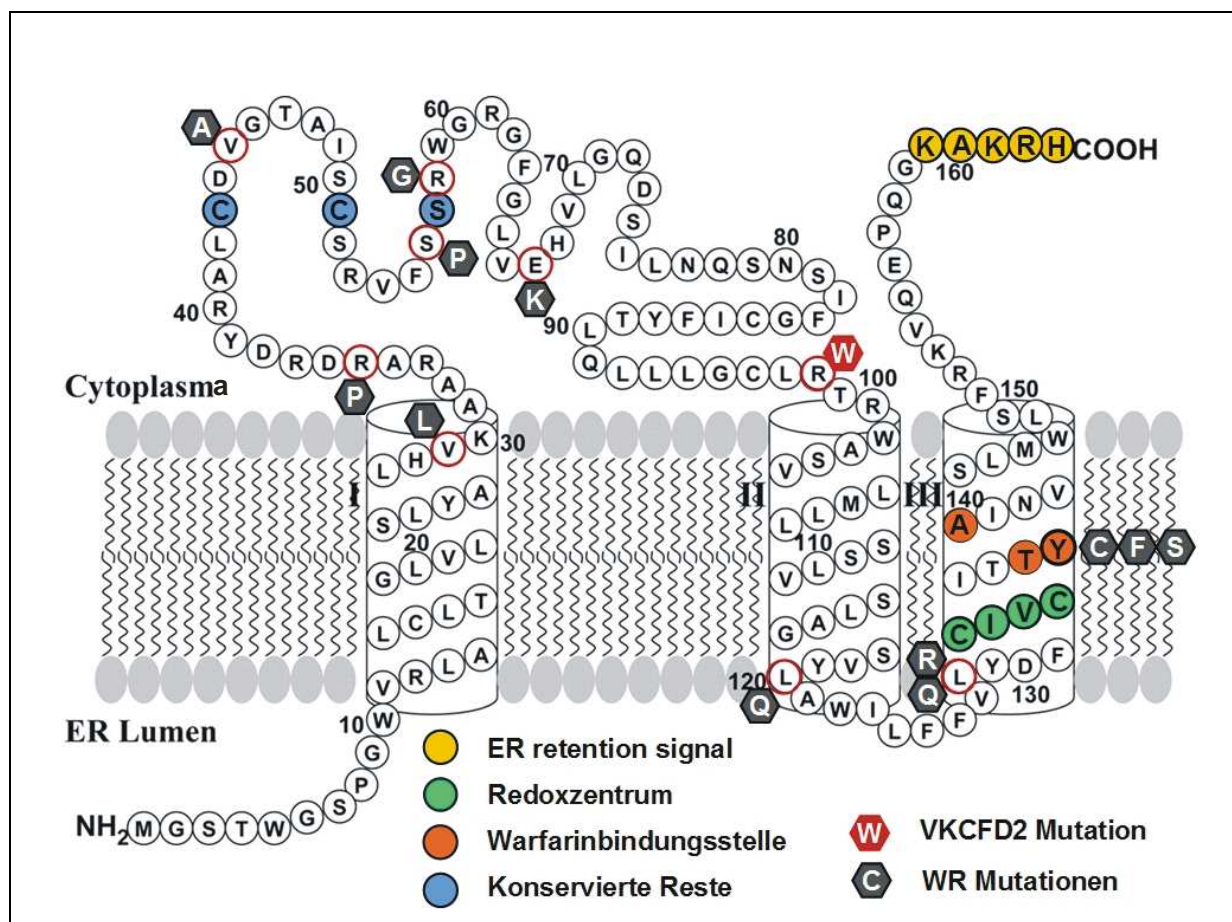


Abb. 8: Die Struktur von VKORC1 im endoplasmatischen Reticulum (nach Tie et al., 2005; Oldenburg et al., 2006).

Für das 163 Aminosäuren umfassende VKORC1-Protein werden 3 Transmembrandomänen vorhergesagt. Das C-terminale Ende mit dem ER-Erkennungssignal befindet sich im Cytoplasma. Das CXXC-Motiv stellt das Redoxzentrum dar, das TYA-Motiv wird als Warfarinbindungsstelle angenommen. Die grau hinterlegten Mutationen vermitteln eine Warfarinresistenz, der rot markierte Aminosäureaustausch wurde für die Erkrankung VKCFD2 gefunden. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt.

Um Aufschlüsse über die Struktur der VKOR und die Funktion der einzelnen Aminosäuren im Protein zu bekommen, wurde zielgerichtete Mutagenese angewandt und die Homologie zwischen verschiedenen Spezies untersucht. Für einige Aminosäuren konnte eine 100%ige

Konservierung in Genen aus Archaeobakterien, Eubakterien und Metazoa nachgewiesen werden, so dass man eine essentielle Rolle dieser Aminosäuren für die enzymatische Aktivität des VKORC1 annehmen kann [Goodstadt, Ponting, 2004]. Dabei konnten die hoch konservierten Cysteine an den Positionen 43, 51, 132 und 135 sowie ein Serin an der Position 57 identifiziert werden. Ein Aminosäureaustausch an Position 57 führt zum fast vollständigen Verlust der VKOR-Aktivität, so dass vermutet wird, dass dieses Serin ein Bestandteil des aktiven Zentrums ist [Rost et al., 2005].

Weiterhin ist ein sogenanntes CIVC-Motiv im VKORC1-Protein vorhanden, das allgemein auch als CXXC-Motiv bezeichnet wird. CIVC steht dabei für Cystein an Position 132, Isoleucin 133, Valin 134 und Cystein 135. Das CXXC-Motiv kommt auch in der hochkonservierten bakteriellen Proteinfamilie von NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Komplexen (NqrC) vor und erfüllt dort die Funktion des katalytisch aktiven Redoxzentrums. Daher nimmt man an, dass auch das CIVC-Motiv des VKORC1 eine ähnliche Funktion wie das CXXC-Motiv ausübt und die Reduktion von Vitamin K-Epoxid zu Vitamin K-Chinon katalysiert. Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist das hydrophobe TYA-Motiv (Threonin 138, Tyrosin 139, Alanin 140), welches vermutlich für die Warfarinbindung verantwortlich ist [Rost et al., 2005]. Dabei scheint das Tyrosin an Position 139 direkt an der Bindung von Warfarin beteiligt zu sein [Pelz et al., 2005]. In der Warfarin-sensitiven Chinon-Oxidoreduktase NQOR konnte dieses Motiv als Dicumarolbindungsstelle identifiziert werden [Hall et al., 1972; Myszka et al., 1991; Ma et al., 1992]. Die Sequenzhomologie zur NQOR und der Verlust der Warfarinbindung bei einem mutierten TYA-Motiv sprechen für eine direkte Beteiligung dieser Aminosäurereste an der Warfarinbindung im VKORC1. Ein Arginin an Position 58 scheint für die Tertiärstruktur des VKORC1-Proteins essentiell zu sein. Durch *in vitro* Mutagenese konnte ein kompletter Verlust der Enzymaktivität erreicht werden, der vermutlich auf die Veränderung der Proteinfaltung zurückzuführen ist [Rost et al., 2005]. Untersuchungen von Jin et al. konnten zeigen, dass die konservierten Cysteine 43 und 51 im VKORC1-Protein nicht für die Umsetzung von Vitamin K-Epoxid zu Vitamin K-Chinon und für die Reduktion von Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon notwendig sind. Dagegen sind die Cysteine des CXXC-Motivs an Position 132 und 135 für diese beiden Reaktionen essentiell [Jin et al., 2007]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Mutation dieser beiden Cysteine zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität führt [Rost et al., 2005; Wajih et al., 2005].

1.1.7 Das Calumenin im γ -Carboxylierungssystem – ein Inhibitor der VKOR?

Calumenin gehört zu einer Unterfamilie von Ca^{2+} -bindenden Proteinen, von welchen die meisten Chaperone sind [Honore, Vorum, 2000]. Seine vermutete Rolle in der Blutgerinnung rührt von Untersuchungen der Arbeitsgruppe Raidar Wallin her, die eine Hochregulierung des Calumenins als molekularen Mechanismus der Warfarinresistenz eines amerikanischen Rattenstamms beschrieben haben [Wallin et al., 2001]. Calumenin soll regulatorische Funktionen auf die VKOR und die γ -Carboxylase ausüben, die Teile eines Enzymkomplexes in der Membran des endoplasmatischen Reticulums sind. Calumenin bindet nach dem hypothetischen Modell von Wajih et al. an die γ -Glutamyl-Carboxylase und inhibiert so die VKOR und die Carboxylase als Chaperon. Es kann damit die Aktivität und die Warfarinsensitivität der VKOR beeinflussen (Abb. 9). Eine Behandlung des Calumenin-Gens mit siRNA resultierte in einer fünffachen Erhöhung der γ -Carboxylase-Aktivität. Eine Überexpression von Calumenin in Hepatozyten der Ratte führte dagegen zur Verminderung der Aktivität der Carboxylase. Desweiteren sprechen bioinformatische Sequenzanalysen für eine Interaktion von Calumenin und der γ -Glutamyl-Carboxylase [Wajih et al., 2004].

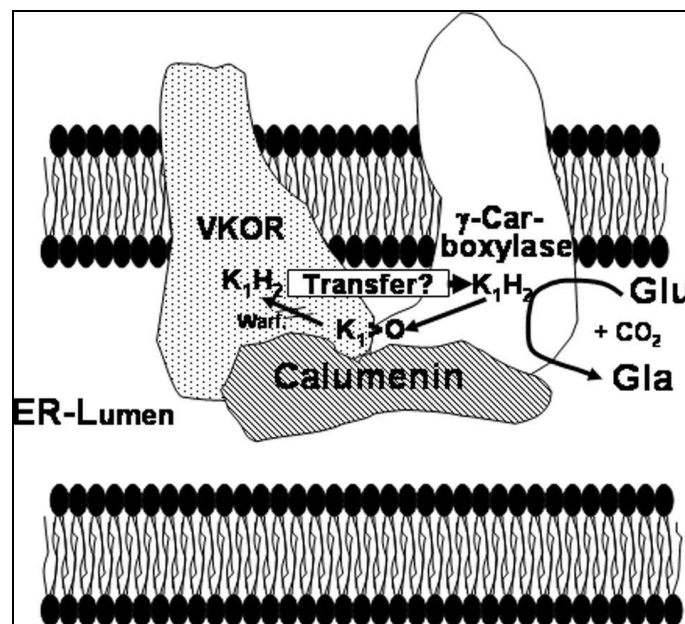


Abb. 9: Ein molekulares Modell des γ -Carboxylierungssystems (Wajih et al., S. 25281, 2004).

Inhibierung der VKOR und der GGCX durch die Bindung des Calumenins an die beiden Komponenten.

1.1.8 Erblich bedingter Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Bei dem erblich bedingten kombinierten Mangel an Vitamin K-abhängigen Koagulationsfaktoren II, VII, IX, X, Protein C und Protein S handelt es sich um eine seltene hereditäre Gerinnungsstörung, von der weltweit 15 Fälle bekannt sind. Bei der Erkrankung liegt eine autosomal rezessive Vererbung vor, welche eine unterschiedlich starke phänotypische Ausprägung des Krankheitsbildes hervorruft (VKCFD = combined deficiency of vitamin K dependent clotting factors). Je nachdem wie viel funktionsfähige Blutgerinnungsfaktoren noch vorhanden sind, kann es zu unterschiedlich stark auftretenden Blutungen und vereinzelt auch zu Skelettanomalien kommen [Zhang et al., 2004]. Eine Behandlung dieses kombinierten Mangels an Vitamin K-abhängigen Proteinen ist durch orale Verabreichung von Vitamin K möglich, wobei bei einigen Patienten die Krankheitssymptome selbst durch hohe intravenöse Dosen von Vitamin K nicht vollständig aufgehoben werden konnten [Oldenburg et al., 2007].

Diese Erkrankung kann verschiedene Ursachen haben, daher wird zwischen zwei Subtypen unterschieden. VKCFD vom Typ I (VKCFD1) wird durch einen Defekt in der γ -Carboxylase verursacht, so dass infolge einer unzureichenden oder fehlenden Carboxylierung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren spontane Blutungen auftreten [Rost et al., 2004]. Zur Funktionsstörung kann es kommen, wenn Mutationen in der γ -Carboxylase vorliegen. So wurden Defekte unter anderem in der katalytischen Domäne, in der Region mit Epoxidase-Aktivität und in der Propeptid-Bindungsstelle nachgewiesen. In zwei VKCFD1-Patienten wurde die Mutation L394R im Exon 9 bzw. W501S im Exon 11 gefunden, die eine verminderte γ -Carboxylase-Aktivität bewirken [Brenner et al., 1998; Spronk et al., 2000]. Weiterhin wurde eine Splice-site Mutation von Exon 3 beschrieben, die zu der Erkrankung VKCFD1 führt [Rost et al., 2004]. Bei zwei deutschen Patienten wurde eine Punktmutation in Exon 11 als Founder-Effect ausfindig gemacht, die einen Aminosäureaustausch von Arginin nach Prolin an Position 485 bewirkt [Rost et al., 2008]. In einem der beiden Patienten ist die zusätzliche Mutation His404Pro im GGCX-Gen vorhanden [Rost et al., 2008].

Beim Typ II der VKCFD-Erkrankung (VKCFD2) ist der Vitamin K-Zyklus betroffen. Hier ist die Bereitstellung des Vitamin K-Hydrochinons für die Carboxylierungsreaktion gestört [Rost et al., 2006]. Ursächlich für den Mangel dieses Cofaktors ist ein auf einer homozygoten Mutation basierender Defekt in dem Gen VKORC1 für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase, so dass die Umwandlung des Vitamin K-Epoxids in die Hydrochinon-Form nicht regulär

ablaufen kann. Bis heute wurden drei nicht verwandte Familien mit einem Aminosäureaustausch von Arginin nach Tryptophan an Position 98 des VKORC1-Proteins identifiziert [Oldenburg et al., 2000; Rost et al., 2004; Marchetti et al., 2008].

1.1.9 Vitamin K-Antagonisten - Therapeutika bei Thromboembolien sowie Mittel zur Nagerbekämpfung

Ein natürlich vorkommender Antagonist zum Vitamin K, das Dicoumarol, konnte durch Stahmann et al. 1941 als 3-3'-methyl-bis-4-(hydroxycoumarin) isoliert werden [Stahmann et al., 1941]. Diese Substanz war für die „sweet clover disease“ in den 20er Jahren verantwortlich, an der Rinder in den USA und Kanada nach Verzehr von verdorbenem Klee erkrankten. Symptome waren lebensgefährliche Blutungen, die durch erniedrigte Prothrombinaktivität ausgelöst wurden, aber durch Bluttransfusionen behoben werden konnten.

Inzwischen kommen zahlreiche synthetische 4-Hydroxycumarinderivate für die Therapie und Prophylaxe von Beinvenenthrombosen und Lungenembolie, z.B. nach künstlichem Herzklappenersatz und Vorhofflimmern, zum Einsatz [Suttie, 1994]. Verwendete Antikoagulantien sind z.B. Warfarin (Coumadin®), Phenprocoumon (Marcumar®) oder Acenocoumarol (Sintrom®), deren Einnahmedosis bei jedem Patienten individuell eingestellt sein muss. Eine zu hohe Dosierung des Anticoagulanz kann innere Blutungen verursachen, die bis zum Tode führen können. Oral verabreichtes Warfarin wird zu 98% an Plasmaproteine wie Serumalbumin gebunden und über den Blutkreislauf transportiert. Nur ein kleiner Anteil an freiem Warfarin inhibiert die VKOR in der Leber [Gage, Lesko, 2008].

Die Cumarinderivate wirken auf den Vitamin K-Zyklus, indem sie die Vitamin K-Epoxidreduktase nicht-kompetitiv inhibieren und die Umwandlung von Vitamin K-Epoxid zu Vitamin K-Hydrochinon blockieren [Begent et al., 2001]. Als Folge können die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren von der γ -Glutamyl-Carboxylase nicht carboxyliert werden, da Vitamin K-Hydrochinon für diese Reaktion als Cofaktor benötigt wird. Eine verstärkte Blutungsneigung ist die Folge.

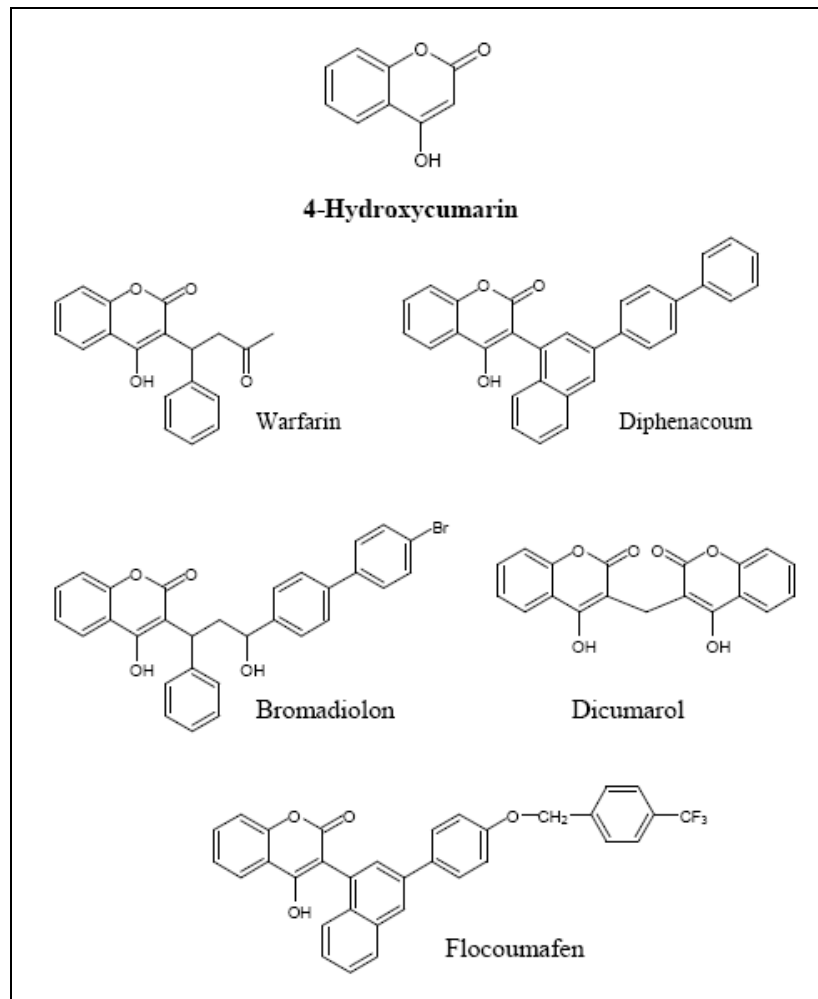


Abb. 10: 4-Hydroxycoumarin und seine Derivate.

Hoch dosierte Coumarinderivate und Indan-1,3-dionderivate, eine weitere Gruppe von Vitamin K-Antagonisten, werden auch als Rodentizide gegen Mäuse und Ratten eingesetzt [Jackson et al., 1988]. Man unterscheidet zwischen Antikoagulantien der ersten Generation, welche u.a. Warfarin, Chlorphacinon und Diphacinon umfassen, und Antikoagulantien der zweiten Generation mit Difenacoum, Bromadiolon, Brodifacoum und Flocoumafen (Tab. 1). Im Gegensatz zu früher eingesetzten Akutgiften wie Arsen, Thallium oder Strychnin tritt die Wirkung der Antikoagulantien verzögert ein, so dass die Tiere nicht in der Lage sind, Vergiftungssymptome der Artgenossen in eine ursächliche Verbindung mit dem Köder zu bringen [Joermann et al., 2001]. Die Entwicklung der potenteren Antikoagulantien der zweiten Generation wurde notwendig, da sich in vielen Rattenpopulationen Resistenzen gegenüber Warfarin ausbreiteten.

Antikoagulantien der ersten Generation	Warfarin, Chlorphacinon, Diphacinon, Coumatetralyl
Antikoagulantien der zweiten Generation	Difenacoum, Bromadiolon, Brodifacoum, Flocoumafen, Difethialon

Tab. 1: Übersicht zu rodentiziden Wirkstoffen.

1.1.10 Warfarinresistenz beim Menschen

Das Medikament Marcumar® (in England und den USA kommt das verwandte Warfarin zum Einsatz) wird zur Prophylaxe und Behandlung von Thrombosen sowie Schlaganfällen, Gefäßverschlüssen und nach Herzoperationen eingesetzt, da es als Antagonist von Vitamin K die Blutgerinnung verlangsamt. Allerdings treten immer wieder Fälle auf, in denen die Patienten unempfindlich gegenüber dem Coumarinderivat sind und erheblich höhere Dosierungen benötigen. Bei der Standard-Therapie mit Antikoagulantien erhalten die Patienten 2 bis 15 mg Marcumar pro Tag, bei Patienten mit Warfarinresistenz liegt die verabreichte Dosis zwischen 30 und 150 mg pro Tag.

Für die stark variierende Empfindlichkeit auf Warfarin gibt es mehrere Gründe. Zum einen kann durch eine hohe Vitamin K-Aufnahme über die Nahrung die Wirksamkeit des Medikamentes herabgesetzt werden, zum anderen wird die Halbwertszeit von Warfarin durch enzym-induzierende Mittel wie Barbiturate verkürzt. Auch bewirken eine verringerte Aufnahme des Medikaments im Darm sowie eine autosomal dominant vererbare Warfarin-Unempfindlichkeit beim Menschen eine veränderte Reaktion auf die Vitamin K-Antagonisten [Kéréveur et al., 1997]. Bei einigen Patienten mit einer Marcumarresistenz treten heterozygote Mutationen im VKORC1-Gen auf [Rost et al., 2004]. Bisher wurden vier unterschiedliche Missense-Mutationen gefunden (V29L, V45A, R58G, L128Q), die jeweils eine verschiedene Sensitivität gegenüber dem Coumarinderivat aufweisen. Die Patienten mit den Mutationen V29L und L128Q reagieren nicht auf hohe Dosen Warfarin und scheinen daher eine vollständige Resistenz zu besitzen. Bei den Mutationen V45A und R58G wird dagegen eine 5- bzw. 10-fache Warfarindosis benötigt [Rost et al., 2004].

Weiterhin konnten Polymorphismen im VKORC1-Gen gefunden werden, die zwar keine ausgeprägte Resistenz hervorrufen, aber einen Einfluss auf die benötigte Warfarindosis haben. Es handelt sich bei den Polymorphismen zum einen um die Transition 1173C>T in Intron 1 [Rieder et al., 2005]. Der homozygote Genotyp 1173TT benötigt signifikant weniger Warfarin

als der CC oder CT Genotyp. Dieser Polymorphismus ist mit einem SNP an Position 6484 assoziiert, welcher in einem regulatorischen Bereich des VKORC1-Gens liegt. Diese regulatorische Sequenz kann Transkriptionsfaktoren binden, und ein vorhandener SNP in diesem Bereich beeinflusst über die mRNA-Expressionsrate des Gens die benötigte Warfarindosis. Zum anderen ist eine Transition 3730G>A in der 3'UTR bekannt [D'Andrea et al., 2005]. Der 3730AA-Genotyp erfordert deutlich höhere Warfarindosen als der GA und der GG-Genotyp. Die zugrunde liegenden Prozesse der Wirkungsweise konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Zwei weitere SNPs im Intron 2 sind stark in der weißen Bevölkerung mit dem Warfarinbedarf assoziiert. Der CC Genotyp des Polymorphismus 1542 G>C und der TT Genotyp für den SNP 2255 T>C benötigen eine signifikant niedrigere Warfarindosis als die jeweils anderen beiden Haplotypen [Li et al., 2006]. Weiterhin konnte für den Polymorphismus -1639 G>A im Promoter des VKORC1-Gens ebenfalls ein Einfluss auf den Warfarinbedarf nachgewiesen werden. Der GG Genotyp erfordert höhere Warfarindosen als der GA und der AA Genotyp. Dabei scheint dieser SNP einen Einfluss auf die Chromatinmodifikation und damit auf die Regulation der VKORC1-Expression zu haben [Wang et al., 2008].

Weitere Polymorphismen, welche die Warfarindosis beeinflussen, sind im CYP2C9-Gen lokalisiert. Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 10q24.2, gehört zur Cytochrom P450-Familie und wird in der Leber exprimiert. Das Protein ist für die oxidative Metabolisierung verschiedener Arzneistoffe, wie auch für das S-Enantiomer von Warfarin, zuständig [Taube et al., 2000]. Mittlerweile sind 14 SNPs bekannt, die einen Einfluss auf den Warfarin-Metabolismus haben [Yin, Miyata, 2007]. Der Polymorphismus C144R in Exon 3 (CYP2C9*2) beispielsweise führt zu einer erniedrigten Enzymaktivität von 12%, ein zweiter Polymorphismus L359I im Exon 7 (CYP2C9*3) senkt die Enzymaktivität auf 5% des Wildtyps. Die Aktivitätsminderungen führen aufgrund einer verlangsamten Metabolisierung des Warfarins zu einer deutlich niedrigeren benötigten Warfarindosis [D'Andrea et al., 2005].

1.1.11 Warfarinresistenz bei Nagern

Bei schottischen Ratten (*Rattus norvegicus*) und bei Hausmäusen (*Mus musculus*) in Großbritannien konnte bereits im Jahre 1958 bzw. 1961 eine Resistenz gegenüber den Antikoagulantien der ersten Generation beobachtet werden [Boyle, 1960; Dodsworth, 1961]. Zehn bis zwanzig Jahre später traten auch Resistenzen gegen die stärker potenteren Rodentizide der zweiten Generation auf [Desideri et al. 1978; Rowe et al. 1981; Greaves et al.

1982; Pelz 1990; Pelz et al., 2005]. Fälle der Rodentizid-Resistenz gibt es mittlerweile weltweit, und sie stellen ein großes Problem bei der Bekämpfung der Nagetiere dar. Eine Bekämpfung ist notwendig, da neben beträchtlichen Gebäudeschäden sowie Fressen und Verunreinigen von Nahrungs- und Futtermitteln die Nager Überträger von Krankheits- und Tierseuchenerregern sind.

Es konnte relativ bald nach dem ersten Auftreten der Resistenzen durch Züchtungsexperimente nachgewiesen werden, dass die Warfarinresistenz der Ratten auf einen monogenen autosomal-dominanten Erbgang zurückzuführen ist [Greaves, Ayres, 1967]. Eine Kartierung lokalisierte das Gen für die Resistenz auf Chromosom 1 der Ratte (Rw), bzw. auf Chromosom 7 der Maus (War) [Wallace, MacSwiney, 1976]. Als von Rost et al. im Jahr 2004 das VKORC1 als Warfarin-Bindeprotein identifiziert werden konnte, wurden auch weltweite Wildfänge und warfarin-resistente Laborstämme von Nagern gezielt auf Mutationen im VKORC1-Gen untersucht. Bislang konnten die folgenden Mutationen im VKORC1-Gen der Ratte bzw. der Maus identifiziert werden:

Herkunft	Mutation
England/ Cambridge	A26T, Y39N, F63C
Frankreich/ Eure-et-Loire	R35P
Münsterland	S56P
Argentinien/ Buenos Aires	W59R
Japan	E67K
Indonesien, USA/ Santa Cruz, Argentinien/ Buenos Aires	I90L
England/ Hampshire + Berkshire	L120Q
Schottland, England/ Yorkshire	L128Q
Münsterland, Dänemark, England/ Yorkshire	Y139C
Wales	Y139S
Korea, Belgien, Frankreich/ Loire-et-Cher + Eure-et-Loire + Burgund	Y139F
Indonesien	A143V

Tab. 2: Übersicht der gefundenen Mutationen im VKORC1-Gen bei *Rattus norvegicus* (Pelz et al., 2005).

Herkunft	Mutation
Münsterland	R12W, A26S, A48T, R58G, R61L
England/ Yorkshire	A21T, L128S
Zoo Berlin, Verden	E37G
England/ Berkshire	Y139C

Tab. 3: Übersicht der gefundenen Mutationen im VKORC1-Gen bei *Mus musculus* (Pelz et al., 2005).

Es zeigte sich, dass die Positionen 128 und 139 des Gens einen Hotspot für Mutationen in Mäusen und Ratten darstellen [Pelz et al., 2005]. Die Mutationen wurden in einem *in vitro* VKOR-Aktivitätsassay mit menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) untersucht. Besonders auffällig ist dabei das Codon 139, welches Teil des TYA-Motifs und somit der angenommenen Warfarinbindungsstelle ist. Mutationen an dieser Position (Y139C, Y139F, Y139S) bewirken unterschiedlich ausgeprägte Warfarinresistenzen. Die Mutationen R35P, S56P, L128S und L128Q manifestieren sich in einer stark herabgesetzten VKOR-Aktivität. Eine Warfarinresistenz konnte für diese Mutationen in *in vitro* Untersuchungen nicht nachgewiesen werden [Pelz et al., 2005].

1.1.12 Die Stachelmaus (*Acomys*) – ein Nager mit natürlicher Warfarinresistenz?

Neben Ratten und Mäusen sind zudem Populationen von warfarin-resistenten Stachelmäusen bekannt [Mahmoud, Redfern, 1981]. Die Stachelmaus (*Acomys*) gehört zur Ordnung der Nagetiere (Rodentia) und ist eine Gattung in der Familie der Langschwanzmäuse (Muridae). Sie ist somit mit der Hausmaus *Mus musculus* und der Ratte *Rattus norvegicus* verwandt. Die Stellung der Stachelmäuse im System der Nagetiere ist umstritten. Wilson und Reeder ordnen sie in die Unterfamilie der Deomyinae ein [Wilson, Reeder, 2005].



Abb. 11: Die dunkle Nilstachelmaus (*Acomys cahirinus cahirinus*).

Stamm	Chordatiere (Chordata)
Unterstamm	Wirbeltiere (Vertebrata)
Klasse	Säugetiere (Mammalia)
Ordnung	Nagetiere (Rodentia)
Unterordnung	Mäuseverwandte (Myomorpha)
Überfamilie	Mäuseartige (Muroidea)
Familie	Langschwanzmäuse (Muridae)
Unterfamilie	Deomyinae
Gattung	Stachelmäuse (<i>Acomys</i>)

Tab. 4: Die Systematik der Stachelmaus (Wilson, Reeder, 1993).

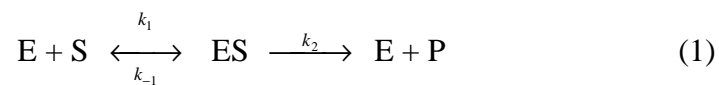
Die 14 verschiedenen Arten der Stachelmäuse sind etwa so groß wie Hausmäuse, und ihre Oberseite zeigt eine gelbliche, braune oder graue Färbung. Auf dem Rücken besitzen sie charakteristische grobe Borstenhaare, die sogenannten Stacheln, deren evolutionsbiologischer Nutzen bisher nicht geklärt ist. Die kleinen Stachelmäuse sind im wesentlichen Unterschied zu Hausmäusen Nestflüchter, die einschließlich der Borstenhaare schon voll behaart sind und mit bereits durchgebrochenen Schneidezähnen und geöffneten Augen zur Welt kommen. Stachelmäuse bewohnen in zahlreichen Arten und Unterarten sandige und felsige Regionen in Klein- und Westasien bis nach Pakistan, Afrika und auf Kreta und Zypern. Die meisten der Arten lassen sich je nach Herkunftsort bedingt kreuzen und die zahlreichen Unterarten bilden Mischformen. Die Stachelmaus *Acomys cahirinus* ist eine hauptsächlich kommensal lebende Spezies, die vorwiegend in landwirtschaftlich genutzten Bereichen entlang des fruchtbaren Nils und am Nildelta vorkommt [Setzer, 1959]. Sie verursacht Schäden in Getreidelagern und zerstört die Gemüse- und Fruchternten in diesen Gegenden. Ihre wirkungsvolle Bekämpfung ist daher von großem Interesse.

Im Gegensatz zu anderen Nagetieren wie *Rattus rattus* und *Rattus norvegicus*, mit denen die Stachelmaus in Dörfern und städtischen Gebieten meist zusammen vorkommt, besitzt sie eine sehr starke natürliche Resistenz gegen die Rodentizide Warfarin, Difenacoum und Brodifacoum [Mahmoud, Redfern, 1981]. Eine Bekämpfung der *Acomys* im natürlichen Lebensraum mit angemessenen Dosen der Rodentizide ist daher nicht wirksam und ineffektiv. Obwohl es auch sensitivere Tiere in der Population gibt, würde eine unvollständige Behandlung nur die Toleranz der Gesamtpopulation erhöhen und die Rodentizide weniger effektiv machen.

1.2 Methodische Voraussetzungen

1.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Um die Funktion von Enzymen wie dem VKORC1 bzw. VKORC1L1 aufzuklären, sind kinetische Untersuchungen unerlässlich. Mit dem Modell von Leonor Michaelis und Maud Menten aus dem Jahre 1913 lassen sich auf einfache Weise die kinetischen Eigenschaften vieler Enzyme erklären [Stryer, 2003]. Von großer Bedeutung ist die Annahme, dass bei der Katalyse ein spezifischer Enzym-Substrat-Komplex (ES) als Zwischenprodukt ausgebildet wird. Die Reaktionsgleichung lautet:



Bei einer charakteristischen Enzymreaktion wird ein Substrat S von einem entsprechenden Enzym E mit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 am aktiven Zentrum gebunden, so dass zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex ES entsteht. Dieser Komplex kann nach einer bestimmten Zeit wieder mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} in E und S zerfallen oder mit der Konstanten k_2 in ein Produkt P bzw. mehrere Produkte P umgesetzt werden, wobei das Enzym E wieder frei wird.

Die Katalysegeschwindigkeit V_0 ergibt sich aus dem Produkt von k_2 und der Konzentration des ES-Komplexes:

$$V_0 = k_2 \times [ES] \quad (2)$$

Da es sich um ein Fließgleichgewicht handelt, sind die Geschwindigkeiten der Bildung und des Zerfalls von ES gleich groß, und die Konzentration des Zwischenprodukts ES bleibt damit konstant. Es ändert sich nur die Konzentration der Edukte und Produkte. Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$k_1 \times [E] \times [S] = (k_{-1} + k_2) \times [ES] \quad (3)$$

Dabei entspricht $k_1 \times [E] \times [S]$ der Bildungsgeschwindigkeit für ES und $(k_{-1} + k_2) \times [ES]$ der Zerfallsgeschwindigkeit für ES.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M lässt sich aus der Gleichung 3 wie folgt ableiten:

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (4)$$

K_M ist ein Maß für die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes. Je kleiner K_M ist, desto größer ist die Konzentration an ES und desto stabiler ist der Enzym-Substrat-Komplex. Weiterhin ist sie ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat, da sie die Substratkonzentration angibt, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. Ein hoher K_M -Wert bedeutet eine geringe Affinität des Enzyms, d.h. erst bei einer relativ hohen Substratkonzentration ist die Halbsättigung erreicht. Ein niedriger Wert zeigt dementsprechend eine hohe Affinität an, d.h. wenig Substrat ist zur Sättigung nötig. Der K_M -Wert eines Enzyms ist abhängig vom jeweiligen Substrat und den Umgebungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke.

Liegt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) vor, kann durch eine weitere Zugabe an Substrat keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. V_{\max} wird erreicht, wenn am Enzym alle Bindungsstellen mit Substrat gesättigt sind. Diese Sättigungskonzentration ist bei den einzelnen Enzymen und den verschiedenen Substraten unterschiedlich. Da sich die Reaktionsgeschwindigkeit asymptotisch mit zunehmender Substratkonzentration V_{\max} nähert, kann die Sättigungskonzentration nur schwer bestimmt werden. Deshalb geht man von $\frac{1}{2} V_{\max}$ aus und ermittelt die dazugehörige Substratkonzentration $[S] \frac{1}{2} V_{\max}$.

V_{\max} ist definiert als:

$$V_{\max} = k_2 \times [E_G] \quad (5)$$

Dabei ist $[E_G]$ die Gesamtkonzentration des Enzyms.

Aus der Maximalgeschwindigkeit lässt sich auch die Wechselzahl k_{kat} eines Enzyms herleiten. Sie ist definiert als die Anzahl von Substratmolekülen, die pro Zeiteinheit von einem aktiven Zentrum in das Produkt umgewandelt werden, wenn das Enzym mit Substrat gesättigt ist. Die Wechselzahl entspricht der kinetischen Konstanten k_2 und liegt für die meisten Enzyme zwischen 1 und 10^4 pro Sekunde. Aus dem Verhältnis von k_{kat}/K_M lässt sich das Maß der Enzymaktivität ablesen.

Die Michaelis-Menten-Gleichung ist definiert als:

$$V_0 = V_{\max} \times \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (6)$$

Aus der Michaelis-Menten-Gleichung lässt sich ablesen, dass bei sehr kleinen Substratkonzentrationen - wenn $[S]$ sehr viel kleiner als K_M ist - $V_0 = [S] (V_{\max}/K_M)$ gilt. Die Geschwindigkeit ist dabei der Substratkonzentration direkt proportional. Bei hohen Substratkonzentrationen - wenn $[S]$ viel größer als K_M - ist $V_0 = V_{\max}$. Die Geschwindigkeit ist dann unabhängig von der Substratkonzentration maximal. Bei $[S] = K_M$ gilt $V_0 = V_{\max} / 2$ (Abb. 12).

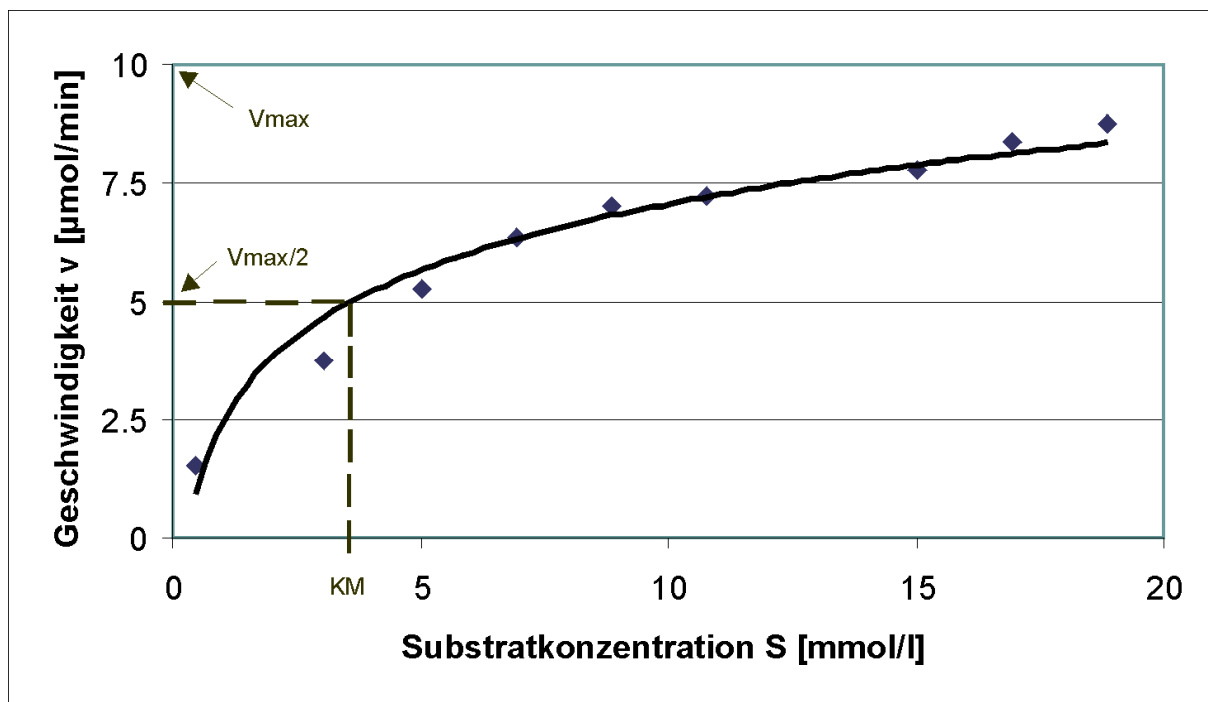


Abb. 12: Das Michaelis-Menten-Diagramm.

V_{\max} ist die Maximalgeschwindigkeit eines Enzyms; sie ist erreicht, wenn alle Enzymmoleküle mit Substrat beladen sind. Sie gibt die Effizienz der Katalyse an. K_M ist die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Sie zeigt die Affinität eines Substrats zum Enzym an.

1.2.2 Die Knockout-Technik zur Generierung einer VKORC1L1-Knockout-Maus

Eine weitere Methode zur Aufklärung der Funktion von noch unerforschten Genen bzw. Proteinen, wie dem VKORC1L1, ist die Knockout-Technik. Zur Analyse der Funktion von Genen im Säugetierorganismus ist seit Ende des 20. Jahrhunderts das gezielte Ausschalten von Genen in der Maus die Methode der Wahl. Durch sogenanntes *Gene Targeting* mittels homologer Rekombination in ES-Zellen ist es möglich, die Funktion von Genen gezielt auszuschalten [Jaenisch, 1988; Cappecchi, 1989; Joyner et al., 1993]. Der entsprechenden Mausmutante, der sogenannten „Knock-out“ Maus, fehlt das spezifische Genprodukt, so dass der resultierende Phänotyp Aufschluss über die ursprüngliche Genfunktion geben kann.

Die Isolierung muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) aus der inneren Zellmasse von Blastozysten und deren Nachweis zur Pluripotenz waren der Grundstein für die Entwicklung des Gene Targeting [Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981]. 1985 konnte dann von Smithies et al. gezeigt werden, dass die Aufnahme von Fremd-DNA durch homologe Rekombination ins Genom von Säugetierfibroblasten möglich ist. Durch Cappecchi wurde die homologe Rekombination von Fremd-DNA in ES-Zellen nachgewiesen [Cappecchi, 1989], und erste Anwendungen dieser Technik fanden sich schon in den folgenden Jahren [Zijlstra et al., 1990; McMahon et al., 1990; Joyner, 1991]. Die mit Fremd-DNA modifizierten ES-Zellen werden in eine Empfängerblastozyste injiziert, die sich nach Implantation in ein scheinchwangeres Empfängertier zusammen mit den genomisch veränderten Zellen zu einem chimären Embryo entwickelt. Die ausgetragene Maus besitzt einen bestimmten Grad an Chimarität, der dem Anteil der injizierten embryonalen Stammzellen entspricht und der anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden kann. Dies ist möglich, weil die Blastozyste mit dem rezessiven Gen für die schwarze Fellfarbe und die verwendeten ES-Zellen mit dem dominanten Agouti-Gen für braune Fellfarbe von unterschiedlichen Mausstämmen abstammen. Je höher der Anteil der braunen Fellfarbe in der chimären Maus ist, desto mehr embryonale Stammzellen sind im Organismus vorhanden. Verpaart man nun das chimäre Tier mit einer schwarzen Wildtyp-Maus, können braune oder schwarze Nachkommen entstehen, wenn die embryonalen Stammzellen auch in die Keimdrüsen eingewandert sind (Keimbahntransmission). Nur die braunen Tiere stammen von den injizierten ES-Zellen ab und sind für das mutierte Allel heterozygot. Aus der Verpaarung der heterozygoten Mäuse gehen zu 25% homozygot mutierte Nachkommen (Knock-out) hervor.

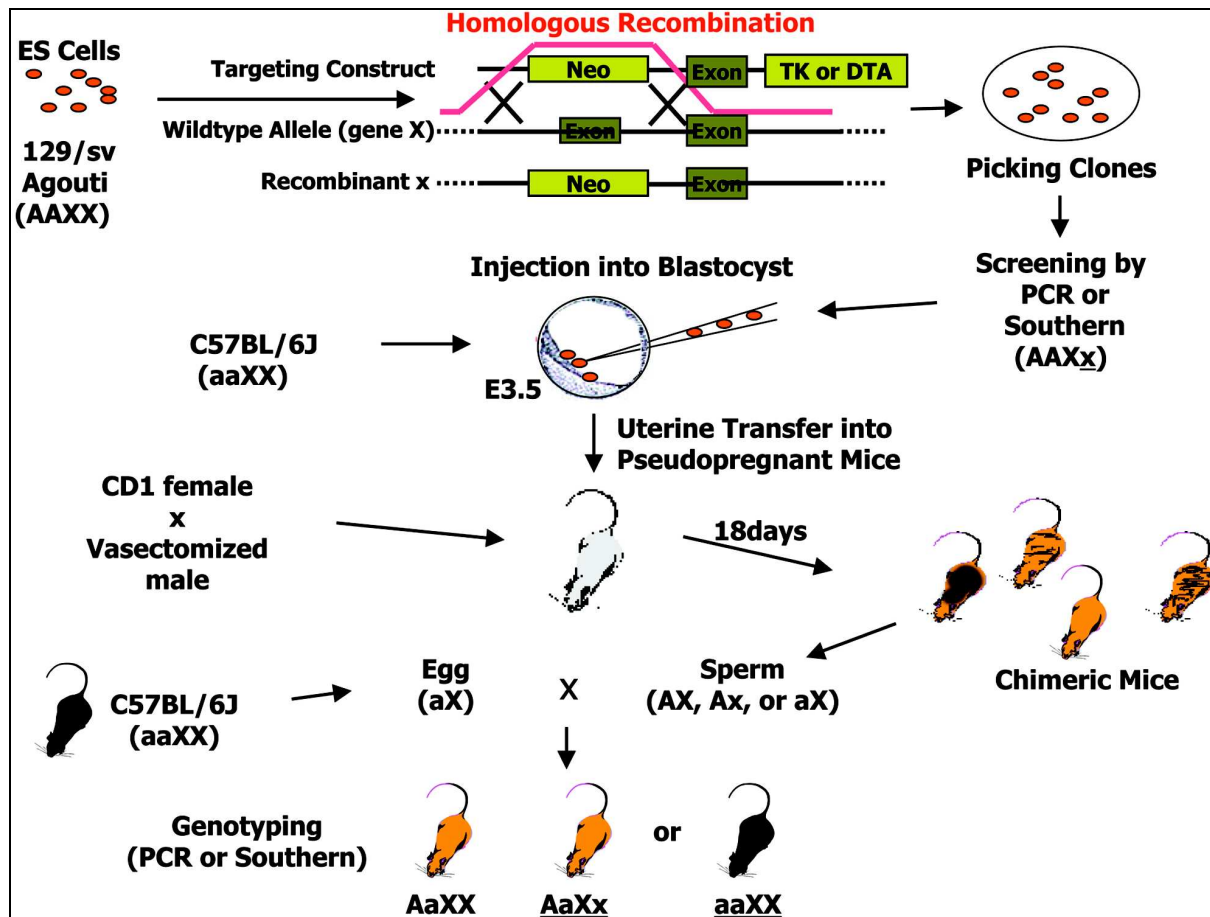


Abb. 13: Die Generierung einer Knockout-Maus (Sung et al., S. 123, 2004).

Embryonale Stammzellen (ES cells), die das dominante Agouti-Gen für braune Fellfarbe (AA) und das Wildtypallel für das zu untersuchende Gen (XX) besitzen, werden mit dem Targetingvektor (Targeting Construct) transfiziert. Nach Selektion mit Geneticin und Gancyclovir werden die Klone gepickt und auf homologe Rekombination mittels PCR oder Southern Blot gescreent. Positiv getestete, rekombinante ES-Klone werden in C57BL/6J-Blaystozysten injiziert und in scheinchwangere Mäuse transferiert. Die ausgetragenen chimären Mäuse werden mit Wildtyp-Mäusen vom Stamm C57BL/6J gekreuzt, um sie auf Keimbahntransmission zu überprüfen. Die Nachkommen sind entweder schwarz (aa) und somit wildtypisch oder von brauner Fellfarbe (Aa). Die braunen Tiere können entweder das rekombinante Allel (Xx) oder das wildtypische Allel (XX) für das „auszuknockende“ Gen besitzen. Der Genotyp wird durch PCR oder Southern Blot überprüft. X=Zielgen, A=Agouti-Gen, Neo=Neomycin-Resistenzgen als positiver Selektionsmarker, TK bzw. DTA=Thymidinkinase-Gen bzw. Diphtheria Toxin A als negativer Selektionsmarker.

Über homologe Rekombination ist es möglich, gezielt Mutationen in das Genom von Mäusen einzuführen oder das Gen zu inaktivieren. Dazu wird die in einen Vektor einklonierte DNA mit Hilfe kurzer Hochspannungsimpulse in die ES-Zellen eingebracht. Durch das Anlegen einer Spannung wird die Permeabilität der Zytoplasmamembran kurzzeitig erhöht und so das Eintreten des Targetingvektors ins Innere der Zellen möglich (Elektroporation). Durch zweifaches Crossing over homologer Regionen wird die fremde DNA gezielt an den vorbestimmten Genort eingebaut (homologe Rekombination), zufällig in das Genom integriert oder gar nicht eingebaut.

Das Vektorkonstrukt besteht aus zwei zur genomischen Zielsequenz homologen DNA-Sequenzen, welche die Rekombination ermöglichen, sowie einem positiven und negativen Selektionsmarker. Als positive Selektionskassette wird häufig das bakterielle Neomycin-Resistenzgen (Neo^R) eingesetzt. Es gewährleistet die Selektion von stabil transfizierten Klonen mit Geneticin (G418). Da es allerdings nicht möglich ist, mit G418 zwischen der unspezifischen Integration des Vektors in eine beliebige Stelle des Genoms und dem seltenen homologen Rekombinationsereignis zu differenzieren, wird ein zusätzlicher negativer Selektionsmarker verwendet. Dazu dient das Thymidinkinase-Gen (*tk*-Gen) aus dem Herpes Simplex Virus. Es befindet sich auf dem Targetingvektor außerhalb der homologen Region, so dass es nach homologer Rekombination nicht erhalten bleibt. Bei zufälliger Rekombination wird es ebenfalls ins Genom eingebaut, die ES-Zellen können in Anwesenheit des Gens und Gancyclovir nicht wachsen. Gancyclovir ist ein Nucleosid-Analogon, das zum Kettenabbruch bei der DNA-Replikation führt. Es wird nur von der Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus phosphoryliert und führt nur bei den Zellen zum Absterben, die das Thymidinkinasegen integriert haben. So werden über die positive und negative Selektion die ES-Zellen mit homologer Rekombination gegenüber den Zellen mit zufällig integrierten Targetingvektor angereichert. Die Rekombinationswahrscheinlichkeit hängt vom DNA-Konstrukt, dem Zielgen, der Länge der homologen Arme sowie der Selektionsmethode ab und beträgt 0,1 bis 10%.

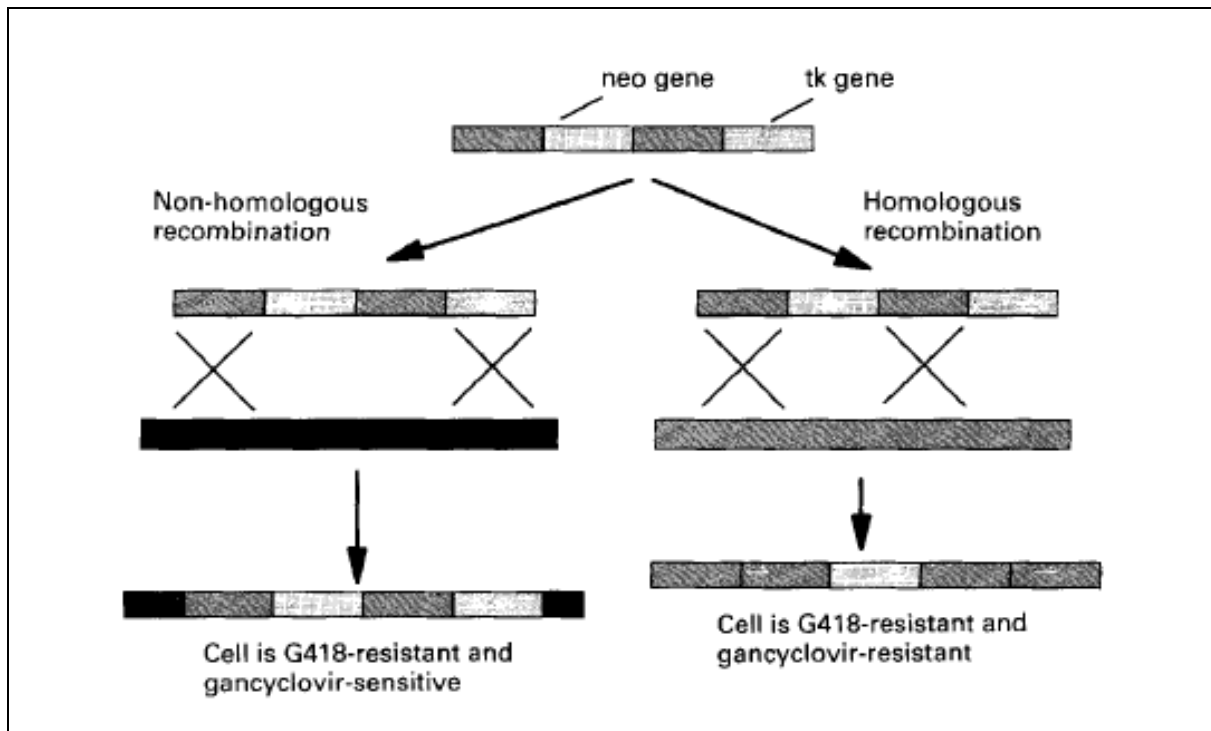


Abb. 14: Die Doppelselektion bei der homologen Rekombination (Docherty, S. 614, 1996).

Der linearisierte Targetingvektor mit der Neomycinresistenzkassette und dem *tk*-Resistenzgen wird in ES-Zellen transfiziert. Nur bei Integration an einer spezifischen Stelle im Genom durch homologe Rekombination kommt es zum Verlust des *tk*-Gens. Dies führt zu einer Resistenz gegenüber Gancyclovir. Bei nicht-homologer Rekombination sind die ES-Zellen sensitiv gegenüber Gancyclovir und sterben ab. Das Neomycingen vermittelt eine Resistenz gegenüber G418.

1.2.3 Konditionale Mutagenese durch das Cre/LoxP-Rekombinasesystem

Ein Nachteil der Knockout-Technik besteht darin, dass das Ausschalten essentieller Gene nicht mit dem Leben vereinbar ist und daher in vielen Fällen die homozygoten KO-Mäuse bereits *in utero* absterben, was eine detaillierte Untersuchung erschwert. Als Ausweg wurde der sogenannte konditionale Knockout entwickelt. Beim konventionellen Knockout ist das Zielgen in allen Zellen der homozygoten Tiere von Anfang an ausgeschaltet, so dass – je nach Funktion des Zielgens - schon die Embryogenese empfindlich gestört sein kann. Beim konditionalen Knockout wird nun die Rekombination, die zur Ausschaltung des Zielgens führt, nicht in den ES-Zellen vorgenommen, sondern unter die Kontrolle eines gewebe-spezifischen und/oder induzierbaren Promotors gestellt. Der Rekombinationsvorgang und damit der Knockout des Zielgens können dadurch räumlich und zeitlich kontrolliert werden.

Zur Generierung einer Knockout-Maus sind ein geeigneter Targetingvektor und ein Rekombinasesystem notwendig. Das Cre/LoxP-System aus der Hefe *S. cerevisiae* ist das heutzutage am häufigsten verwendete Rekombinasesystem [Sauer et al., 1987], es erlaubt das zielgerichtete und gewebespezifische Ausschalten von Genen in der Maus. Bei der Cre

Rekombinase (cyclization recombination) handelt es sich um ein Enzym von 38kDa aus dem P1 Bacteriophagen, das die Rekombination zwischen 34 bp langen loxP-Erkennungssequenzen (locus of crossing over of P1) katalysiert [Guo et al., 1997]. Bei der cre-vermittelten Rekombination kommt es in Abhängigkeit von Ort und Orientierung der loxP-Sequenzen zur Deletion oder zur Inversion des dazwischen liegenden DNA-Abschnitts [Austin et al., 1981]. Im Vektorkonstrukt sind Teile des zu untersuchenden Gens „gefloxt“, so dass eine spätere Deletion die Inaktivierung des Gens verursacht. Eine dritte loxP-Seite flankiert die Neo^R-Kassette.

Die „geflochten“ und homozygoten Tiere werden mit Mäusen verpaart, welche die Cre Rekombinase transgen exprimieren [Gu et al., 1994]. Bei Nachkommen dieser Kreuzung wird das zu untersuchende Gen in Abhängigkeit von zell- oder gewebespezifischer Expression der Cre Rekombinase durch Verwendung geeigneter Promotoren inaktiviert. Es handelt sich dabei um die sogenannte konditionale Mutagenese. Auch ist es möglich, durch Verpaarung mit einer sogenannten Cre-deleter Maus, die Cre in allen Zellen exprimiert, Nullmutanten zu erzeugen [Dupé et al., 1997; Schwenk et al., 1995]. Einen Nachteil stellt hierbei die häufige Letalität des Nullallels dar, wenn das zu untersuchende Gen vor allem in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung essentiell ist.

1.3 VKORC1L1 - das paraloge Gen mit unbekannter Funktion

Das VKORC1L1-Gen (VKORC1L1 = Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1) war Forschungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Mittels Vergleich von Sequenzhomologien im Zusammenhang mit dem paralogen VKORC1-Gen im Jahre 2004 wurde das VKORC1L1-Gen entdeckt [Rost et al., 2004]. Dies gab den Anlass, sich mit der Funktion dieses unbekanntes Gens auseinanderzusetzen. Besonders auffällig ist die hohe Homologie von VKORC1L1-Proteinen in zahlreichen Spezies. Es ist anzunehmen, dass ein solch hoch konserviertes Protein eine bedeutende und essentielle Rolle in der Entwicklung und in der Aufrechterhaltung des Organismus einnimmt. Dies macht es als Forschungsgegenstand sehr attraktiv. So weist das VKORC1L1 im Menschen, der Maus und der Ratte eine Identität von 97% auf [Rost et al., 2004]. Es ist somit konservierter als die VKORC1-Proteine unter den Vertebraten, welche eine Homologie von 79 bis 84% besitzen. Das menschliche VKORC1L1-Gen befindet sich auf Chromosom 7, bei der Maus liegt es auf Chromosom 5. Es setzt sich aus 3 Exons zusammen und umfasst 531 bp als codierende Sequenz. Das Protein besitzt eine molekulare Masse von etwa 19,8 kDa. Die Proteinstruktur konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Das CXXC-Motiv ist auch im VKORC1L1-Protein hoch konserviert. Dies ließ vermuten, dass dieses Protein ebenfalls eine wichtige Funktion im Vitamin K-Recycling einnimmt. Yin et al. untersuchten, ob ein Zusammenhang von den acht betrachteten SNPs und Haplotypen für VKORC1L1 mit der Variabilität der täglich benötigten Warfarindosis in der japanischen Bevölkerung besteht. Eine Assoziation konnte aber nicht nachgewiesen werden [Yin et al., 2008]. Über die Funktion des VKORC1L1-Proteins war zum Zeitpunkt der Entdeckung des Gens nichts bekannt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden verschiedene Untersuchungen zur Erforschung der Proteinfunktion durchgeführt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung und Charakterisierung des paralogen VKORC1L1-Gens, welches im Zusammenhang mit dem VKORC1-Protein im Jahre 2004 entdeckt wurde und dessen Funktion noch völlig unbekannt ist. Es weist eine hohe Konservierung durch zahlreiche Spezies auf.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen, um einen spezifischen Phänotyp bei Inaktivierung des VKORC1L1-Gens zu erhalten. Dies bietet die Möglichkeit Rückschlüsse auf die Funktion des zu untersuchenden Proteins zu ziehen. Dazu wurde zunächst ein Vektorkonstrukt kloniert, welches anschließend in embryonale Stammzellen transfiziert wurde. Nach Screenen der erhaltenen Klone durch Southern Blots und PCR konnten die positiv getesteten Klone in Blastozysten injiziert werden. Die daraus resultierenden chimären Tiere wurden mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt, um homozygote Tiere zu erhalten. Die verwendeten embryonalen Stammzellklone wurden darüberhinaus mittels SKY-Analyse auf ihren Karyotyp überprüft.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung und biochemischen Beschreibung des Proteins. Dazu wurden zur Expressionsanalyse Northern Blots durchgeführt. Enzymkinetische Messungen zur Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) des VKORC1L1 für verschiedene Spezies sollten Aufschlüsse über die kinetischen und katalytischen Eigenschaften des Proteins geben. Mittels positionsabhängiger *in vitro* Mutagenesen, rekombinanter Expression in HEK293-Zellen und anschließenden Warfarinhemmstudien erfolgte die Untersuchung der Funktion von Aminosäureresten, die für das VKORC1L1 eine entscheidende Rolle spielen könnten. Für die Auswahl der zu mutierenden Positionen wurden funktional wichtige Aminosäurepositionen im paralogen VKORC1-Protein herangezogen. Des Weiteren wurde eine Warfarinhemmstudie zum jeweiligen Wildtyp-VKORC1L1-Protein der Spezies Maus, Ratte und der Stachelmaus durchgeführt. Phylogenetische Analysen wie Sequenzalignments und ein rekonstruierter evolutiver Stammbaum sollten Informationen über wichtige strukturelle und funktionelle Positionen im VKORC1L1 geben und klären, auf welche Weise und zu welchem Zeitpunkt der Evolution das VKORC1- und das VKORC1L1-Protein entstanden sind. Daran schließen sich Homologievergleiche zwischen den Chromosomen der Spezies an, um die evolutive Entstehung der beiden zugehörigen Gene zu analysieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
Agar	Invitrogen
Agarose	Biozym
QiaexII Agarose Gel Extraction Kit	Qiaex
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Roth
Ampuva ddH ₂ O	Fresenius
aqua ad injectabilia	Delta-Pharma GmbH
Assistent-Histokitt	Assistent
Bacto-Tryptone (=Pepton)	Invitrogen
Bacto-Yeast-Extract	Invitrogen
Betain	Fluka
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Merck
Colcemid	Gibco
100 bp DNA Ladder	Invitrogen
1 kb DNA-Ladder	New England Biolabs
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad
Dextransulfat	Sigma
Diethylether	Roth
DMEM (hohe Glucose mit Natriumpyruvat)	Gibco/BRL
DMEM (hohe Glucose mit Natriumpyruvat; mit Glutamax)	Gibco/BRL
DMSO	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Appllichem
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco, PAA
Fixogum	Marabu
Formamid	Sigma
Gancyclovir	Sigma
Gelatine 2% Solution	Sigma
Geneticin (G418) (50 mg/ml)	Gibco/ BRL
Giemsa Stain Solution	PAA
Glucose	Merck
Glycerol	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck

Ladderman Labelling Kit	Takara
L-Glutamin 100x	Gibco/BRL
Ligase-Puffer	Invitrogen
Magermilchpulver	Biorad
Magnesiumchlorid	Invitrogen
Magnesiumsulfat	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
MEM	PAA
Methanol	Merck
Microspin S 200 HR Columns	Amersham Biosciences
MiracleHyb hybridization solution	Stratagene
MiracleHyb probe preparation buffer	Stratagene
Mitomycin C	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumcitrat	Applichem
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumpyruvat 100x	Gibco/BRL
Natriumsulfat	Merck
Nicht-essentielle Aminosäuren 100x	Gibco/BRL
Nonident P 40	Fluka
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
Nukleotide	Invitrogen
10x PCR-Enhancer	Invitrogen
10x PBS	Gibco
PCR Product Pre-Sequencing Kit (Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase)	USB
PCR-Master-Mix	Promega
Plasmid-DNA Purification-Kit	Macherey-Nagel
Proteinkinase K	Merck
Quick Start Sequencing Kit	Beckman Coulter
Red Taq Polymerase mit 10x Puffer	Segetic
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Saccharose	Fluka
Salzsäure	Merck
SKY-Sonde	Spectral Imaging
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	USB, Applichem
Spermidin	Roth
Taq-Polymerase	Invitrogen bzw. TaKaRa
T4-Ligase	Invitrogen
TA Cloning Kit	Invitrogen
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	USB bzw. Applichem
TritonX100	Applichem
Trypsin	Gibco/BRL
Tween 20	Sigma
Vitamin K ₂ -Chinon	Sigma
Wasserstoffperoxid	

2.1.2 Arbeitsgeräte und sonstige Materialien

Die Arbeitsgeräte und sonstigen Materialien stammen von folgenden Firmen:

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
Autoklav (Bioklav)	Schütt
Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus
Einfriercryoröhrchen	Nunc
DNA-Tubes	Nunc
Einfrierbox Cryo-1°C/ min	Merck
Eismaschine (AF-10)	Scotsman
Elektrophoresekammern für horizontale	
Agarosegele (Horizon 14), (PS9009)	Gibco BRL
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiophot
Gene Pulser	Bio-Rad
Gewebe-Kulturschalen (100/20 mm)	Cellstar Greiner bio-one
Glasgefäße	Schott
Hybridisierungsöfen	Hybaid, Techne
Hybridisierungsröhrchen	Techne
Magnetrührer	Ika
Mikropipetten	Eppendorf, Gilson
Mikrotiterplatten	Nunc
Minimagnetrührer	Variomag
Neubauerzählkammer	Superior
Netzgeräte	Gibco BRL
Nitrilhandschuhe	Roth
Nylontransfermembran (positiv geladen)	Amersham Biosciences
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Petrischalen 15 cm	TPP
Petrischalen 6 und 10 cm	Greiner/Cellstar bzw. Falcon
pH-Meter (pH 537)	WTW
Phosphoimager-Entwicklermaschine	Fujix BAS 1000
Photopapier (K65HM)	Mitsubishi
1x Pipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Costar
Pulse Controller	Bio-Rad
Quarz-Küvetten (101 R-QS 10 mm, 90° verspiegelt)	Hellma
Radioaktivitätscounter	Berthold
Rotationsverdampfer	Roth
Scheidetrichter	Roth
Sequenziergerät CEQ 8000 und CEQ 8800	Beckman Coulter
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech
Sterilbank	Scholzen
Sterilbank für die Zellkultur	Kendro
Thermocycler	Biomed
T3-Thermocycler	Biometra
Tierfutter	Ssniff
Tierhaltungskäfige, Typ II long, 514 cm ²	Technik Plast
UV-Transilluminator	Bachhofer
Video-Kamera	Herolab
Video-Printer	Mitsubishi

Vortex	Ika
Waage (Modell Delta Range PE 3600)	Mettler
Waage	Sartorius
Wasserbad	Lauda
Whatmanpapier (Gelblottingpapier)	Schleicher und Schuell
Well-Platten (96, 48, 24) flat bottom	Costar
6-Well-Platten	Falcon
X-ray Röntgenfilme	X-Ray Retina
Zentrifuge (Mikro 20)	Hartenstein
Zentrifugenröhrchen	Falcon

2.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Primer3-Programmes im Internet entworfen (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) und von der Firma MWG und Metabion synthetisiert (Tab. 5 - 13).

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.- Temp.
Fr 1- <i>NotI</i> -F	ATAAGAATGCGGCCGCTGTTGGTTATGGCGGACTT	58°C
Fr 1- <i>SacII</i> -R	TCCCCGCGGAGGACTTGTGAGGCTCTGGA	58°C
Fr 2- <i>AscI</i> -F	CGGCGCGCCTACCACAGAGAACTACCTAG	58°C
Fr 2- <i>FseI</i> -R	ATAATAGGCCGCCCCAGTAGAGAAATAGACATGCT	58°C
Fr 3-II- <i>XhoI</i> -F	CCGCTCGAGACCTGTCCTTCCTTGAATTATCTCC	58°C
Fr 3-II- <i>PacI</i> -R	CCTTAATTAAGCAGCAGAAGTCTTAGCGAGTAG	58°C
Fr 1-nested-F	GTGTGCAGAAAGGCAACTGA	59°C
Fr 1-nested-R	TGAGGCCATAATGACAACCA	59°C
Fr 3-nested-F	GTGTCTGGGCATTTTCAGGTT	58°C
Fr 3-nested-R	GGAGGGAACCCTCTCACATT	58°C

Tab. 5: Primer zur Einführung der Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt für den Targeting-Vektor.

Abkürzungen: Ann.-Temp.: Annealingtemperatur Fr: Fragment, F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.- Temp.
Fr 1-F1a	CGCGCAATTAACCCTCACTA	58°C
Fr 1-R1	ACGGTGGATGGAAAGAAGCTG	58°C
Fr 1-F2	ATAAGGCAGGGGCTCAATG	58°C
Fr 1-R2	TTTCAGGAAAATAACACCCAAG	58°C
Fr 1-F3	AAGTGCATTTAACTTTGAGGGC	58°C
Fr 1-R3	CTCACAGATGGAGCATGCAG	58°C
Fr 1-F4	TGATCATATCCTCCTCCTAGCTC	58°C
Fr 1-R4	ACCAGACATTTATATGATTCACAGTC	58°C
Fr 1-F5	CAACTGCCTCTGCTTCCTG	58°C
Fr 2-F1a	AATCCATCAGAAGCTGACTCT	58°C
Fr 2-R1	AGACACAAGCACTGAATGGG	58°C
Fr 2-F2	GGGTTACTGGTTTTCTTATTTTAC	58°C
Fr 2-R2a	TTTAAACGGGACCCTGTACATT	58°C
Fr 3-III-F1a	ATGATGTCCAGAAACCCAGC	58°C
Fr 3-R1	TCCACACCTTCTATCTCTGC	58°C
Fr 3-F2	CAGCTCTTCTGTACAGTCATTGG	58°C
Fr 3-R2	TCAGCAAAGGTAAGTGGGTC	58°C
Fr 3-F3	TCAGGGAGCAGTCATCTTCC	58°C
Fr 3-R3	GGGAAAATTGTGGACTTTTATAATG	58°C
Fr 3-F4	AAATGCTGTGTTCCCTGTCC	58°C
Fr 3-R4	TCTGAATAATTAGTGATGACACCTTG	58°C
Fr 3-F5	AACATTTATCATTCTTAGCCTTGC	58°C
Fr 3-R5	GAGAGAGAGAACACGCTGACAC	58°C
Fr 3-F6	CCAGTCTGAGCTTCTGCCTC	58°C
Fr 3-R6	TCTCAACTGACAAGTGACAGGC	58°C
Fr 3-F7	TGCACACTTCTTGTGCAG	58°C
Fr 3-R7	GAAATAGCTAGGGCCCCTTC	58°C
Fr 3-F8	ATCTCCACCCAACCGTCTC	58°C
Fr 3-R8	CCCAAGATGTTCTGTTTGCC	58°C
Fr 3-F9	TTAGAGTCCATTTGTGTGATATTTG	58°C

Fr 3-R9	TCAGCAAACAGTTTCTCCCG	58°C
Fr 3-F10	GCAGTATTATGACTGAAGCAGGC	58°C
Fr 3-R10	AGGCCAGAAATCCTATGGTG	58°C
Fr 3-F11	GCCATTTTATTCCTTGGGTG	58°C
Fr 3-II-R11a	CCCTGTTATCCCTAGCGTA	58°C

Tab. 6: Sequenzierungsprimer für die 3 Fragmente des Targeting-Vektors.

Abkürzungen: Ann.-Temp.: Annealingtemperatur Fr: Fragment, F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer, a: diese Primer binden in der multiple cloning site des Vektors außerhalb der Fragmente.

Primer- Bezeichnung	PCR-Zusatz
Fr 3-nested-F und Fr 3-nested-R	2,5 µl Betain (5M)
Fr 3-II- <i>Xho</i> I-F und Fr 3-II- <i>Pac</i> I-R	2,5 µl Betain (5M)
Screen-NEU-Fr1-F1 und hR-Vektor-R3	0,5 µl Betain (5M)

Tab. 7: Zusätze für die PCR.

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.-Temp.
mVKORC1L1_ <i>Not</i> I_F	ATAAGAATGCGGCCGCGAAGATGGCGGCGCCCGTCCT	58°C
mVKORC1L1_ <i>Xho</i> I_R	CCGCTCGAGTTGGGTGGAGATCCGCTGGCCAT	58°C

Tab. 8: Primer mit Restriktionsschnittstellen für die Northern Blot Sonde.

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.-Temp.
Neo-Sonde-F	TGAATGAACTGCAGGACGAGGCA	60°C
Neo-Sonde-R	GCCGCCAAGCTCTTCAGCAATAT	60°C
<i>Bam</i> HI-Sonde1-F	CAAGAACAGTCGGGGTTCAT	60°C
<i>Bam</i> HI-Sonde1-R	GCAGCGGTAAGATGTCCATT	60°C

Tab. 9: Primer für die Sonden für den Southern Blot.

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.- Temp.
M13-65°C-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	60°C
M13-65°C-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	60°C
pCep4-F	AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG	58°C
pCep4-R	TGTGGTTTGTCCAAACTCATC	58°C

Tab. 10: Primer für den TA/ TOPO Cloning Kit und den pCep4-Vektor.

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.- Temp.
Screen-NEU-Fr1-F1	CTCCATGGAAACAGTTGCATA	58/59°C
Screen-NEU-Fr1-F4	TCCAGAGCCGCTCACAAGTCCT	58°C
Screen-hR-F2	CCAGTCTTGCTTGTGAGCTT	58°C
Screen-hR-R2	ATTAACCTCATGCGTGGAAA	58°C
hR-Vektor-R3	CTCCTGACTAGGGGAGGAG	59°C
hR-genom-3'-R	CAGCCAAACCCTGCTTCTTC	58°C
Screen-hR-Vektor-F2	GCCTCGACATAACTTCGTATA	58°C

Tab. 11: Primer für das Screenen der ES-Klone auf homologe Rekombination und loxP-sites.

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.- Temp.
Y146C-F	TCATCTGCATCGTCACGTGCGTGCTGAACTTC	58°C
Y146C-R	AGTTCAGCACGCACGTGACGATGCAGATGATG	58°C
Y146F-F	TCATCTGCATCGTCACGTTTCGTGCTGAACTTC	58°C
Y146F-R	AGTTCAGCACGAACGTGACGATGCAGATGATG	58°C
R65G-F	CGCCCTTGCCTCCGGATGGGGTCGAGGATTTG	58°C
R65G-R	AAATCCTCGACCCCATCCGGAGGCAAGGGCGG	58°C
V36L-F	ATCTACGCCTACCACCTGGAGCGGGAGAAGGAG	58°C
V36L-R	CTCCTTCTCCCGCTCCAGGTGGTAGGCGTAGAT	58°C
L135R-neu-F	ATTCTGTACTTTGTGCGGAAGGAGTTCTGCATC	58°C
L135R-neu-R	TGCAGAACTCCTTCCGCACAAAGTACAGAATG	58°C

Tab. 12: Primer für die VKORC1L1-Mutagenese im pCep4-Vektor.

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Ann.- Temp.
mL1- <i>Hind</i> III-F	ACATAAGCTTAAGATGGCGGCGCCCGTCCT	58°C
mL1- <i>Xho</i> I-R	AGAACTCGAGGAGACGGTTGGGTGGAGAT	58°C
rVKORC1L1- <i>Nhe</i> -F	TGAGCTAGCAAGATGGCGGCGCCCGTCCTG	58°C
rVKORC1L1- <i>Xho</i> I-R	AAGACTCGAGGGAGACAGTTGGGTGGAGAG	58°C
aVKORC1- <i>Kpn</i> I-F	CGGGGTACCATAATGGGCACCACCTGGAGGAG	58°C
aVKORC1- <i>Not</i> I-R	TATTCTTACGCCGGCGTCAGTGCTTTTTGGCCTTGT	58°C

Tab. 13: Primer für die Klonierung von VKORC1L1 der Spezies in pCep4.

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

2 x BBS-Lösung: 50 mM BES (0,533 g)
 280 mM NaCl (0,818 g)
 1,5 mM Na₂HPO₄ (0,0106 g)
 ad 50 ml ddH₂O
 pH mit NaOH auf 6,95 einstellen
 steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

Churchpuffer: 175 ml 20% SDS (1% = 1 g auf 100 ml)
 250 ml 1 M Na₂HPO₄ od. NaH₂PO₄ · H₂O
 0,186 g EDTA
 auf 500 ml mit aqua dest auffüllen
 1 M Na₂HPO₄ mit Phosphorsäure
 1 M NaH₂PO₄ · H₂O mit NaOH-Plätzchen
 auf pH 7,2 titrieren

Denaturierungslösung: 438,2 g NaCl (Endkonz. 1,5 M)
 100 g NaOH (Endkonz. 0,5 M)
 Ad 5 l aqua dest

Depurinisierungslösung: 120 ml 32% HCl (Endkonz. 0,25 M)
Ad 5 l aqua dest

Formamid-Ansatz für SKY: 70 ml Formamid
20 ml H₂O
10 ml 20x SSC
pH 7,0 (HCl)

Hybridisierungspuffer: 2,25 ml 20x SSPE
0,75 ml 20% SDS
0,75 ml 10% Magermilchlösung
Ad 10 ml aqua dest
5 ml Dextransulfat (20%)

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton (=Pepton)
5 g Bacto-Yeast-Extrakt
10 g NaCl
ad 1 l ddH₂O, mit NaOH auf pH 7 einstellen

LB-Platten: 500 ml LB-Medium
7,5 g Agar
autoklavieren und abkühlen lassen
100 mg/ml Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml)

dNTP-Mix: 12,5 µl dATP (100 mM)
12,5 µl dCTP (100 mM)
12,5 µl dGTP (100 mM)
12,5 µl dTTP (100 mM)
950 µl ddH₂O

10x PCR-Puffer: 2,42 g Tris/HCl (pH 8,4)
3,72 g KCl
ad 100 ml ddH₂O

<u>1x PCR-Puffer:</u>	100 µl	10x PCR-Puffer
	160 µl	dNTP-Mix
	30 µl	MgCl ₂ (50 mM)
	610 µl	ddH ₂ O
<u>10x Pfu-Puffer:</u>	0,746 g	KCl (Endkonz. 10 0mM)
	1,32 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Endkonz. 100 mM)
	0,493 g	MgSO ₄ (Endkonz. 20 mM)
	20 ml	1M Tris-HCl pH 8,8 (Endkonz. 200 mM)
	1 ml	TritonX 100 (Endkonz. 1%)
	100 mg	BSA (Endkonz. 1 mg/ml)
	ad 100 ml aqua dest.	
<u>1x Pfu-Puffer:</u>	100 µl	10x Pfu-Puffer
	160 µl	Nukleotid-Stammlösung
	640 µl	ddH ₂ O
<u>Phosphatpuffer für</u>	18 g	KH ₂ PO ₄
<u>Giemsafärbung:</u>	20,7 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	Ad 10 l H ₂ O, pH 6,88	
<u>PN-Puffer:</u>		
Lösung A:	71,2 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	Ad 4000 ml	H ₂ O
Lösung B:	6,90 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	Ad 500 ml H ₂ O	

Lösung A mit Lösung B bis pH 8,0 titrieren

Anschließend werden 0,1% Nonident P 40 zugeben. D.h., wenn das Endvolumen des pH eingestellten Puffers 8,480 ml beträgt, werden 8,4 ml Nonident P 40 zugegeben und homogenisiert.

PNM-Puffer (Phosphat-Nonidet P40- Magermilch):

5%	Magermilchpulver
0,02%	Natriumazid

Mit PN-Puffer auf 100 ml auffüllen, auf 37°C über Nacht erwärmen, für einige Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen; feste Bestandteile abzentrifugieren (3000x g, 10 min), Überstand sterilfiltrieren (0,45 µm-Filter), portionieren und bei -20°C lagern

Puffer B:

5 ml	250 mM Imidazol (Endkonz. 25 mM) (pH 7,6)
12,5 ml	2% CHAPS (Endkonz. 0,5%)
ad 50 ml ddH ₂ O	

20%iges SDS:

200 g	electrophoresisgrade SDS
900 ml	ddH ₂ O
auf 68°C erhitzen und mit konzentrierter HCl auf pH 7,2 einstellen, ad 1 l ddH ₂ O	

SE-Puffer:

4,39 g	NaCl (Endkonz. 75 mM)
8,41 g	Na ₂ EDTA (Endkonz. 25 mM)
ad 1 l ddH ₂ O, pH auf 8,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren	

20x SSC:

179,3 g	NaCl
88,2 g	Na-Citrat
ad 1 l ddH ₂ O, pH auf 7,0 mit NaOH einstellen	

2x SSC, 0,1% SDS:

1 g	SDS
100 ml	20x SSC
ad 1 l ddH ₂ O	

20x SSPE:

175,3 g	NaCl ₂
27,6 g	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
7,4 g	EDTA
Ad 1 l ddH ₂ O, pH auf 7,4 mit NaOH einstellen	

<u>SOC-Medium:</u>	20 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	ad 1 l ddH ₂ O	
	10 ml	40%ige Glucose
<u>10x Stopp-Puffer:</u>	50%	Saccharose
	0,1%	Bromphenolblau
	0,1 M	Na ₂ EDTA
<u>Stripplösung:</u>	20 ml	20% SDS (Endkonz. 0,1%)
	2 ml	20x SSC (Endkonz. 0,1x SSC)
	378 ml	ddH ₂ O
<u>50x TAE-Puffer:</u>	42 g	Tris/HCl (pH 8,3)
	55,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0,5 M Na ₂ EDTA
	ad 1 l ddH ₂ O	
<u>Tail-Lysis-Puffer:</u>	50 ml	1 M Tris pH 8,5 (Endkonz. 100 mM)
	10 ml	250 mM EDTA (Endkonz. 5 mM)
	10 ml	10% SDS (Endkonz. 0,2%)
	20 ml	5 M NaCl (Endkonz. 200 mM)
	410 ml	ddH ₂ O
<u>TE-Puffer:</u>	1,21 g	Tris (Endkonz. 10 mM)
	0,37 g	Na ₂ EDTA (Endkonz. 1 mM)
	ad 1 l ddH ₂ O, pH auf 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren	
<u>1 M Tris-HCl:</u>	121,1 g	Tris
	ad 1 l ddH ₂ O, pH auf 8,5 mit konz. HCl einstellen	

<u>1x Einfriermedium:</u>	9 ml	FCS
	1 ml	DMSO
	0,5 ml Aliquots	
<u>DNA-Lysispuffer:</u>	2 ml	5 M NaCl (Endkonz.10 mM)
	10 ml	1 M TrisHCl pH 7,5 (Endkonz.10 mM)
	20 ml	0,5 M EDTA (Endkonz.10 mM)
	5 g	0,5% Sarcosyl
<u>PBS-Lösung:</u>	137 mM	NaCl (8 g)
(Phosphate-Buffered	2,7 mM	KCl (0,2 g)
Saline)	10 mM	Na ₂ HPO ₄ (1,44 g)
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄ (0,24 g)
	in 800 ml ddH ₂ O lösen	
	pH mit HCl auf 7,4 einstellen	
	ad 1 l ddH ₂ O und für 20 min autoklavieren	
	Lagerung bei 4°C	
<u>Zellmedium für HEK:</u>	500 ml	MEM
	60 ml	FKS
	2,75 ml	G418
	5 ml	non-essential AS

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Gewinnung von isogener DNA aus einer C57BL/6-Maus, die als Grundlage der Klonierung dienen soll, wird zunächst 1 g Gewebe (Herz, Lunge, Oberschenkel) mit dem Skalpell entfernt, klein geschnitten und in ein 50 ml Falcongefäß überführt. 4 ml SE-Puffer und 150 µl Proteinase K werden nacheinander dazugegeben. Nach jeder Zugabe wird das Gemisch gut gemischt. Nach Zusetzen von 1 ml 20%igem SDS wird durch Invertieren die Lösung vermischt und bei 37°C auf dem Schüttler 2 Nächte inkubiert. Nach einigen Stunden wird nochmals Proteinase K hinzugefügt. Alternativ kann die Inkubation auch bei 55°C über Nacht erfolgen. Für die anschließende Phenol/Chloroformextraktion sollten sich alle Gewebestücke vollständig aufgelöst haben. Als erstes wird die Gewebesuspension mit 4 ml Phenol versetzt und durch vortexen und schütteln gut vermischt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 2000 U/min wird die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Falcongefäß überführt. Die weißliche Interphase mit den Proteinbestandteilen wird großzügig verworfen. Die Phenolextraktion wird wiederholt. Danach erfolgt der Vorgang mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch (1:1) und mit Chloroform. Ist die wässrige Phase noch sehr verfärbt, wird die Extraktion mit Chloroform ein zweites Mal durchgeführt. Die farblose wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und ihr werden 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 5,2) zugesetzt. Nach mehrmaligem Invertieren wird der DNA-Faden sichtbar. Das gebildete DNA-Knäuel wird mit einem Glashäkchen herausgefischt, kurz in 70%iges Ethanol getaucht und anschließend trocken gelassen. Die DNA wird in 1 ml 1x TE-Puffer überführt und auf dem Schüttler über Nacht gelöst.

2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers lässt sich die Konzentration isolierter DNA aus Geweben, Blut und Hefekulturen sowie von Oligonukleotiden ermitteln. Die Messung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, da einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen. Für die Messung wird die DNA im Verhältnis 1:100 mit H₂O verdünnt und in eine gereinigte Quarzküvette überführt. Die Absorption wird gegen H₂O als Referenzwert bestimmt. Da eine Absorption $A_{260\text{nm}}$ von 1,0 einer Konzentration an doppelsträngiger (ds)DNA von 50 µg/ml entspricht, kann die DNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{dsDNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

Durch eine weitere Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, kann die Reinheit der DNA-Präparation bestimmt werden. Der ermittelte Quotient $A_{260\text{nm}}$ zu $A_{280\text{nm}}$ sollte in etwa bei 1,85 liegen. Deutlich niedrigere Werte als 1,85 weisen auf eine Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen hin.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR (polymerase chain reaction) ermöglicht eine gezielte *in vitro* Amplifikation von spezifischen genau definierten DNA-Abschnitten [Mullis et al. 1987]. Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von etwa 30 Zyklen, jeder Zyklus untergliedert sich in die 3 folgenden Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierung wird durch Erhitzen auf 95°C die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, so dass Einzelstränge, die als DNA-Matrize für die darauf folgenden Reaktionen dienen, gebildet werden. In dem als Annealing bezeichneten Vorgang hybridisieren zwei Oligonukleotidprimer, die zu den Enden von Strang und Gegenstrang komplementär sind, mit einem der beiden Stränge des Templates. Die Primer legen damit Anfang und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts fest. Die Annealingtemperatur ist primerspezifisch und liegt meist zwischen 50 und 60°C. Eine hitzestabile DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien (in dieser Arbeit wird die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* und die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt) verlängert die Primer entlang der einzelsträngigen Matrize und synthetisiert mit Hilfe von vier Desoxynucleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ausgehend von den 3'-OH-Gruppen der Primer, den jeweiligen komplementären Strang in 5' → 3' Richtung. Diese Elongation erfolgt bei einer für die Polymerase spezifischen Temperatur (72°C bei der Pfu- und der Taq-Polymerase). Die beiden entstandenen DNA-Stränge bilden die Vorlage für den nächsten Durchlauf, die Menge an DNA verdoppelt sich somit mit jedem neuen Zyklus: nach n Zyklen erhält man ein theoretisches Maximum von 2^n doppelsträngigen Kopien der Zielsequenz.

Die Effizienz der PCR ist unter anderem abhängig vom eingesetzten Template, von der Stabilität der Polymerase und der Primer, der MgCl_2 -Konzentration des Puffers sowie der Annealing-Temperatur.

PCR-Reaktionsansatz für die Einführung der Restriktionsschnittstellen:

50 µl 1x Pfu-Puffer
 1,2 µl F-Primer mit Restriktionsschnittstelle (10 pmol/µl)
 1,2 µl R-Primer mit Restriktionsschnittstelle (10 pmol/µl)
 1 µl C57BL/6- Maus-DNA
 1 µl Pfu-Polymerase

first delay	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	33 Zyklen
Annealing	primerspezifisch	1 min	
Elongation	72°C	5 min (Fr 1) 2 min (Fr 2) 11 min (Fr 3)	
last delay	72°C	3 min	

Tab. 14: PCR-Reaktionsbedingungen für die Einführung der Restriktionsschnittstellen.

Bei dieser PCR entstehen unterschiedlich lange DNA-Abschnitte, die für die Klonierung in den pEasyflox-Vektor benötigt werden. Die Länge von Fragment 1 beträgt 2195 bp, von Fragment 2 840 bp und von Fragment 3 5003 bp. Jedes Fragment weist an den Enden eine Restriktionsschnittstelle auf.

Für die Fragmente 1 und 3 müssen vor der Einführung der Restriktionsschnittstellen eine nested-PCR durchgeführt werden. Bei dieser PCR werden 25 µl 1x Pfu-Puffer, je 1 µl des nested-Primers und jeweils 1 µl der Pfu-Polymerase und der Maus-DNA eingesetzt.

PCR-Ansatz mit den Sequenzierungsprimern zur Überprüfung der Bakterienklone:

25 µl 1x PCR-Puffer
 1 µl F-Seq-Primer (10 pmol/µl)
 1 µl R-Seq-Primer (10 pmol/µl)
 0,25 µl Taq-Polymerase
 1,5 µl Bakterienkultur

first delay	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	30 Zyklen
Annealing	primerspezifisch	30 sec	
Elongation	72°C	2,5 min (Fr 1) 1 min (Fr 2) 6 min (Fr 3)	
last delay	72°C	3 min	

Tab. 15: PCR-Reaktionsbedingungen für die Überprüfung der Bakterienklone mit Sequenzierprimern.

Es werden die äußeren mit einem „a“ gekennzeichneten Primer für das Screening der positiven Klone verwendet.

2.2.3.1 Nachweis der homologen Rekombination bei ES-Zellen mittels PCR

Zum Screenen der 400 erhaltenen embryonalen Stammzellklone aus der Transfektion mit dem klonierten Vektor wurde eine PCR-Strategie erstellt, über die sich zum einen das Vorhandensein der loxP-sites überprüfen sowie die homologe Rekombination nachweisen lässt.

Bedingungen der PCRs:

95°C	5 min	
95°C	30 sec	
58 bzw. 59°C	Zeit siehe Tabelle	30 - 35 Zyklen
72 bzw. 68°C	Zeit siehe Tabelle	
72°C	5 min	

Primerpaar	Annealing-Temp./Zeit	Elongations-Temp./Zeit	Erwartete Bandengröße
Screen-NEU-Fr1-F1 und -hR-Vektor-R3	59°C 30 sec	72°C 2.45 min	WT keine Bande KO 2620 bp
Screen-hR-F2 und Screen-hR-R2	58°C 1 min	72°C 1 min	WT 401 bp KO 237 bp
Screen-NEU-Fr1-F4 und hR-Vektor-R3	58°C 1 min	72°C 1 min	WT keine Bande KO 393 bp
Screen-hR-Vektor-F2 und hR-genom-3'-R	58°C 30 sec	68°C 6 min	WT keine Bande KO 5233 bp
Neo-F und Neo-R	58°C 30 sec	72°C 30 sec	WT keine Bande KO 532 bp

Tab. 16: PCR-Bedingungen und erwartete Banden für die homologe Rekombination der ES-Klone.

Die Zusätze für die PCRs wie Betain sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Alle PCRs wurden mit 1x Puffer und Taq/Pfu-Polymerase durchgeführt, bis auf die in der obigen Tabelle als letzte angegebene mit dem Primerpaar Screen-hR-Vektor-F2/ hR-genom-3'-R. Hierfür wurde die Taq-Polymerase mit dem dazugehörigen Puffer von TaKaRa verwendet. Die Primerpaare Screen-NEU-Fr1-F4/ hR-Vektor-R3 und Screen-hR-F2/ Screen-hR-R2 wurden zum Nachweis der loxP-sites eingesetzt. Eine Bande mit 2620 bp zeigte sich bei einer homologen Rekombination an der 5'-site mit den Primern Screen-NEU-Fr1-F1 und -hR-Vektor-R3. An der 3'-site wurde die homologe Rekombination mit den Primern Screen-hR-Vektor-F2 und hR-genom-3'-R überprüft, wobei die PCR bei den korrekt integrierten Klonen eine 5233 bp großen Bande zeigte. Als weitere Kontrolle diente eine PCR mit den Neo-Primern, um die Neo-Kassette in den Zellen nachzuweisen.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Eine der häufigsten Methoden zur Auftrennung von geladenen Makromolekülen, wie Proteine und Nukleinsäuren ist die Elektrophorese. Wegen ihrer unterschiedlichen Größe und Struktur wandern die Moleküle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten im elektrischen Feld durch ein Netzwerk eines polymeren Zuckergerüsts Richtung Anode. Die Konzentration des Agarosegels richtet sich dabei nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Es werden hier 1 bis 2%ige Agarosegele verwendet, da die PCR-Produkte von Fragment 1, 2 und 3 eine Größe von 800 bis 5000 bp besitzen und der Vektor pEasyflox 7 kb groß ist.

Zur Herstellung eines 2%igen Gels werden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis sich eine klare Lösung bildet. Nach Abkühlen des Gemisches auf ca. 50°C werden 10 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml H₂O) zugegeben, und das noch flüssige Gel wird in eine horizontale Elektrophoresekammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Das Gel wird nach seinem Aushärten mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm vorsichtig entfernt. Die PCR-Produkte werden mit 1/10 Volumenanteil 10x Stopp-Puffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert, um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren. Bromphenolblau wandert etwa mit DNA-Fragmenten von 10 – 100 bp Größe und markiert daher die Elektrophorese-Front. Je nach Fragmentgröße dient eine 100 bp oder eine 1 kb Ladder als Molekulargewichtsmarker zur Bestimmung der Größe und Konzentration der zu untersuchenden DNA-Moleküle. Bei einer Gleichspannung von etwa 130 V wird die Gelelektrophorese für ca. 30 min durchgeführt. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotid-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei 302 nm als diskrete Banden sichtbar gemacht werden

2.2.5 Klonierungsstrategie für das VKORC1L1-Gen im pEasyflox-Vektor

Um das VKORC1L1-Gen zu inaktivieren und somit seine Funktion im Gesamtorganismus überprüfen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Exon 2 in spezifischen Geweben der Mäuse ausgeknockt. Dazu wurde zunächst ein Vektor kloniert, der einen langen homologen Arm von 5 kb aufweist, einen kurzen homologen Arm von 2,2 kb besitzt und in dem das Exon 2 von loxP- sites flankiert ist. Die homologen Arme wurden über PCR und Spaltung mit Restriktionsenzymen in den Vektor einkloniert (vgl. Abb. 20). Zusätzlich befinden sich im pEasyflox-Vektor als Selektionsmarker ein Neomycinresistenzgen (*neo*) und ein Herpes simplex Virus Thymidin Kinase Gen (*HSV-tk*).

2.2.6 Spaltung des PCR-Produktes und des pEasyflox-Vektors mit Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, welche Teil eines bakteriellen Restriktions- und Modifikationssystems sind und spezifische, vier bis acht Basen lange, Erkennungssequenzen spalten. Diese Erkennungssequenzen stellen oft Palindrome dar, die eine zweifache Symmetrieachse in 5' → 3' Richtung mit identischer Basenabfolge auf beiden Strängen besitzen. Die mehr als 250 bekannten Restriktionsenzyme werden in drei Klassen unterteilt, von denen für die Molekulargenetik nur die Enzyme der Klasse II interessant sind. Sie binden sequenzspezifisch und hydrolysieren an der Bindungsstelle, so dass ein

Doppelstrang in Restriktionsfragmente zerlegt wird. Je nach Enzym erfolgt die Hydrolyse der Phosphorsäurediesterbindung entweder symmetrisch oder um mehrere Nukleotide versetzt. So entstehen DNA-Fragmente mit doppelsträngigen Enden (blunt ends) oder einzelsträngige 3'- bzw. 5'-Enden (sticky ends). Um ein DNA-Fragment in einen Vektor inserieren zu können, müssen beide Komponenten zueinander passende blunt oder sticky ends aufweisen. Hierzu wird der Vektor mit ein oder zwei Restriktionsenzymen linearisiert und das DNA-Fragment mit denselben Enzymen geschnitten.

Für die Spaltung werden 2 - 5 Units Enzym pro μg DNA eingesetzt. Die in dieser Arbeit für die Klonierung eingesetzten Enzyme sind *NotI* und *SacII* für Fragment 1, *FseI* und *AscI* für Fragment 2 und *XhoI* und *PacI* für Fragment 3. Bei allen Enzymen muss zusätzlich BSA für die Enzymaktivität zum Ansatz zugegeben werden.

PCR-Produkt: 45 μl PCR-Produkt
 10 μl Puffer
 1 μl Enzym 1
 1 μl Enzym 2
 1 μl BSA
 42 μl aqua dest.

Vektor Ansatz A: 4 μl pEasyflox-Vektor
 10 μl Puffer
 1 μl Enzym 1
 1 μl BSA
 84 μl aqua dest.

Vektor Ansatz B: 4 μl pEasyflox-Vektor
 10 μl Puffer
 1 μl BSA
 1 μl Enzym 2
 84 μl aqua dest.

Die Ansätze werden insgesamt für mehrere Stunden bei einer für das Restriktionsenzym spezifischen Temperatur, die meist 37°C beträgt, inkubiert. Nach den ersten 30 Minuten werden die Ansätze des Vektors mit 1 µl Enzym und das PCR-Produkt mit jeweils 1 µl beider Enzyme nachgespalten. Nach einer halben Stunde werden jeweils 3 µl des gespaltenen Vektors auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob der Vektor linear ist. Als Vergleich werden 3 µl des ungespaltenen Vektors mit laufen gelassen. Danach wird der Ansatz A mit 1 µl Enzym 2 und Ansatz B mit 1 µl Enzym 1 gespalten. Nach 30 Minuten erfolgt das Nachspalten mit 1 µl desselben Enzyms. Die Ansätze werden eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden zur Überprüfung der Fragmentgrößen und zum Abschätzen des Verhältnisses von Vektor und PCR-Produkt jeweils 3 µl der Ansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

Kloniertes Fragment	Verwendete Enzyme	NEB-Puffer
Fragment 1	<i>NotI</i> und <i>SacII</i>	2 + BSA
Fragment 2	<i>AscI</i> und <i>FseI</i>	4 + BSA
Fragment 3	<i>PacI</i> und <i>XhoI</i>	4 + BSA

Tab. 17: Eingesetzte Enzyme und Puffer für die Klonierung der Fragmente in den Targetingvektor.

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die für Klonierungen eingesetzt werden, müssen von Salzen, Primern, Nukleotiden und Polymerasen gereinigt werden. Für die PCR-Produkt-Aufreinigung wird das NucleoSpin Extract Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Zunächst wird ein Anteil PCR-Reaktionsprodukt mit vier Anteilen an Puffer NT2 vermischt (50 µl PCR-Produkt und 200 µl Puffer NT2). Dieser zu reinigende Ansatz wird auf eine Säule gegeben und für eine Minute bei 11000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die an die Membran gebundene DNA mit 600 µl ethanolhaltigem Puffer NT3 gewaschen sowie für eine Minute bei 11000 U/min zentrifugiert. Im zweiten Waschschriff werden 200 µl Puffer NT3 verwendet, und es wird bei 11000 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Für die Eluierung der DNA werden 25 – 50 µl 70°C warmes ddH₂O auf die Membran der Säule gegeben. Nach einer Inkubation von einer Minute wird bei 11000 U/min für eine Minute zentrifugiert.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation werden Vektor und PCR-Produkt in einem Verhältnis eingesetzt, das von der Konzentration der beiden Komponenten abhängig ist. Es sollte jedoch immer die eingesetzte Konzentration des PCR-Produktes überwiegen, so dass die Ligation mit dem Vektor gewährleistet ist. Bei Ligation kohäsiver Enden („sticky ends“) sollten die zu ligierenden gespaltenen DNA-Fragmente in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 (Vektor : Insert) vorliegen. Während der Reaktion verknüpft nun die T4-Ligase freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden des Inserts und des Vektors.

Liegen Vektor und PCR-Produkt in etwa identischen Konzentrationen vor, setzt sich der Ansatz wie folgt zusammen:

<u>Ligationsansatz:</u>	1 µl	pEasyflox-Vektor (gespalten und gereinigt)
	4 µl	PCR-Produkt
	4 µl	Ligase-Puffer
	1 µl	T4-Ligase
	10 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wird für etwa 20 Stunden bei 15°C ligiert, so dass anschließend die Elektrotransformation durchgeführt werden kann.

2.2.9 TA-/TOPO Cloning Vektor (Invitrogen)

Um ein DNA-Fragment in den TA Cloning Vektor pCR 2.1 von Invitrogen einzubringen, wird zunächst ein Poly A-Schwanz an das 5'- und 3'- Ende der Sequenz angehängt, damit das PCR-Produkt mit dem Vektor ligieren kann. Dazu werden zu 20 µl PCR-Produkt 1,1 µl dATP-Nukleotide und 0,5 µl Taq-Polymerase gegeben. Der Reaktionsansatz wird für 30 min bei 72°C inkubiert.

Der Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

1 µl	PCR-Produkt
1 µl	10 x Ligase Puffer
2 µl	pCR 2.1 Vektor (25 ng/µl)
1 µl	T4-Ligase
4 µl	aqua dest.

Die Ligation erfolgt bei 14°C über Nacht. Der Ligationsansatz wird in *E.coli* (X L1 blue) Zellen transformiert und auf Amp-LB-Platten mit 40 µl 40 mg/ml X-Gal (3%) ausplattiert. Dadurch ist eine Blau-Weiß-Selektion der Klone möglich. Die weißen Klone sind werden über M13-Primer auf das integrierte PCR-Stück überprüft und anschließend sequenziert.

Verwendete Lösungen des TA Cloning Kits von Invitrogen:

10 x Ligationspuffer:	60 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	60 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl
	1 mg/ml	Bovine Serum Albumin
	70 mM	β-Mercaptoethanol
	1 mM	ATP
	20 mM	Dithiothreitol
	10 mM	Spermidin

2.2.10 Transformation

2.2.10.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen (X L1 blue)

Die meisten Bakterien, darunter auch *E. coli*, nehmen unter normalen Bedingungen DNA nur in begrenztem Umfang auf. Um diese Bakterien wirksam zu transformieren, müssen die Zellen physikalisch und/ oder chemisch behandelt werden. So wird ihre Fähigkeit verstärkt, DNA aufzunehmen. Zellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen werden zunächst 10 ml LB-Medium mit Zellen angeimpft und über Nacht inkubiert. 4 ml dieser Kultur werden mit 400 ml des 37°C warmen LB-Mediums 1:100 verdünnt. Nach etwa zwei Stunden wird die optische Dichte OD₆₀₀ bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (Referenz: LB-Medium). Liegt der Wert zwischen 0,5 und 0,9 wird das Kulturmedium in einem Eiswasserbad für 15 min bei 4°C kaltgestellt und im Anschluss in einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C) für 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird möglichst vollständig abgenommen und das Pellet in eiskaltem ddH₂O gelöst. Die Suspension wird für weitere 15 min bei 4400 U/min zentrifugiert. Der zweite Zentrifugationsschritt wird wiederholt und das danach vorhandene Pellet in sehr wenig ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wird anschließend mit 87%igen

Glycerol auf insgesamt 10% Endkonzentration an Glycerol eingestellt, gut gemischt und jeweils als 50 µl Aliquots bei -70°C eingefroren.

2.2.10.2 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen von *E. coli*

Um DNA in *E. coli* Zellen einzubringen, muss die Zellmembran für Makromoleküle permeabel gemacht werden. Dies kann über die Zugabe von Polyethylenglykol oder von hohen Konzentrationen an CaCl₂ bei 0°C oder aber auf physikalischem Wege mittels Elektroporation durch kurze Elektroimpulse erfolgen. In dieser Arbeit wurde letztere Methode angewendet. Die Selektion von transformierten Zellen erfolgt im Anschluss über ampicillinhaltige LB-Agarplatten. Die aufzunehmende Plasmid-DNA beinhaltet zusätzlich ein Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum verleiht. Ausschließlich Zellen, die diese genetisch determinierte Resistenz über die Aufnahme des Plasmids erworben haben, können auf dem Selektionsmedium wachsen.

Zunächst werden auf Eis 50 µl kompetente eingefrorene Zellen mit 0,85 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und in eine gekühlte Küvette, die zuvor auf dem UV-Transilluminator für 15 min bestrahlt wurde, überführt. Die Küvette wird in den Schlitten des Genepulsers gestellt, und es wird ein Spannungspuls von 2,5 V angelegt (Zeitkonstante 4,5 msec), so dass die Zellmembran für die DNA durchlässig wird. Nach Zugabe von 600 µl SOC-Medium zu den Zellen werden diese in 1,5 ml-Caps überführt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Zellen werden anschließend auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Einstellung am Puls Generator (Bio-Rad Gene Pulser):

set volts raise to	2,5 kV
Kapazität	25 µFD
pulse controler	200 Ohm

2.2.10.3 Transformation mit chemokompetenten *E.coli* Zellen

Bei dieser Art der Transformation werden 1 - 2,5 µl des Ligationsansatzes vorsichtig zu den chemokompetenten Zellen gegeben. Anschließend erfolgt eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Danach werden die Zellen für 30 sec in ein 42°C Wasserbad gehalten und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium lässt man die Zellen 1 Std.

bei 37°C und 200 rpm schütteln. Die Zellen werden auf Eis gestellt und 50 – 200 µl des Ansatzes auf Amp-LB-Platten mit 40 µl 3% X-Gal zur Blau-Weißselektion ausplattiert. Es wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.11 Picken von Bakterienklonen

Um die Klone auf den Amp-LB-Agarplatten mittels PCR zu überprüfen, werden einzelne Klone gepickt. Dazu werden in jede Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte 10 µl ddH₂O gegeben, in welcher der Bakterienklon gut gelöst wird. 2 µl der Bakterienkultur werden für die PCR entnommen. Auf die verbleibenden 8 µl werden 200 µl LB-Medium pipettiert, das mit 1/1000 Ampicillin (100 mg/ml; Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt ist. Die Bakterienklone werden über Nacht bei 37°C wachsen gelassen und anschließend mittels Sequenzierung und mit den entsprechenden Primern überprüft.

2.2.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger wird auch als Kettenabbruchmethode oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet [Sanger et al. 1977]. Bei dieser PCR-Reaktion werden zusätzlich zu den herkömmlichen Nukleotiden (dNTPs) basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt, welche im Gegensatz zu den dNTPs keine Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoff aufweisen. Dies hat zur Folge, dass ein ddNTP nach der Bindung seines 5'-Kohlenstoffatoms an die sich verlängernde DNA-Sequenz keine Phosphodiesterbindung an seinem 3'-Ende ausbilden kann. Die DNA-Synthese wird damit abgebrochen. Heutzutage wird die automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs durchgeführt. Dabei können im Gegensatz zu der ursprünglichen Methode mit Radioaktivmarkierung alle vier Reaktionen in einem Ansatz erfolgen. Neben den vier dNTPs enthält der Ansatz zusätzlich eine geringe Menge an den vier fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Da die Konzentration der ddNTPs im Vergleich zu den dNTPs niedriger ist, findet der Kettenabbruch nur partiell statt. Auf diese Weise entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Größen, die das gleiche durch den Primer festgelegte 5'-Ende aufweisen. An den variablen 3'-Enden befinden sich die jeweiligen ddNTPs. Die eingebauten Didesoxynukleotide werden durch einen Laserstrahl angeregt und entsenden infolge der Fluoreszenz-Markierung Licht verschiedener Farbe. Die Fluoreszenzsignale werden dabei mit einem Detektor gemessen und aufgezeichnet.

Für die Sequenzierung müssen die PCR-Produkte zunächst durch den Abbau von überschüssigen Primern und Nukleotiden mittels spezifischer Enzyme gereinigt werden. Dabei werden zu 20 µl PCR-Produkt 0,5 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, 2 U/µl), 0,5 µl *Exonuklease I* (10 U/µl) und 4 µl ddH₂O gegeben. Für die Reinigung wird der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme 15 min auf 80°C erhitzt.

Die Sequenzierung wurde anschließend mit Hilfe des Quick Start Sequencing Kits und des Sequenziergerätes der Firma Beckman Coulter durchgeführt.

Zusammensetzung des Sequenzieransatzes:

- 1,5 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 5 µl DTCS Quick Start Mastermix
- 0,5 µl F- bzw. R-Seq-Primer (10 pmol/µl)
- 13 µl ddH₂O

Die Ansätze werden gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Das anschließende Cycle-Sequencing wird nach folgendem Programm (Tab. 18) im Thermocycler durchgeführt:

first delay	96°C	3 min	
Denaturierung	96°C	20 sec	30 Zyklen
Annealing	primerspezifisch	20 sec	
Elongation	60°C	4 min	

Tab. 18: Bedingungen für das Cycle-Sequencing.

Die Proben werden nach der Fällung auf eine Mikrotiterplatte (CEQ sample plate) pipettiert und mit einem Tropfen Paraffin überschichtet. Im CEQ-Programm wird die Reihenfolge der Proben in eine Tabelle eingegeben. Die Mikrotiterplatte wird in das Sequenziergerät eingesetzt, und die Proben werden bei 4,2 V je nach Fragmentgröße 50 bis 120 min aufgetrennt.

Während des Sequenzierlaufes regt ein Laserstrahl die in die DNA-Fragmente eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe an. Da die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten ddNTPs

Maxima mit unterschiedlichen Wellenlängen aufweisen, lassen sich die Basen anhand ihrer spezifischen Fluoreszenzfarbe identifizieren. Die gemessenen Daten werden elektronisch erfasst, gespeichert und in eine Basensequenz umgewandelt. Die Analyse der Rohdaten und die Auswertung der Sequenzen erfolgt mit dem CEQ-Programm 2000 der Firma Beckman Coulter (Abb. 15).

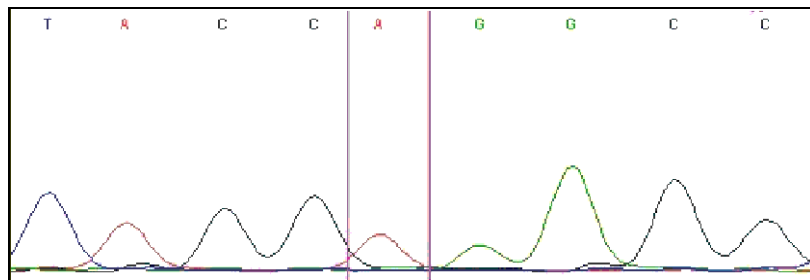


Abb. 15: Basensequenz im CEQ-Auswertprogramm nach der Sequenzierung.
Die blaue Kurve symbolisiert Thymin (T), die rote Adenin (A), die schwarze Cytosin (C) und die grüne Guanin (G).

2.2.13 Plasmid-Isolierung

Für die Plasmid-Isolierung wird das Plasmid-DNA-Purification Kit von Macherey-Nagel (Nucleobond AX Midi 100) eingesetzt. Um die gewünschten Plasmide aus den über Sequenzierung positiv getesteten Bakterienzellen zu isolieren, werden 5 µl einer Glycerinstockkultur bzw. Kultur des gepickten positiv getesteten Klon in 50 ml LB-Medium (mit 50 µl 100 mg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C vermehrt und anschließend bei 4°C mit 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 wird die Suspension leicht gemischt und für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss werden 4 ml des 4°C kalten Puffers S3 hinzugefügt. Die Lösung wird gemischt, bis weiße Flockenbildung einsetzt, welche die Proteinausfällung anzeigt. Die Suspension wird für 5 min auf Eis gestellt, und man lässt sie anschließend über einen Faltenfilter laufen, so dass die Proteine abgetrennt werden. Danach wird die klare Suspension auf eine Säule gegeben, die einen mit 2,5 ml des Puffer N2 angefeuchteten Filter enthält. An diesen Filter kann die Plasmid-DNA binden, so dass sie von den übrigen Bestandteilen der Bakterienzelle getrennt wird. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 5 ml des Puffers N3 wird die gebundene DNA mit 5 ml des Puffer N5 eluiert, und es werden 3,5 ml Isopropanol zur eluierten DNA hinzugegeben. Die Lösung wird im Anschluss eine Stunde bei 6000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des gebildeten Überstandes und Trocknen des Pellets wird das Pellet in 100 µl ddH₂O gut resuspendiert. Die

Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgt über die optische Dichte am UV-Spektralphotometer.

Verwendete Lösungen des Plasmid-DNA-Purification Kits von Macherey-Nagel:

Puffer S1:	50 mM	Tris-HCl (pH 8)
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Puffer S2:	200 mM	NaOH
	1%	SDS
Puffer S3:	2,8 M	Kaliumacetat (pH 5,1)
Puffer N2:	100 mM	Tris
	15%	Ethanol
	900 mM	KCl
	0,15%	Triton X-100
	mit H ₃ PO ₄ eingestellt auf pH 6,3	
Puffer N3:	100 mM	Tris
	15%	Ethanol
	1,15 M	KCl
	mit H ₃ PO ₄ eingestellt auf pH 6,3	
Puffer N5:	100 mM	Tris
	15%	Ethanol
	1 M	KCl
	mit H ₃ PO ₄ eingestellt auf pH 8,5	

2.2.14 Glycerinstocks

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen werden Glycerinstocks angelegt. In dieser Arbeit wurden 800 µl des Bakterienklons, der den pEasyflox-Vektor mit integrierten Fragmenten enthält, mit 200 µl 87%iger Glycerinlösung in einem 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß gut vermischt und bei -70°C gelagert. Zur Herstellung einer neuen

Bakterienkultur werden bei Bedarf 10 µl der gefrorenen Bakterien-Glycerinsuspension zu 100 ml LB-Medium, das mit 100 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt ist, pipettiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Übernachtskultur kann eine DNA-Plasmidisolierung erfolgen.

2.2.15 Der Targetingvektor

2.2.15.1 Testverdau des klonierten pEasyflox-Vektors

Um zu überprüfen, ob die richtigen Fragmente in den Vektor kloniert worden sind, werden zwei Testverdaus angesetzt. Die dabei verwendeten Enzyme sind *HindIII* und *XcmI*.

<i>HindIII</i>		<i>XcmI</i>	
Puffer NEB 2	2 µl	Puffer NEB 2	2 µl
<i>HindIII</i> (100.000U/ml)	1 µl	<i>XcmI</i>	2 µl
Vektor	0,5 µl	Vektor	0,5 µl
H ₂ O	16,5 µl	H ₂ O	16,5 µl

Beim Verdau mit *HindIII* werden folgende Fragmentgrößen erwartet: 380 bp, 919 bp, 3418 bp, 10618 bp. Die Fragmentgrößen mit *XcmI* sind 1127 bp, 1726 bp, 4788 bp, 7694 bp. (Abb. 16)

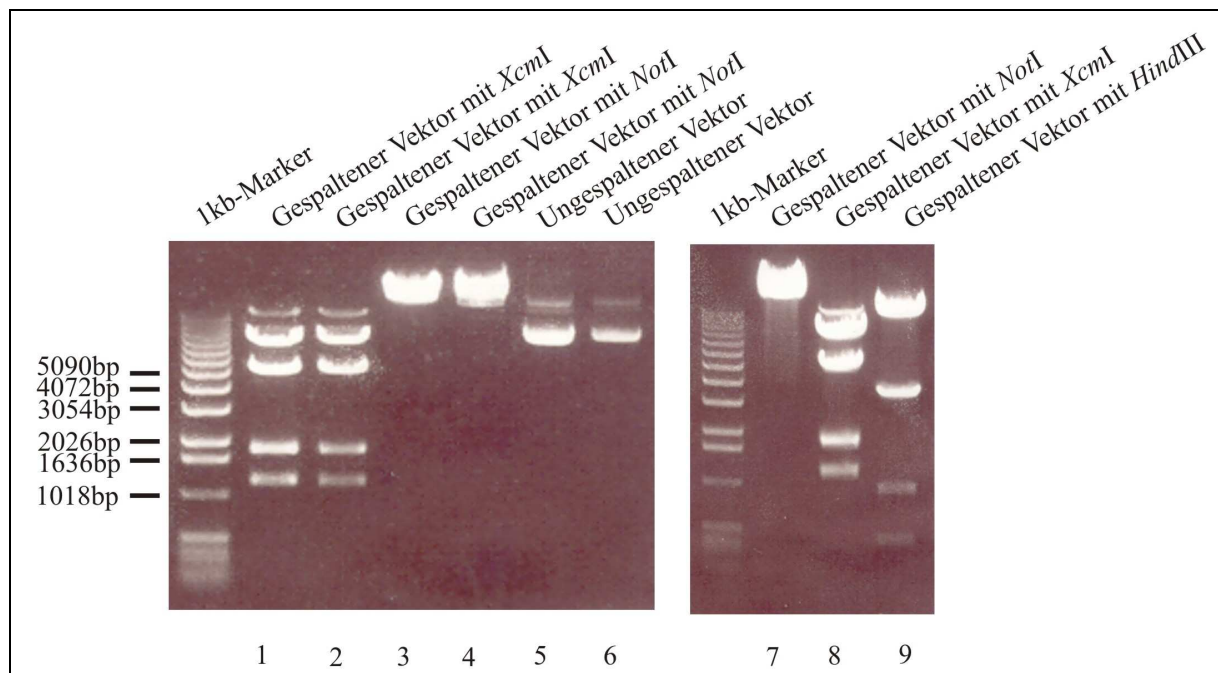


Abb. 16: Testverdau des Targeting-Konstrukts

Mit den Enzymen *XcmI* (Spur 1 und 2) und *HindIII* (Spur 9) wurde ein Testverdau des klonierten Vektorkonstrukts durchgeführt, der in 5 bzw. 4 verschiedenen Fragmenten resultiert. Die Linearisierung des Vektors erfolgte mit *NotI* (Spur 3, 4 und 7). Als Kontrolle wurde unverdauter Vektor eingesetzt (Spur 5 und 6) Als Größenstandard wurde der 1 kb-Marker verwendet.

2.2.15.2 Linearisierung des pEasyflox-Vektors für die Transfektion in ES-Zellen

100 µg des Vektors mit den inklonierten Fragmenten wird mit *NotI* linearisiert (Abb. 16, Spur 4 und 7). Dazu wird der folgende Ansatz verwendet:

300 µl-Ansatz:	Puffer NEB 3	30 µl
	<i>NotI</i> (10.000U/ml)	18 µl
	BSA	3 µl
	Vektor	X µl (100 µg)
	H ₂ O	X µl (auf 300 µl auffüllen)

2.2.15.3 Phenol-Chloroform Aufreinigung des Targeting-Konstrukts

Für die Transfektion muss der linearisierte Vektor aufgereinigt werden. Dazu wird das gleiche Volumen Phenol zugegeben, gevortext und 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in gleichem Volumen Phenol aufgenommen und wieder gevortext und zentrifugiert. Der Ablauf wird zweimal mit Chloroform wiederholt. Anschließend wird die Probe 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen, damit das Chloroform abdampfen kann. Im letzten Schritt wird gleiches Volumen Isopropanol zur oberen Phase gegeben, gut geschüttelt und nach Zentrifugieren das Isopropanol vorsichtig abgekippt. Die DNA wird in 200 µl 70%igem Ethanol aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.2.16 ES-Zellkultur

2.2.16.1 Auftauen von embryonalen Feederzellen

Für das Ausplattieren von EF-Zellen auf drei 15 cm-Gewebekulturplatten wird ein Tube mit eingefrorenen EF-Zellen, die in einem halben bis ganzen Milliliter Einfriermedium aufgenommen sind, verwendet. Zunächst werden die Feederzellen auf Eis langsam aufgetaut. Ein Tube an EF-Zellen wird in 9 ml EF-Medium aufgenommen und 5 min bei 1200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und eine Einzelzellsuspension hergestellt, die mit 3 ml EF-Medium gemischt wird. 19 ml EF-Medium werden zunächst jeweils auf eine 15 cm-Platte vorgelegt, bevor 1ml der Zellen draufgetropft werden. Für das Ausplattieren von ES-Zellen werden EF₃-Zellen benötigt, die man nach dem dritten Splitten erhält.

2.2.16.2 Auftauen von ES-Zellen

Um ES-Zellen von einer 96er Well-Platte erneut in Kultur zu nehmen, wird die Platte, die in Stickstoff eingefroren war, auf Trockeneis gelegt. Zu dem entsprechenden Well wird ES-Medium pipettiert und die Zellen werden darin vorsichtig resuspendiert und in ein Falcon überführt. Es folgt Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1200 rpm. Der Überstand wird abgenommen, und die Zellen werden in 1 ml ES-Medium resuspendiert und auf eine 24er Well-Platte, auf der sich MMC behandelte EF₃-Zellen befinden, ausplattiert. Die ES-Zellen werden nach 3 - 4 Tagen auf 6-Well Platten und schließlich auf 10er Platten gesplittet.

2.2.16.3 MMC-Behandlung von Feederzellen

Nachdem das Medium abgesaugt worden ist, werden die Zellen einmal mit 15 ml PBS gewaschen. 7 ml Mitomycin C werden auf die Zellen gegeben, die Inkubation erfolgt für zwei bis vier Stunden bei 37°C. Danach werden die Zellen zweimal mit 15 ml PBS gespült. Entweder werden die so behandelten Feederzellen eingefroren oder auf neue Gelatineplatten gesplittet.

2.2.16.4 Einfrieren von Feederzellen

Zunächst wird das Medium von der 15er Kulturschale abgesaugt, und die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Eine Platte wird mit 5 ml Trypsin für 3 min bei 37°C behandelt. Die Reaktion wird mit 10 ml EF-Medium abgestoppt, die Zellen werden gut resuspendiert. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 4°C und 1200 U/min zentrifugiert, so dass der Überstand vorsichtig abgenommen werden kann. Das Pellet wird resuspendiert, so dass schließlich eine Einzelzellsuspension vorliegt. Zellen einer 15 cm-Platte werden dafür in 1 ml 1x Einfriermedium (10% DMSO, 90% FCS) aufgenommen und in Cryoröhrchen bei -80°C und später in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.16.5 Splitten von ES- und Feederzellen

Für das Splitten müssen die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gespült werden und in 1x Trypsin (10er Platte 3 ml, 15er Platte 5 ml) 3 min inkubieren. Danach wird das Trypsin mit Medium abgestoppt (10er Platte 7 ml, 15er Platte 10 ml), die Zellen gemischt, von der Platte abgespült und 5 min bei 4°C und 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in ES- bzw. EF-Medium resuspendiert. Dazu wird 1 ml pro neue Platte verwendet. Ein

Milliliter der Zellen wird auf die mit Medium benetzten Platten (18 ml für 15er Platte, 8 – 9 ml für 10er Platte) getropft.

2.2.16.6 Elektroporation von embryonalen Stammzellen

Das linearisierte und aufgereinigte Targeting-Konstrukt wird für die Elektroporation zunächst 15min abzentrifugiert, so dass anschließend das Ethanol abgeschüttet werden und die DNA trocknen kann. Inzwischen werden die zu elektroporierenden embryonalen Stammzellen der Linie V6.5 pro 10 cm-Platte mit 10 ml PBS gut gewaschen, mit 3 ml Trypsin behandelt und für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend in 3 ml Medium aufgenommen. Nach Abzentrifugation der ES-Zellen für 5 min bei 1200 U/min werden die entstandene Einzelzellsuspension und die getrocknete Vektor-DNA jeweils in 800 µl Transfektionspuffer aufgenommen und miteinander vermischt. Jeweils 800 µl des Gemisches werden in eine Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation ist der Genepulser wie folgt eingestellt: 240 V (0,24), 500 µFD (Ext. 500), time const. 7 - 11. Nach dem Pulsen werden die Zellen 5 min stehen gelassen und danach in je 40 ml ES-Medium (keine Selektion!) überführt. 10 ml werden jeweils auf eine Gewebekulturplatte ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C und wachsen gelassen. Der erste Mediumwechsel erfolgt ohne, der zweite mit G418.

2.2.16.7 Picken von ES-Zellklonen

Um Klone zu picken, wird in eine 96er Kulturplatte je Well 25 µl Trypsin vorgelegt. Die ES-Zellen einer 10 cm-Kulturschale werden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 13 ml PBS überschichtet. Die Klone werden mit 40 µl mit einer Pipette von der Kulturschale entfernt und in ein Well einer vorbereiteten 96er Kulturplatte überführt. Pro Platte sollten für das Picken nicht mehr als 30 min verwendet werden. Nach dem Picken inkubieren die Zellen bei 37°C für 5 min. In der Zwischenzeit werden pro ES-Kulturplatte drei EF₃-Platten vorbereitet, die mit 150 µl ES-Medium überschichtet werden. Zu den Klonen werden 100 µl ES-Medium pro Well gegeben, so dass jeweils 50 µl der Zellsuspension auf die EF₃-Platten verteilt werden können. Das Medium wird jeden Tag gewechselt, bis an Tag 3 und 4, je nach Zustand der Zellen, eine 96er Platte eingefroren wird. Die dritte Platte wird zur Gewinnung von DNA auf drei Gelatineplatten gesplittet.

2.2.16.8 Einfrieren von gepickten Klonen

Je nach Zustand der ES-Zellen wird an Tag 3 und 4 je eine Platte mit gepickten Klonen eingefroren. Dazu werden die Zellen mit zweimal 200 µl PBS gewaschen. Danach wird auf jedes Well 50 µl Trypsin gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Danach gibt man 50 µl 2x Einfriermedium (20% DMSO, 80% FCS) pro Well zu. Die Zellen werden auf Eis gut gemischt, die Platte wird mit Parafilm abgedichtet und bei -80°C eingefroren.

2.2.16.9 DNA-Gelatine-Platten

Die dritte Platte der gepickten Klone wird auf drei Gelatineplatten gesplittet, um DNA für den Southern Blot zu gewinnen. Die Klone werden mit 200 µl PBS gewaschen und mit 50 µl Trypsin für 5 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 100 µl ES-Medium zugegeben und jeweils 50 µl auf die gelatinierten 96er Kulturplatten verteilt, in denen 100 µl ES-Medium pro Well vorgelegt sind.

2.2.16.10 DNA-Extraktion aus gepickten ES-Zellklonen

Nachdem die ES-Zellen auf den Gelatineplatten dicht genug gewachsen sind, werden sie für die DNA-Gewinnung zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Auf die Zellen wird dann 50 µl DNA-Lysispuffer gegeben, der mit 1/25 Proteinase K versetzt ist. Die Platten mit den Klonen lässt man, mit Parafilm und Klarsichtfolie abgedichtet und in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Plastikbox verschlossen, über Nacht bei 56°C im Wasserbad stehen. Danach müssen die Platten auf Raumtemperatur abkühlen, bevor sie eine Minute bei 3200 U/min zentrifugiert werden und je Well 100 µl 100%iges Ethanol zugegeben wird. Die Platten inkubieren für eine Stunde, anschließend werden 15 min bei 3200 U/min zentrifugiert. Danach werden sie nochmals 1 - 2 Std. stehen gelassen. Das Ethanol wird vorsichtig mit der Pipette abgezogen und 150 µl 70%iges Ethanol für 5 min zugegeben. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 3200 U/min und Abnehmen des Ethanols wird die DNA trocken gelassen. Die DNA wird in 30 µl TE-Puffer und 70 µl H₂O über Nacht gelöst.

2.2.17 Haltung und Zucht von Mäusen

Die Mäuse wurden in einem klimatisierten Tierstall bei 19 - 23°C und einer Luftfeuchte von 55 - 65% mit einem Tag/ Nachtrhythmus von jeweils 12 Stunden in Makrokolon Käfigen gehalten (bis zu 5 adulte Tiere in einem Typ II long Käfig mit 514 cm²). Als Einstreu wurden autoklavierte Späne verwendet, die noch mit Nistmaterial ergänzt wurden. Die Fütterung mit

Futterpelets von der Firma Ssniff und die Wasserversorgung erfolgten nach Bedarf. Zur Zucht wurden in der Regel jeweils 2 - 3 Weibchen im paarungsfähigen Alter von 5 - 30 Wochen zu einem Männchen von 6 Wochen bis 1,5 Jahren gesetzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit etwa 3 Wochen durch PCR-Analyse von Schwanzbiopsien genotypisiert. Das Absetzen der Jungtiere erfolgte mit einem Alter von 3 - 4 Wochen, dabei wurden die Männchen und Weibchen voneinander getrennt.

2.2.18 DNA-Extraktion aus ES-Zellen und Mausschwanzspitzen

Für die DNA-Gewinnung werden trypsinisierte ES-Zellen 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet bzw. die Schwanzspitzen werden in 1 ml Lysispuffer aufgenommen, der mit 1/25 Proteinase K (19,7 mg/ml) versetzt ist. Die ES-Zellen werden für die Lyse 2 Std., die Schwanzspitzen über Nacht, bei 56°C schütteln gelassen. Anschließend werden 1 ml Isopropanol zu den lysierten Zellen bzw. Schwanzspitzen gegeben, gut gemischt und für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol vermischt und abermals 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet etwa 30 min trocknen gelassen. Anschließend wird das Pellet in 300 µl TE-Puffer, der mit RNase versetzt ist, gelöst.

2.2.19 Southern Blot

2.2.19.1 Sondenherstellung

Für die Herstellung der Sonde wird zunächst eine PCR zur Amplifikation der entsprechenden Sequenzen durchgeführt. Nach dem Auftragen des PCR-Produkts auf ein 2%iges Gel, wird die entsprechende Bande ausgeschnitten und durch das Gelelutionskit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Für 100 mg Agarose werden 200 µl des Puffer NT zugegeben und 10 min bei 50°C inkubiert, damit sich die Agarose auflöst. Alle 2 min wird die Lösung vorsichtig geschüttelt. Anschließend wird das NucleoSpin Extract Säule beladen und 1 min bei 11000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Mit 600 µl Puffer NT3 wird gewaschen und ebenfalls 1 min bei 11000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule nochmals für 2 min bei 11000 U/min zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren, wird 17 µl H₂O auf die Säule gegeben, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 11000 U/min zentrifugiert.

2.2.19.2 Verdau genomischer DNA

Für den Verdau wird folgender 60 µl Ansatz erstellt, der auf die gefällte DNA gegeben wird:

51,4 µl	ES-DNA
2 µl	Enzym <i>Bam</i> HI
6 µl	Puffer
0,6 µl	BSA

Nach einer halben Stunde Inkubationszeit bei 37°C wird mit 2 µl des Enzyms nachgespalten. Zur Überprüfung des Verdau werden 3 µl des Spaltansatzes auf ein 0,8%iges Gel aufgetragen.

2.2.19.3 Southern Blot-Gel, Blotaufbau und -abbau

Für das Southern Blot Hauptgel werden 100 ml 0,7%iges Agarosegel verwendet. Die Geltaschen werden mit den Proben und mit 6 µl Loadingpuffer sowie mit 15 µl des λ-Marker beladen. Das Gel wird bei 20 V über Nacht laufen gelassen. Zur Vorbereitung des Hauptgels wird das Agarosegel mit Schlitten für ca. 20 min in einem Ethidiumbromidbad (TAE-Puffer aus der Gelelektrophorese mit 60 µl Ethidiumbromid versetzt) angefärbt, um die Auftrennung auf dem Transilluminator zu überprüfen und zu dokumentieren. Anschließend wird das Gel für 10 min unter Wippen in 0,25 M HCl depurinisiert (Lösung 1). Zur Denaturierung wird das Gel danach ca. zweimal 10 min in der Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) (Lösung 2) auf der Wippe inkubiert. Für den Aufbau des Semi-dry Kapillar-Blots wird eine Blotschale mit Blotpuffer (0,4 M NaOH) gefüllt und eine Brücke aus 3 mm Chromatography Paper (2 dicke übereinander, ca. 35 x 22 cm, mit NaOH angefeuchtet) über eine Plexiglasplatte gelegt, so dass die Enden in den Puffer reichen. Das Hauptgel wird auf die Brücke gelegt und mit Plastikabgrenzungen an den Rändern abgedichtet. Die Hybond-Membran (trocken), die die gleichen Maße wie das Gel besitzt, wird luftblasenfrei auf das Hauptgel gelegt und mit Chromatography Paper (2 dünne - angefeuchtet mit Denaturierungslösung - + 3 dicke - trocken -) bedeckt. Der Aufbau wird mit einem ca. 10 cm hohen Zellstoffstapel sowie einer Plexiglasplatte bedeckt und mit einem Gewicht (0,5 kg) beschwert. Das Blotten erfolgt bei RT für 12 - 24 Std. Für den Abbau des Southern Blots wird die Nylonmembran mindestens zweimal 10 min in 2x SSC auf der Wippe gewaschen, zwischen Chromatography Paper bei RT getrocknet und im Kühlschrank zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

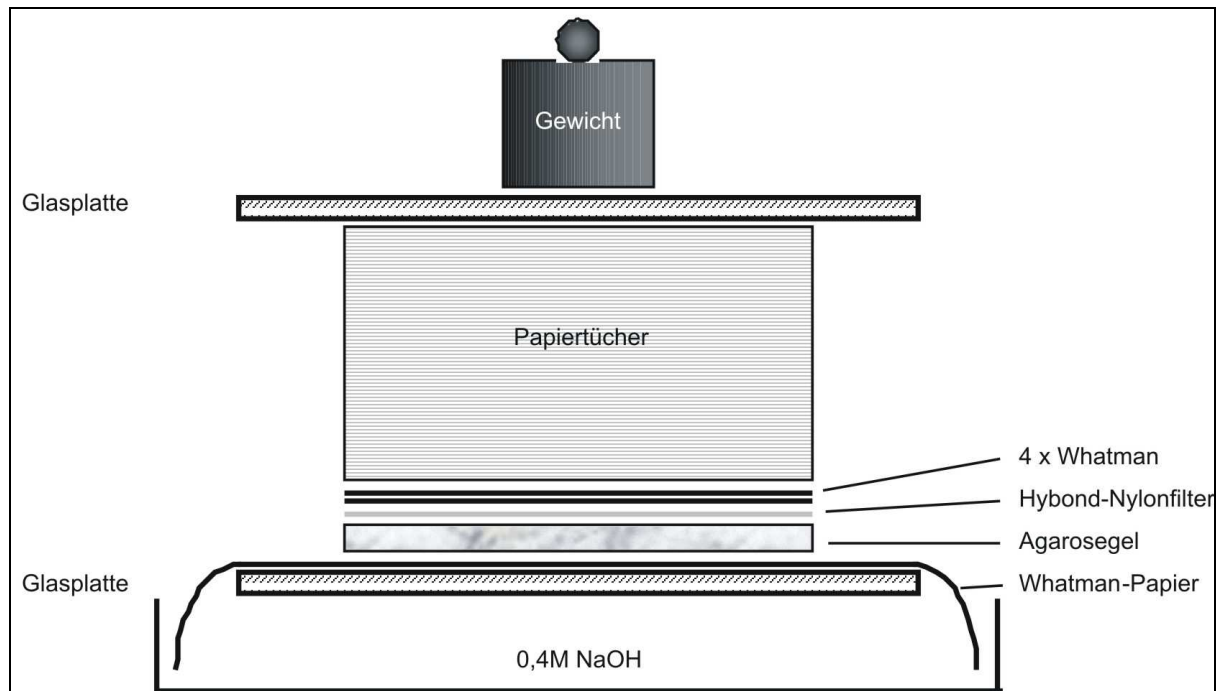


Abb. 17: Aufbau des Southern Blots.

2.2.19.4 Prähybridisierung, Labeln von Sonden und Hybridisierung

Zunächst wird die Membran prähybridisiert, indem 20 ml des vorgewärmten Churchpuffers auf die Membran gegeben wird. Die Inkubation erfolgt in Hybridisierungsröhren im Hybridisierungsofen bei 62 bis 65°C für vier Stunden.

Der Ansatz für das Labeln der über PCR hergestellten Sonde setzt sich wie folgt zusammen:

Sonden-DNA X μl (20 - 30 μg)

TE-Puffer ad 45 μl

Dieser Ansatz wird vorsichtig gemischt, für 5 min bei 95 - 100°C inkubiert und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wird die Sonde kurz anzentrifugiert und in das Reaktionsgefäß aus dem Kit ohne zu mischen gegeben. Als nächstes werden 5 μl α -³²P dCTP zugegeben, gemischt und für 75 min bei 37°C in einer Bleikugel im Wasserbad inkubiert. Nach dem Labeln werden zur Erhöhung des Volumens 50 μl TE-Puffer zur Sonde pipettiert. Um die Sonde aufzureinigen, muss zunächst die dabei verwendete Säule vorbereitet werden. Dazu wird eine 1 ml Einwegspritze mit Glaswolle verschlossen und mit Sephadex G50 als Säulenmaterial befüllt. Es wird für 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Sephadex wird so lange dazu gegeben, bis nach der Zentrifugation die Einwegspritze nahezu befüllt ist. Anschließend wird die Säule mit jeweils 100 μl TE-Puffer äquilibriert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird in ein

1,5 ml Eppendorfgeläß gestellt, mit der gelabelten Sonde beladen und 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert.

Zur Absättigung wird die Sonde und 500 µl Herings-DNA für jeweils 10 min bei 95 - 100°C auf dem Heizblock denaturiert. Der Churchpuffer wird durch den auf 65°C erwärmten Hybridisierungspuffer ersetzt. Die Sonde und die Herings-DNA werden hinzu pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C unter ständigem Rotieren im Hybridisierungssofen.

2.2.19.5 Southern Blot waschen und Film auflegen

Nach der Hybridisierung wird die Hybridisierungslösung bei -20°C eingefroren und die gelabelte Membran mit 2x SSC 0,1% SDS- Lösung (Waschpuffer 1) für etwa 8 min und danach mit 0,5x SSC 0,1% SDS (Waschpuffer 2) für etwa 6 min bei 62 - 65°C im Hybridisierungssofen gewaschen. Die Radioaktivität wird mit dem Counter überprüft und sollte bei 60 - 100 µCi liegen. Anschließend wird die Membran in Folie eingeschweißt und mit der DNA-Seite nach oben in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wird auf die eingeschweißte Membran ein Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei -70°C über Nacht inkubiert.

2.2.19.6 Filmentwicklung

Nach einer Expositionszeit 24 Std. bis 3 Tagen wird der aufgelegte Röntgenfilm von einer Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.19.7 Strippen der Membran

Um einen radioaktiv markierten Blot ein weiteres Mal zu labeln, muss zunächst die vorherige Radioaktivität entfernt werden. Dazu werden 400 ml einer Stripplösung (1% SDS, 0,1x SSC) dreimal aufgekocht. Die heiße Lösung wird auf die Membran gegossen und für 15 min unter Schwenken auf einer Wippe inkubiert. Mit dem Radioaktivitätscounter wird die Membran auf noch vorhandene Restradioaktivität getestet. Wenn keine Strahlung mehr messbar ist, wird die Membran zweimal mit 2x SSC für jeweils 10 min gewaschen.

2.2.20 Karyotypbestimmung von ES-Zellklonen durch SKY Hybridisierung nach Spectral Imaging

2.2.20.1 Vorbereitung der Objektträger

In der vorliegenden Arbeit wurde der Karyotyp der injizierten ES-Zellklone bestimmt. Dazu werden die ES-Zellen zunächst auf einer 10 cm Platte zu einer Konfluenz von etwa 80% herangezogen. In das Medium (10 ml) werden 90 µl Colcemid gegeben, und es wird für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wird das Medium abgenommen und verworfen, 8 ml Trypsin werden auf die Platte gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C werden die Zellen im Trypsin resuspendiert, 2 ml trypsinisierte Zellen werden in ein 15 ml Falcon überführt, in dem sich 3 ml MEM + FCS + Pen/ Strep befinden. Die Zellen werden für 8 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Falcon mit 0,8% NaCitrat bzw. 0,075 M KCl-Lösung auf 15 ml aufgefüllt. Das Pellet wird darin resuspendiert, und es folgt eine Inkubation für 35 min bei 37°C für die NaCitrat-Lösung und für 7 min bei 37°C für die KCl-Lösung. Die Zellen werden danach 8 min bei 1400 rpm abzentrifugiert, so dass der Überstand abgenommen werden kann. Das Falcon wird mit kaltem Fixativ (Eisessig bei -20°C) auf 15 ml aufgefüllt, das Pellet wird im Fixativ gelöst und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag werden die Zellen für 8 min bei 1400 rpm abzentrifugiert und das Pellet in etwa 1,5 ml Fixativ resuspendiert. Drei bis fünf Tropfen der milchigen Lösung werden auf einen Objektträger getropft und mit Pusten verteilt. Der Objektträger wird trocknen gelassen. Es kann nun eine Giemsa-Färbung oder eine SKY-Hybridisierung nach Spectral Imaging erfolgen.

2.2.20.2 Giemsa-Färbung

Für eine 5%ige Giemsa-Lösung werden 5 ml Giemsa Stain Solution über ein Filterpapier filtriert und mit 95 ml Phosphatpuffer gemischt. Mit einem Filterpapier wird die oberste Schicht abgesaugt, um Klumpen durch Oxidation zu entfernen. Die Objektträger werden in der Giemsa-Lösung 5 min angefärbt. Zum Spülen werden die Objektträger kurz in Wasser geschwenkt, danach werden sie 20 min getrocknet. Drei Tropfen des Assistent-Histokitts werden auf den Objektträger getropft, ein Deckglas wird aufgelegt und der Objektträger wird einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet. Die Metaphasen können am Mikroskop analysiert werden.

2.2.20.3 Präparation der Proben

Die vorbereiteten Objektträger mit den aufgetropften Proben werden eine Std. bei 95°C auf einer Heizplatte gebacken. Danach wird die Heizplatte auf 90°C gebracht, auf die Slides werden 200 µl Thiocyanat gegeben, ein Deckglas wird aufgelegt und es wird 10 min inkubiert. Es wird immer wieder mit Thiocyanat nachpipettiert, so dass die Objektträger nicht austrocknen. Danach werden sie 2 x 5 min in aqua dest gewaschen bis sich das Deckglas ablöst. Die Slides werden dann direkt im Anschluss für 5 min bei Raumtemperatur in 2x SSC gegeben. 100 µl RNAselösung und eine Plastikfolie werden luftblasenfrei auf den Objektträger gegeben und in einem Brutschrank bei 37°C für 8 min inkubiert. In der Zwischenzeit wird pro Slide jeweils 8 µl der Sonde (Spectral Imaging) in ein gemeinsames Eppi pipettiert und dieses für 7 min bei 76°C auf dem Heizblock inkubiert. Für die weitere Präparation wird nach der Inkubation im Brutschrank die Folie mit einer Pipette vorsichtig von den Objektträgern abgezogen. Die Slides werden zweimal für 3 min mit 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Abtropfen werden sie für 8 min bei 74°C in 70% Formamid/ 2x SSC (Ansatz s.u.) denaturiert. Dann werden die Objektträger 2 min in 70% Ethanol (-20°C), 2 min in 90% Ethanol (4°C) und 2 min in 100% Ethanol gehalten. Die Slides lässt man abtropfen, mit etwas Druckluft wird die Feuchtigkeit eventuell noch abgeblasen. Die Objektträger werden bei 37°C auf eine Heizplatte gelegt, jeweils 8 µl der vorbereiteten Sonde wird aufgetragen, ein Deckglas wird aufgelegt und es wird mit Fixogum abgedichtet. Nach 10 bis 15 min Trocknen werden die Objektträger in einer Metallbox für 48 Stunden im Wasserbad bei 37°C im Dunkeln schwimmen gelassen. Nach 2 Tagen wird das Fixogum mit der Pipette entfernt und das Deckglas in 0,5x SSC vom Objektträger gelöst. Es erfolgt eine Inkubation für 5 min in 0,5x SSC bei 72°C und anschließend für 2 min in 4x SSC 0,1% Tween bei Raumtemperatur. Zum Blocken wird PNM auf die Slides gegeben, es wird mit Folie abgedeckt und für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es erfolgt kein Waschschrift, sondern die Slides werden zum Abtropfen nur kurz aufgestellt, sie dürfen dabei nicht austrocknen. Für die 1. Schicht Antikörper werden 150 µl Anti Dig (=Monoclonal Antibody Digoxin, produced in mouse) (Verdünnung: 5 µl Antikörper und 1245 µl PNM) auf den Objektträger gegeben, er wird mit Folie abgedeckt und für 45 min im Dunkeln bei 37°C Brutschrank inkubiert. Danach wird für zweimal 2 min in PN Puffer bei Raumtemperatur im Dunkeln ohne Schütteln gewaschen, indem die Waschküvette in Alufolie eingewickelt wird. Für die 2. Schicht Antikörper werden 5 µl von Cy 5 und 5 µl von Cy 5.5 zu 990 µl PNM gegeben. Von diesem Gemisch werden 150 µl auf den Objektträger getropft, der Objektträger wird mit Folie abgedeckt und wieder für 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach

wird zweimal 2 min in PN Puffer im Dunkeln gewaschen. Die Slides dürfen dabei nicht austrocknen. Anschließend werden die Objektträger mit Vectashield eingedeckelt. Dazu werden ca. 180 µl aufgetropft, das Deckglas schwimmt auf der Probe. So können die Proben bis zu einem halben Jahr aufgehoben werden.

Bei den Maus-Sonden verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffen handelt es sich um Rodamin (A), Texas-Rot (B), Cy5 (C), FITC (D) und Cy5.5 (E) mit folgenden Absorptions- bzw. Emissionsspektren:

Label	A-Rhodamine	B-Texas-Red	C-Cy5	D-FITC	E-Cy5.5
Absorption (nm)	550	596	650	495	675
Emission (nm)	570	620	670	525	694

Tab. 19: Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenz- Farbstoffe bei den Maus- Sonden (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000).

Entsprechend sind die einzelnen Chromosomen der Maus in spezifischen Kombinationen der fünf verwendeten Farbstoffe gelabelt:

Chromosom	Label	Chromosom	Label	Chromosom	Label
1	ACD	9	E	17	BCD
2	CE	10	C	18	B
3	AE	11	BC	19	DE
4	ABD	12	CD	X	ABC
5	AC	13	D	Y	ADE
6	BE	14	ACE		
7	BD	15	AD		
8	AB	16	A		

Tab. 20: Fluoreszenz-Farbstoff Code mit dem die Chromosomen jeweils markiert wurden: A- Rhodamine (A), B- Texas- Red (B), C- Cy5 (C), D- FITC (D), E- Cy5.5 (E) (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000).

2.2.20.4 Visualisierung und Auswertung der Proben

Unter einem Phasenkonstrastmikroskop werden die Objektträger nach Metaphasen durchsucht, und nach Auffinden werden diese auf Vollständigkeit überprüft. Die Koordinaten der Metaphasen werden notiert, so dass ihr Auffinden unter dem Fluoreszenzmikroskop einfacher ist.

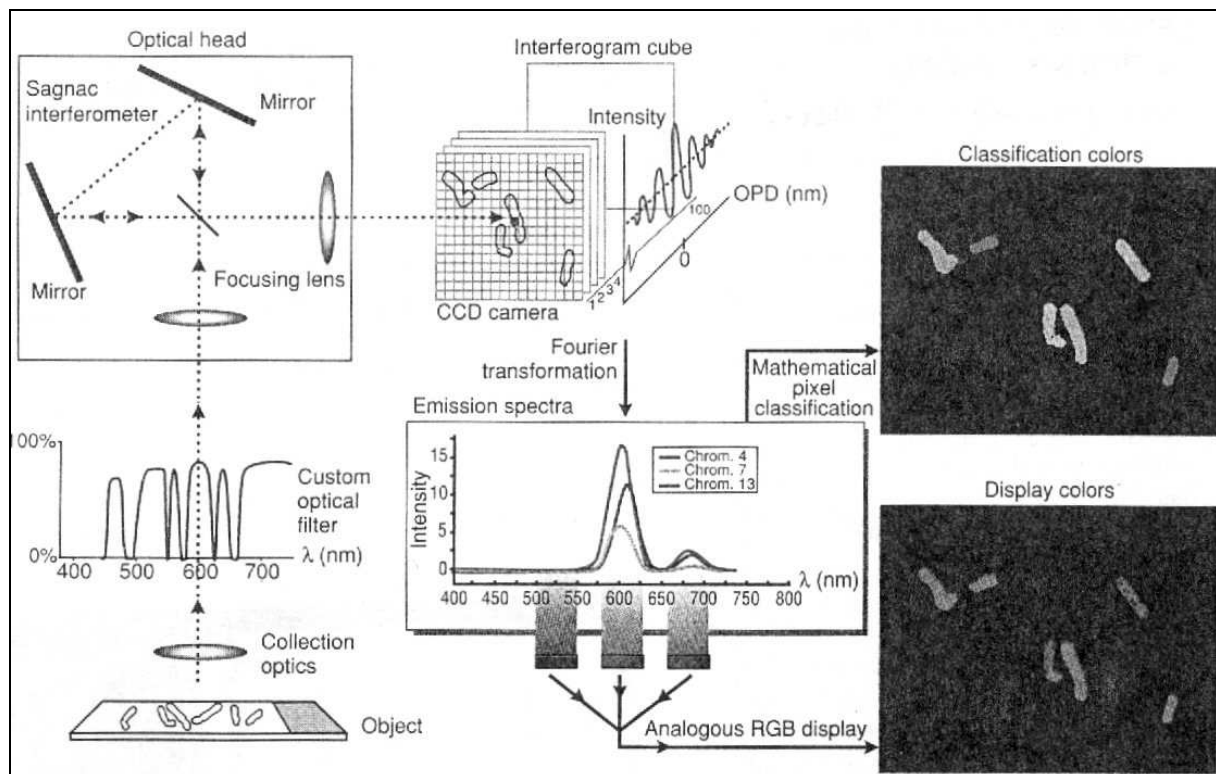


Abb. 18: Aufbau und Funktionsweise der SKY-Analyse (Schröck et al., 1996).

Die Auswertung erfolgt mit dem SKY-System (SD200 spectral imaging system (ASI, Ltd., Israel)), das sich aus einem inversen Mikroskop, einer Quecksilberlampe, einem speziellen Tripleband Filter (SKY CubeTM, ASI), einem Interferometer und einer CCD (charge coupled-device)-Kamera zusammensetzt. Weiterhin wird eine spezielle Software benötigt (Sky View von Applied Spectral Imaging). Durch die Aufnahme mit einem angeschlossenen Fluoreszenzmikroskop wird das gesamte Spektrum des Lichts, welches vom Chromosomenpräparat ausgesandt wird, für jeden Bildpunkt gleichzeitig erfasst. Das Signal passiert dabei einen Triple-Pass-Filter und gelangt über die Mikroskopoptik und ein Sagnac-Interferometer zur digitalen CCD-Kamera. Während der Messung wird für jeden erfassten Pixel ein Interferogramm erstellt, aus dem das genaue Spektrum mittels Fourier-Transformation [Malik et al., 1996] berechnet wird. Die Darstellung der Bilder erfolgt an einem Computer durch das Softwareprogramm, wobei die Spektraldaten als Rot-Grün-Blau

(RGB)-Bild gezeigt werden [Schröck et al. 1996]. Zusätzlich wird ein Bild der DAPI (4'-6'-Diamino-2-Phenylindol)-Gegenfärbung aufgenommen, damit die Zuordnung der Chromosomen erleichtert wird. Es handelt sich dabei um eine Q-Bänderung, die der G-Bänderung sehr ähnlich ist. Eine Klassifizierung der Chromosomen kann mittels eines Algorithmus vorgenommen werden, der den Bildpunkten mit identischer Spektralfarbe eine entsprechende Falschfarben zuordnet [Köhler, Gräve, 1999]. Anschließend können die Chromosomen in einer Karyotyp Tafel angeordnet und ausgewertet werden.

2.2.21 Northern Blot

2.2.21.1 Herstellung der Northern Blot Sonde

Für die PCR mit Einführung von Restriktionsschnittstellen zur Sondenherstellung wurde cDNA von *Mus musculus* als Template verwendet. Anschließend wurde das PCR-Produkt über *NotI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den TA-Cloning Vektor inkloniert. Nach Transformation in *E.coli* wurde der Vektor isoliert und die Sonde aus dem TA-Vektor mit *NotI* und *XhoI* ausgeschnitten, auf ein präparatives Gel aufgetragen sowie mit dem NucleoSpin Kit von Macherey und Nagel aufgereinigt.

<u>PCR:</u> 25 µl 1x Puffer	<u>Bedingungen:</u> 95°C	5 min	
1 µl je Primer	95°C	30 sec	
0,3 µl Taq/Pfu	58°C	30 sec	32 Zyklen
1 µl cDNA	72°C	1 min	
	72°C	5 min	

2.2.21.2 Northern Blot – Prähybridisierung und Hybridisierung

Der Northern Blot (Stratagene) wird nach dem Protokoll des Southern Blots mit einigen Veränderungen durchgeführt (siehe 2.2.19). Für die Prähybridisierung werden 5 ml MiracleHyb hybridization solution (Stratagene) eingesetzt, als Sonde wird VKORC1L1-cDNA bzw. β -Actin-DNA (Stratagene) verwendet. Das Labeln und das Reinigen der Sonde erfolgt nach dem Southern Blot Protokoll. Die Sonde wird anschließend zu 50 µl MiracleHyb probe preparation buffer (Stratagene) gegeben und denaturiert. Für die Hybridisierung wird der Sonden-/ MiracleHyb probe preparation buffer- Mix zur Prähybridisierungslösung und dem Blot pipettiert, nach der Hybridisierung wird der Blot zweimal jeweils mit 7 ml

Waschpuffer 1 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Der dritte Waschschrift erfolgt bei 65°C für 20 min mit 7 ml Waschpuffer 3. Der Röntgenfilm wird für 24 Stunden aufgelegt.

2.2.22 RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zunächst werden 10 - 30 mg Gewebe der Stachelmaus bzw. von *Mus musculus* in 600 µl RLT-Puffer mit einem Mixer 20 - 40 sec zerkleinert, wobei 10 µl β-Mercaptoethanol in 1 ml RLT hinzugefügt ist. Das Lysat wird 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dem Überstand werden 600 µl Ethanol zugegeben und anschließend wird mit der Pipette vorsichtig gemixt. Das Gemisch wird auf ein RNeasy Säulchen gegeben und 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. 700 µl des Puffers RW1 werden auf das Säulchen gegeben und nochmals bei 10000 rpm 15 sec zentrifugiert. Das Säulchen wird in ein neues 2 ml Cap gestellt, 500 µl RPE Puffer werden dazu gegeben, und es wird 2,5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Säulchen wird in ein neues 1,5 ml Tube aus dem Kit gestellt, 40 µl RNase freies Wasser zugeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss findet eine cDNA-Synthese statt.

2.2.23 cDNA-Synthese

Um cDNA aus RNA zu synthetisieren, wird das Kit SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase von Invitrogen verwendet. Der Reaktionsansatz setzt sich zusammen aus: 1 µl oligo (dT)-Primer, 1 ng bis 5 µg total RNA oder 1 - 500 ng mRNA, 1 µl 10 mM dNTP Mix und 13 µl destilliertes Wasser. Das Gemisch wird 3 min bei 72°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren werden zum Ansatz 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor zugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgt eine Inkubation bei 42°C für 2 min. Anschließend wird 1 µl der SuperscriptII RT hinzugegeben und vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Es wird 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 70°C für 15 min inaktiviert. Die gebildete cDNA kann nun als Amplifikationstemplate in die PCR eingesetzt werden.

2.2.24 Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese wird dazu verwendet, um gezielt spezifische Basenveränderungen in bestimmte Gene einzuführen. Solche künstlichen Punktmutationen können die Struktur und Funktion des Proteins beeinflussen. Aus den Veränderungen in der Physiologie der Mutante kann man unter Umständen auf die normale Funktion des Proteins schließen und die

Auswirkungen der eingeführten Mutationen untersuchen. Bei der Mutagenese wird zunächst das Wildtyp-Allel in ein Plasmid oder einen anderen geeigneten Vektor eingebaut und die Hybrid-DNA kloniert. In dieser Arbeit wird das pCEP4-Plasmid von 10,2 kb verwendet, welches u. a. einen CMV Promotor, eine multiple cloning site, einen Origin OriP und ein Ampicillinresistenzgen beinhaltet.

Nach der Klonierung wird das doppelsträngige Plasmid denaturiert, um die einzelsträngige DNA als Vorlage zu erhalten, welche die Wildtypsequenz des Allels trägt. Ein mutagener Primer wird an diese einzelsträngige Matrize anhybridisiert, wobei er zwei zu der Plasmid DNA komplementäre Sequenzabschnitte beinhaltet, welche die gewünschte einzuführende Mutation flankieren. Der Bereich mit der mutierten Primersequenz kann dabei keine Basenpaarungen mit der DNA-Vorlage eingehen. Die Größe der Oligonukleotidprimer sollte zwischen 25 und 45 Basen liegen und ihre Schmelztemperatur sich ca. 10°C über der Elongationstemperatur von 68°C befinden. Die Mutationsstelle sollte in etwa in der Mitte des Primers lokalisiert sein und auf beiden Seiten etwa 10 - 15 Basen besitzen. Eine zugegebene DNA-Polymerase synthetisiert in der Folgereaktion den Komplementärstrang, indem der Primer verlängert wird (für die Elongation sollte die Pfu-Polymerase verwendet werden, da sie eine geringere Fehlerquote als die Taq-Polymerase besitzt). Somit wird ein doppelsträngiges Plasmid erzeugt, das einen DNA-Strang mit der ursprünglichen genetischen Information und einen Strang mit dem mutierten Allel enthält. Anschließend wird die nicht mutierte, methylierte DNA des Ausgangsplasmids durch eine methylierungs-abhängige Restriktion zerstört. Dazu wird der Reaktionsansatz nach Zugabe von 1 µl des Enzyms *DpnI* aus *Diplococcus pneumoniae* eine Stunde bei 37°C inkubiert. Mit 0,85 µl des Plasmid-Vektors werden Bakterienzellen (hier werden *E. coli* Zellen verwendet) transformiert (vgl. 2.2.10), die beide Stränge des Plasmids replizieren. Die Selektion auf transformierte Kolonien kann über eine Ampicillinresistenz erfolgen, die durch den Plasmid-Vektor vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutagenesen in das hVKORC1L1-Gen eingeführt und anschließend im VKOR-Assay analysiert. Es handelt sich dabei um folgende Mutationen: Y146C, Y146F, R65G, V36L und L135R. Diese sind homolog zu den bereits bekannten und in der freien Wildbahn vorkommenden Rattenmutationen und Mutationen in warfarin-resistenten Patienten Y139C, Y139F, R58G, V29L, und L128R.

2.2.25 HEK293-EBNA-Zellkultur

2.2.25.1 Langzeit-Zellkultur

Angewachsene transformierte HEK293-EBNA-Zellen werden in 25 bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen gezüchtet, wobei das Volumen des MEM-Mediums in den kleinen Flaschen 5 ml und das der großen 15 ml betragen sollte. Zwei bis dreimal in der Woche wird das Medium gewechselt, indem das alte Medium durch frisches vorgewärmtes MEM-Medium ersetzt wird. Der Mediumwechsel sollte spätestens dann erfolgen, wenn sich das Medium durch Anhäufung von Stoffwechselprodukten durch den Indikator gelb verfärbt hat und somit zu sauer für die Zellen geworden ist. Des Weiteren ist es notwendig, die Zellen zu splitten oder einen Teil zu verwerfen, wenn die Zellkultur eine hohe Dichte erreicht hat. Generell ist bei Zellkulturen darauf zu achten, dass der Mediumwechsel, das Splitten und die Transfektion der Zellen steril erfolgt, um eine Kontamination der Kulturen bzw. des Brutschranks zu vermeiden.

2.2.25.2 Transfektion von HEK-Zellen

Für die Transfektion sollten die HEK-Zellen ca. 20 bis 30% konfluent sein (ca. ein Tag nach dem Splitten), damit etwa zwei bis drei weitere Teilungen der transformierten Zellen gewährleistet sind. Die Zellzahl wird am Mikroskop ausgezählt und sollte pro Schale $2,2 \times 10^6$ Zellen betragen.

Zunächst werden 12 µg des isolierten DNA-Konstruktes in ddH₂O gelöst. 62 µl steril filtrierte 1 M CaCl₂ sowie 500 µl 2x BBS werden vorsichtig unter leichtem Schütteln zur gelösten DNA hinzugegeben. Das Gemisch wird invertiert, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Die Zellen werden bei 35°C und 3% CO₂ inkubiert. Nach 12 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel, wobei die Zellen mit etwa 6 ml PBS gewaschen werden und 9 ml frisches MEM-Medium hinzugefügt wird. Nach weiteren 36 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ können die transformierten Zellen geerntet werden.

2.2.25.3 Ernten der HEK-Zellen

Um die transfizierten Zellen zu ernten, werden sie mit 10 ml Medium abgespült und in Falconröhrchen überführt. Die Zellen werden anschließend bei 0°C für 3 min mit 2000 U/min zentrifugiert. Danach wird das Pellet mit 5 ml 1x PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet 400 µl Endvolumen CHAPS und Imidazol aufgenommen. Das Pellet wird zunächst mit 100 µl 2%igen CHAPS resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 40 µl 250mM Imidazol wird das Gemisch für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die sich ausbildende schleimige und trübe Lösung zeigt die Lyse der Zellen an, welche für das Freisetzen der zu untersuchenden VKOR und den Nachweis des Enzyms notwendig ist. Je nach Größe des Pellets wird eventuell 30 µl H₂O hinzugefügt. Anschließend wird zu dem Zellgemisch 230 µl 87% Glycerin gegeben, so dass die Zellen bei -20°C eingefroren werden können.

2.2.26 Epoxidierung von Vitamin K₂-Chinon

Da Vitamin K₂-Epoxid nicht käuflich zu erwerben ist, muss eine Epoxidierung von Vitamin K₂-Chinon vorgenommen werden. Dazu werden 1 g des Vitamin K₂-Chinon, das in Form eines gelben Pulvers vorliegt, in 50 ml 100% EtOH gelöst und rührend in einem Wasserbad auf 75°C erwärmt. Dann erfolgt die Zugabe von 2 ml 30 - 35%iger H₂O₂ und von 2 ml 50%iger Natriumcarbonatlösung. Das Gemisch wird unter Rühren 1 Std. bei 75°C inkubiert, bis ein Farbumschlag von gelb zu blassrosa zu erkennen ist. Anschließend wird für 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das ausgefallene Natriumcarbonat abfiltriert und das Ethanol mit einem Rotationsverdampfer in einem 50°C warmen Wasserbad fast vollständig eingedampft. Der Rest aus der Rotationsverdampfung wird mit Wasser verdünnt. Nun wird mit Diethylether im Scheidetrichter extrahiert, etwas wasserfreies Natriumsulfat wird zur besseren Phasentrennung hinzu gegeben. Die obere Etherphase wird aufgefangen, die untere Wasserphase wird nochmals mit Ether extrahiert. Die gewonnene Etherphase wird unter N₂ auf einem Heizblock bei 50°C verdampft. Man erhält Vitamin K₂-Epoxid als gelbliches Öl, welches bei 4°C gelagert werden kann.

2.2.27 VKOR-Aktivitätsmessung bei Warfarinhemmung

Für die Nachweisreaktion der VKOR werden auf Eis zunächst zu 470 µl Puffer B 30 µl der transformierten, geernteten HEK-Zellen pipettiert. Nach der Zugabe von 20 µl 125 mM Dithiothreitol (DTT) (Endkonzentration: 5 mM) wird der Reaktionsansatz gut gemischt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das DTT fungiert in der Reaktion des VKO zum Chinon als Reduktionsäquivalent, indem es über seine SH-Gruppen Protonen zur Verfügung stellt. Nach Abgabe der Protonen sind in der nun oxidierten Form des DTT Disulfidbrücken vorhanden. Nach Zugabe von 5 µl 400 mM CaCl₂ (Endkonzentration 5 mM) zu den Reaktionsansätzen auf Eis werden unterschiedliche Konzentrationen an in DMSO gelöstem Warfarin hinzu pipettiert (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 mM). Zum Schluss werden 10 µl des 400 µM Vitamin K₂-Epoxids (Endkonzentration 8 µM) dazu gegeben. Der Assay wird für eine Stunde bei 30°C inkubiert und die Reaktion der VKOR anschließend durch Zugabe von 1 ml 3:2 Isopropanol/Hexan-Gemisch gestoppt. Nach gründlichem Mischen und kurzen Abzentrifugieren werden 300 µl von der oberen Hexan-Phase, welches u. a. das VKO als auch das Chinon enthält, abgenommen und im Vakuum für ca. 15 min eingetrocknet. Das Pellet wird in 50 µl Methanol gelöst und kann auf der HPLC analysiert werden.

2.2.28 VKOR-Aktivitätsmessung bei verschiedenen Substratkonzentrationen

Für die Aktivitätsmessung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wird derselbe Ansatz wie bei der Warfarinhemmung verwendet. Es lediglich wird das Warfarin weggelassen, und das Vitamin K₂-Epoxid wird in Konzentrationen von 0,5 bis 254 µM zugegeben. Die weitere Präparation erfolgt wie unter 2.2.27 beschrieben.

2.2.29 High performance/pressure liquid chromatography HPLC

Die HPLC ist eine geeignete Methode, um eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes in die einzelnen Bestandteile aufzutrennen und diese zu quantifizieren. Die Auftrennung kann dabei nach Größe, Basizität, Hydrophobizität oder Chiralität der Substanzen erfolgen. Eine Pumpe erzeugt den Fluss des Laufmittels, hier Methanol, über die Säule mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1,3 ml pro Minute. Die Detektorsignale werden in elektrische Signale umgewandelt, die von einem Integrator verarbeitet und von einem Schreiber in Abhängigkeit von der Zeit als Chromatogramm registriert werden. Das Laufmittel stellt die mobile Phase dar und agiert als Träger für die Probenlösung. Nach Einspritzen der Probe in die HPLC fließt diese in der mobilen Phase über eine Säule, die eine

stationäre Phase beinhaltet. Die chemischen nicht-kovalenten Interaktionen der mobilen Phase und der Probensubstanzen mit der stationären Phase beeinflussen die Migrationsrate und führen so zu einer Auftrennung der Komponenten, die sich in der Probe befinden. Bildet eine Substanz stärkere Interaktionen mit der mobilen Phase als mit der stationären Phase aus, wird sie schneller über die Säule laufen und früher detektiert werden. Bei größeren Wechselwirkungen mit der stationären Phase ist die Laufgeschwindigkeit der Substanz über die Säule verlangsamt, so dass die Detektion später erfolgt. Die Retentionszeit ist damit verlängert.

Für diese Arbeit wurde eine C18-Säule eingesetzt, die als stationäre Phase langkettige Kohlenstoffatome enthält. So ist es möglich, die Reaktionskomponenten nach ihrer Hydrophobizität aufzutrennen. Lipophile Substanzen, wie das nachzuweisende Vitamin K-Chinon, bilden starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase aus und werden später als das Vitamin K-Epoxid detektiert. Das Epoxid interagiert aufgrund seiner Hydrophilität stärker mit dem verwendeten Laufmittel Methanol. So weist die Vitamin K₂-Epoxidform eine kürzere Laufzeit auf und wird bereits nach etwa drei Minuten detektiert. Das Chinon kann nach ca. vier Minuten nachgewiesen werden. Das kurzlebige und hydrophobe Hydrochinon kann mit der HPLC nicht erkannt werden, da es wohl zum einen sofort in das Vitamin K-Chinon zerfällt und andererseits wegen seiner kurzen Retentionszeit nicht oder nur sehr schwer detektiert werden kann.

Als Detektoren lassen sich UV-Photometer, Fluoreszenzdetektoren sowie elektrochemische Detektoren einsetzen. Der Nachweis erfolgte hier mit einem UV-Photometer bei einer Wellenlänge von 254 nm. Durch die eingesetzte UV-Strahlung lassen sich relativ energiearme Elektronen, wie π -Elektronen von Doppelbindungen und Benzolringen oder freie Elektronenpaare von funktionellen Gruppen, anregen. Die Absorption A durch die Substanzen entspricht dem Logarithmus der Intensitätswerte des eingestrahlteten Lichtes (I_0) und des absorbierten Lichtes (I):

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Der Photodetektor misst folglich das absorbierte Licht I durch die Substanz, wobei das Signal in eine logarithmische Beziehung umgewandelt wird, welche zu der Konzentration der

Substanz proportional ist. Je höher also die Konzentration der Substanz in der Probe ist, desto größer ist die Absorption des UV-Lichtes und desto größer ist der aufgezeichnete Peak durch den Schreiber. Der Schreiber errechnet über mathematische Integration die Fläche unter dem Peak, so dass man mit Hilfe der Steigung einer Eichgerade für das Vitamin K-Chinon die Konzentrationen und Stoffmengen von Chinon in den Proben ermitteln kann.

2.2.30 Proteinmengenbestimmung nach Lowry

Die Methode der Proteinmengenbestimmung dient dem farbmessenden Nachweis der Proteinkonzentration einer Lösung. Der Nachweis beruht auf der Reaktion der Proteine mit Kupfer in einem alkalischen Medium (dieses Reagenz A' setzt sich zusammen aus Reagenz S und Reagenz A) und der darauf folgenden Reduktion des Folin-Reagenz (Reagenz B) durch die kupferhaltigen Proteine. Die Farbentwicklung der Lösung ist dabei in erster Linie auf die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und in einem geringeren Maße auf Cystin, Cystein und Histidin zurückzuführen. Diese Aminosäuren bewirken eine Reduktion des Folin-Reagenz. Die Reaktion führt zur Bildung von verschiedenen reduzierten Proteinen, welche die charakteristische Blaufärbung der Lösung bewirken und ein Absorptionsmaximum bei 750 nm aufweisen.

Es werden die Reagenzien A, S und B aus dem DC Protein-Assay-Kit von Bio-Rad verwendet, sie müssen auf Raumtemperatur vorgewärmt sein. Die zu untersuchende Probe wird 20fach verdünnt für den Assay eingesetzt. 4 µl der Zellen werden in 76 µl Puffer B des VKOR-Assays aufgenommen, und davon werden 20 µl mit 100 µl Reagenz A' versetzt (Reagenz A' = 2 µl Reagenz S + 100 µl Reagenz A) und gemischt. Als nächstes werden 800 µl Reagenz B zugegeben. Die Probe wird gemischt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach kann die Absorption bei 750 nm mit einem Photometer gemessen werden. Für die Proteinmengenbestimmung muss weiterhin eine BSA- (Bovin Serum Albumin) Konzentrationsreihe aus Verdünnungen von 0,2; 0,4; 0,8 und 1,6 mg/ml mit Puffer B erstellt werden, so dass die gemessenen Werte der Proben auf diese Eichgerade bezogen werden können.

2.2.31 Berechnung der Proteing Gesamtmenge

Für die Berechnung der Proteing Gesamtmenge in mg muss die Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) für jede durchgeführte Transfektion bestimmt werden. Dies geschieht über die Proteinmengenbestimmung nach Lowry (siehe unter 2.2.30), wobei die am Photometer gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm durch die Steigung der BSA-Eichgeraden dividiert wird. Die BSA- Eichgerade wird bei jeder Messung am Photometer neu bestimmt.

$$\text{Proteinkonz. } c \text{ } (\mu\text{g/ml}) = A_{750\text{nm}} / \text{Steigung der Eichgeraden}$$

Durch Multiplikation der Proteinkonzentration mit dem Volumen der eingesetzten Zellen (30 μl) erhält man die Proteing Gesamtmenge:

$$\text{Proteing Gesamtmenge} = \text{Proteinkonz. } c \text{ } (\mu\text{g/ml}) \cdot V_{\text{Zellen}}$$

3 ERGEBNISSE

3.1 Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen

Mit Hilfe von genetisch veränderten Tieren wie der Maus können biologische Mechanismen und Funktionen von Proteinen untersucht werden. Außerdem eignen sich Knockout-Mäuse als Modelle für menschliche Erkrankungen oder für pharmakologische Fragestellungen. Da über das VKORC1L1-Protein funktionell noch nichts bekannt ist, ist eine Phänotyp-Untersuchung nach Inaktivierung des VKORC1L1-Gens in der Maus eine geeignete Methode zur Charakterisierung der Genfunktion. Der erste Schritt zur Erzeugung einer Knockout-Maus ist die Klonierung eines Targeting-Vektors. Dafür müssen zunächst passende genomische Bereiche im zu untersuchenden Gen ausgewählt und anschließend in das Vektor-Konstrukt eingebracht werden (Abb. 19).

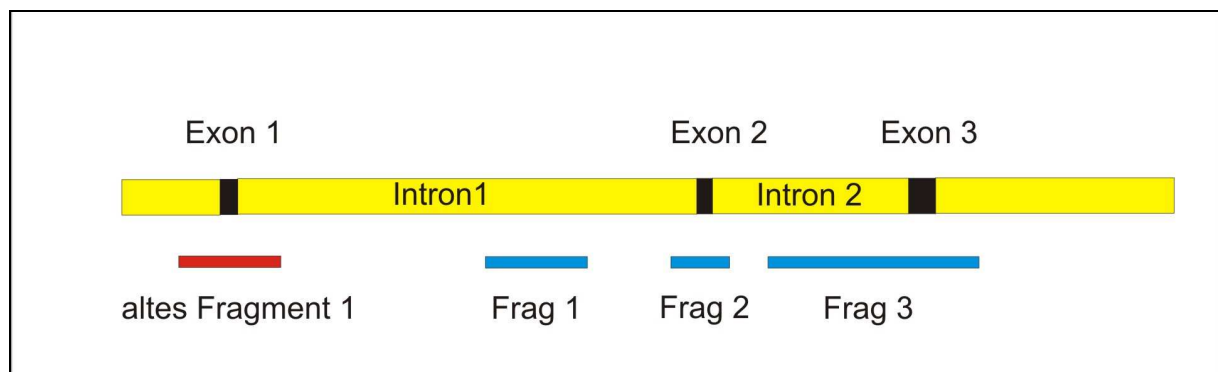


Abb. 19: Genomische Karte des VKORC1L1-Gens mit den ausgewählten zu klonierenden Regionen.

Die genomische Sequenz (gelb) des VKORC1L1-Gens ist mit seinen drei Exons (schwarz) und den Introns dargestellt. Die verwendeten Fragmente 1, 2 und 3 für die Klonierung des Targeting-Vektors sind in blau markiert. Dabei beinhaltet das Fragment 2 (Frag 2) das Exon 2 und das Fragment 3 (Frag 3) das Exon 3. Das ursprüngliche Fragment 1 (rot) lag im Bereich des Exons 1. Da keine positiven transfizierten Klone mit diesem Konstrukt hervorgingen, wurde das alte Fragment 1 des Vektors umkloniert. Der neue Genabschnitt „Frag 1“ ist blau markiert. Frag = Fragment

Ein typischer Vektor besteht aus zwei zum Genom homologen DNA-Sequenzen, wie dem Fragment 1 und 3 in der vorliegenden Arbeit. Eine weitere Sequenz (hier Fragment 2) umfasst einen funktionell essentiellen Bereich des Gens, der im Konstrukt von loxP-sites flankiert wird. Ein positiver und ein negativer Selektionsmarker sind für die Anreicherung der erfolgreich transfizierten embryonalen Stammzellklone, bei denen homologe Rekombination stattgefunden hat, notwendig.

3.1.1 Klonierung des Targeting-Vektors

Die Länge der homologen Sequenz im Targetingvektor beeinflusst die Rekombinationsfrequenz [Thomas, Cappecchi, 1987; Hasty et al., 1991]. Sie ist dabei umso höher je länger die homologe Sequenz ist. Generell wird eine Sequenzlänge von 5 - 10 kb bei der Generierung eines Targetingkonstrukts angestrebt. Als Targetingvektor wurde in der vorliegenden Arbeit der pEasyflox-Vektor vom Institut für Genetik aus Köln verwendet (Abb. 20). In diesen wurde in die erste Multiple Cloning Site (MCS) der kurze homologe Arm von 2,2 kb an der 5'-site inkloniert, in die zweite MCS wurde ein etwa 1 kb-Fragment eingefügt, welches das Exon 2 enthält. Dieses Fragment ist durch loxP-sites flankiert, so dass in der späteren Knockout-Maus dieses Stück durch die Cre-Rekombinase entfernt werden kann. Dies bedingt eine Leserasterverschiebung und somit einen vorzeitigen Abbruch in der Transkription und Translation der Proteinsynthese des VKORC1L1. Es resultiert ein verkürztes VKORC1L1-Protein, das seine Funktion nicht mehr ausüben kann. In die dritte MCS wird ein 5 kb Fragment als langer Homologiearm der 3'-site eingeführt. Die drei Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und über Restriktionsenzyme in den Zielvektor inkloniert. Des Weiteren befinden sich im pEasyflox-Vektor das gefloxe Neomycinresistenzgen (*neo*) als positiver Selektionsmarker und das Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase Gen (*HSV-tk*) als negative Selektionskassette.

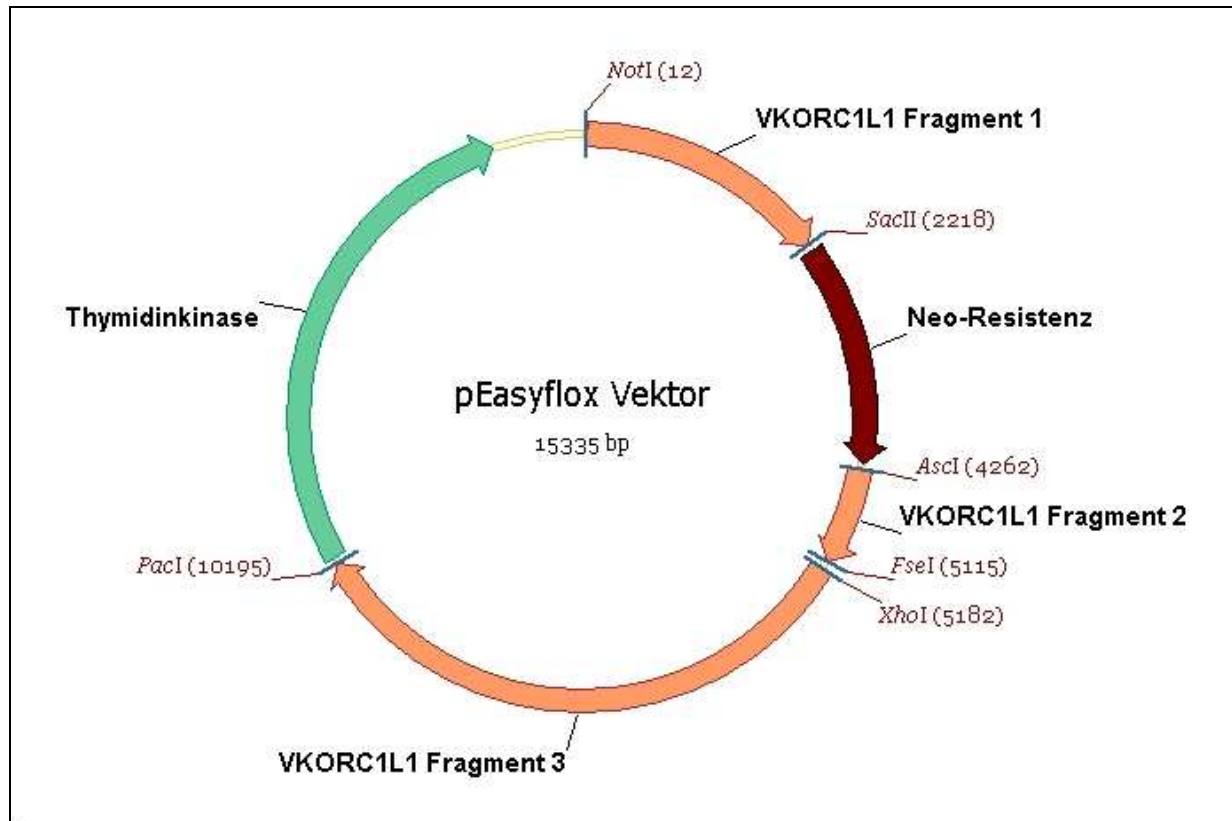


Abb. 20: Vektorkonstrukt pEasyflox mit den einklonierten Fragmenten des VKORC1L1-Gens.

Das Fragment 1 wurde mit den Enzymen *NotI* und *SacII*, das Fragment 2 mit *AscI* und *FseI* und das Fragment 3 mit *XhoI* und *PacI* in den pEasyflox-Targetingvektor einkloniert. Fragment 1 und 3 vermitteln die homologe Rekombination, das gefloxtete Fragment 2 beinhaltet des Exon 2 des VKORC1L1-Gens. Die Neomycin-Resistenzkassette und das Thymidinkinase-Gen dienen der Doppelselektion der ES-Zellen nach der Transfektion.

Insgesamt fanden am Institut für Genetik in Köln zwei Transfektionen mit unterschiedlichen Vektorkonstrukten für das VKORC1L1 statt. Da nach der ersten Transfektion in mehreren Versuchen nur 200 ES-Klone gepickt werden konnten, die alle negativ getestet wurden, wurde der ursprüngliche Targetingvektor über Klonierung am homologen Arm des 5'-Endes verändert. Der ursprüngliche Genabschnitt für den kurzen Arm im Vektorkonstrukt ist in Abbildung 19 als „altes Fragment“ in rot gekennzeichnet und wurde für das zweite Konstrukt ausgetauscht. Dazu wurde ein anderer Homologiebereich im intronischen Bereich des VKORC1L1-Gens (blaues Fragment 1 in Abb. 19) über eine Länge von 2,2 kb ausgewählt, damit eine bessere Anlagerung und so eine effizientere homologe Rekombination zwischen dem genomischen Zielbereich und dem Vektorkonstrukt erreicht werden sollte. Mit diesem zweiten Konstrukt (Abb. 20) konnten letztlich Chimären generiert werden. Für die Transfektionen wurden embryonale Stammzellen der Linie V6.5 verwendet.

3.1.2 Überprüfung der transfizierten embryonalen Stammzellklone

3.1.2.1 Nachweis der homologen Rekombination bei den transfizierten ES-Zellen mittels PCR

Aus der Transfektion mit dem zweiten, veränderten Vektorkonstrukt gingen insgesamt 400 ES-Zellklone hervor, die anschließend über PCR und Southern Blot analysiert wurden. Dabei wurden über PCR die loxP-Sequenzen auf ihr Vorhandensein getestet sowie die 5'- und 3'-Sequenzen auf korrekte Integration ins Mausgenom untersucht (Abb. 21). Dabei fanden sich zwei positiv getestete ES-Zellklone, welche für die Generierung einer Knockout-Maus verwendet wurden.

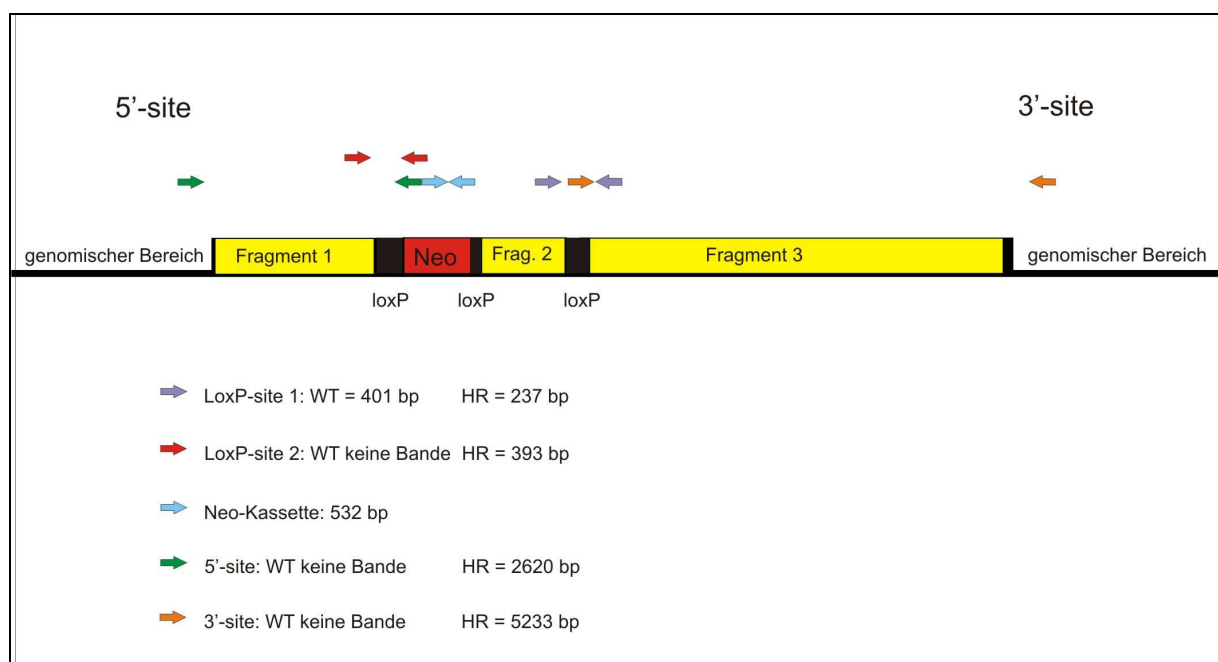


Abb. 21: PCR-Strategie für Screening der embryonalen Stammzellklone nach der Transfektion.

Das Vektorkonstrukt ist linear mit den einklonierten Fragmenten (gelb) und der Neomycinresistenzkassette (Neo, rot) dargestellt. Diese und das Fragment 2 sind durch loxP-sites (loxP) flankiert. Die Primer sind für die jeweiligen PCRs mit Pfeilen farblich gekennzeichnet. Die erwarteten Bandengrößen sind für den Wildtyp (WT) und für die homologe Rekombination (HR) angegeben.

Bei den loxP-sites handelt es sich um 34 bp lange Sequenzen, die für eine spätere Inaktivierung des VKORC1L1-Gens in der Maus notwendig sind. Sie flankieren das Fragment 2 des Targetingkonstrukts, so dass dieses nach gewebespezifischer Behandlung mit der Cre-Rekombinase herausgespleißt wird. Es kann somit kein funktionsfähiges Protein mehr im entsprechenden Gewebe gebildet werden. Das Vorhandensein dieser loxP-sites in den embryonalen Stammzellklonen bestätigt die Integration des Vektors ins Genom. Die loxP-site 1 wurde mit dem Primerpaar Screen-NEU-Fr1-F1 und Screen-hR-Vektor-R3 amplifiziert, die loxP-site 2 mit Screen-hR-F2 und Screen-hR-R2. Die Primer der ersten loxP-site sind als lila

farbene Pfeile in der oberen Abbildung dargestellt, die Primer der loxP-site 2 sind rot markiert. Als Wildtyp-Bande für die loxP-site 1-PCR wird ein 401 bp Fragment sichtbar. Wenn homologe Rekombination stattgefunden hat, ist eine zweite Bande von 237bp vorhanden. Für die loxP-site 2-PCR ist nur bei erfolgreicher homologer Rekombination eine Bande von 393 bp zu sehen, der Wildtyp weist keine Bande auf. Als Kontrollen wurden sowohl der Wildtyp, das Vektorkonstrukt als auch ein Leerwert mitgeführt (Abb. 22).

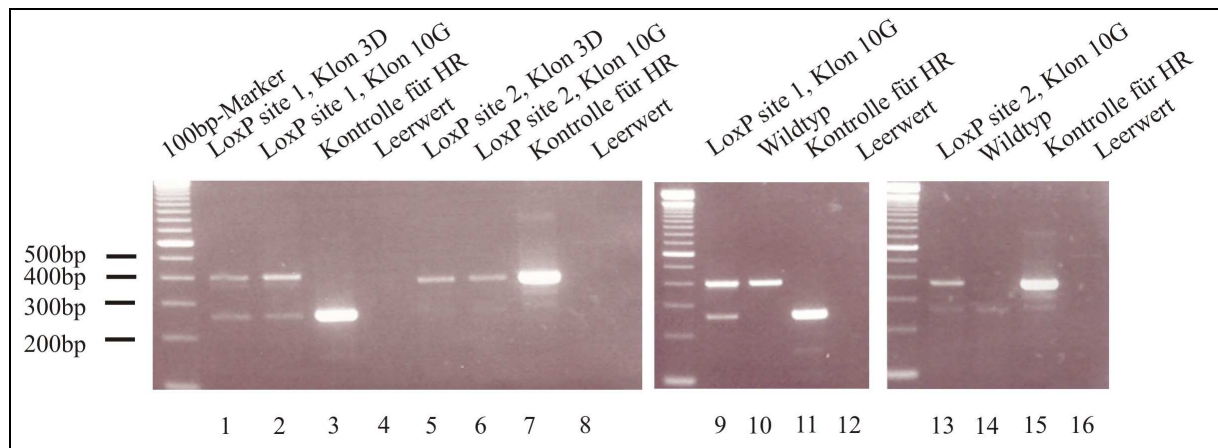


Abb. 22: PCR zum Nachweis der loxP-sites.

Die erwarteten Banden für die loxP-site 1 betragen für den Wildtyp (WT) 401 bp und für homologe Rekombination (HR) 237 bp. Die loxP-site 2 weist für den Wildtyp keine Bande auf, bei homologer Rekombination wird ein 393 bp großes Stück amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde der Targetingvektor mitgeführt.

Die Neomycinkassette des Targetingvektors ist für die positive Selektion der homolog rekombinanten embryonalen Stammzellklone nach der Transfektion notwendig. Ihr Vorhandensein ist ein Nachweis für eine erfolgreiche Integration des Vektorkonstrukts in das Genom der embryonalen Stammzellen. Die Neo^R-Kassette wurde mit den Neo-Primern (blaue Pfeile in Abb. 21) amplifiziert. Ein PCR-Produkt von 532 bp erscheint nur bei Klonen mit integriertem Vektor (Abb. 23). Der PCR-Ansatz mit dem Vektorkonstrukt (Spur 3 und 7) diente als positive PCR-Kontrolle.

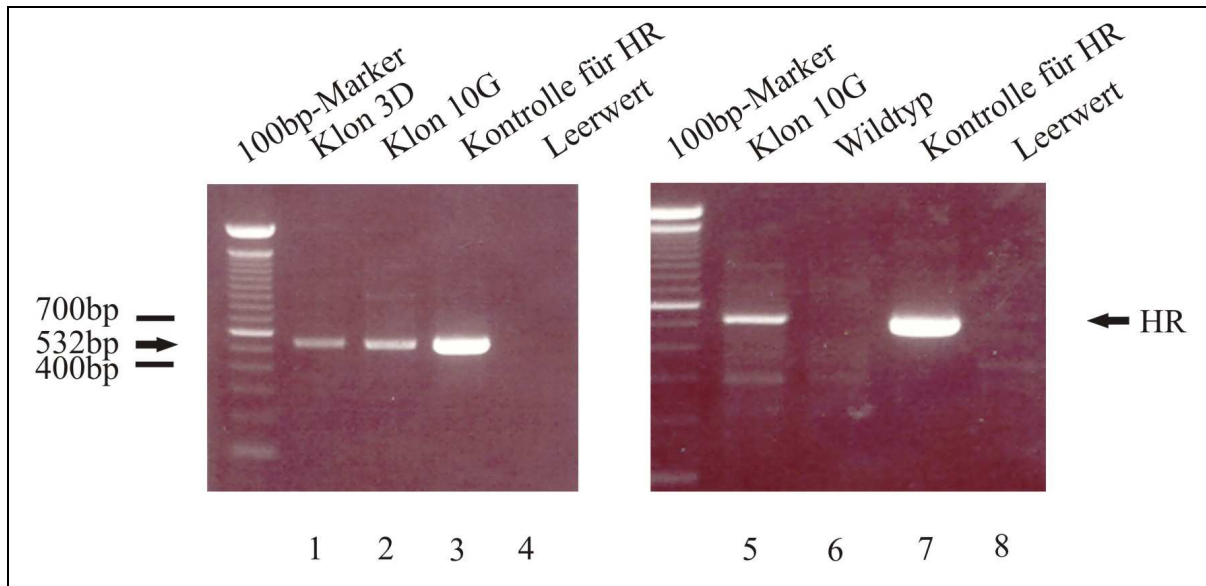


Abb. 23: PCR für die Neo-Kassette.

In Spur 1 und 2 sind die beiden homolog rekombinierten Klone aufgetragen. Sie zeigen ebenso wie das Vektorkonstrukt), das als Positivkontrolle für die homologe Rekombination (HR) dient, eine 532 bp-Bande. Der Wildtyp zeigt keine Bande. Als Größenstandard ist ein 100bp-Marker aufgetragen.

Um die Integration des Targeting Konstrukts an der richtigen Stelle im Genom nachzuprüfen, werden die 5'-site und 3'-site des Vektors mittels PCR mit entsprechenden Primern kontrolliert (vgl. Abb. 21). Nur bei korrekter Rekombination sind PCR-Produkte der erwarteten Bandengröße sichtbar. Eine positive Kontrolle ist bei diesen beiden PCRs nicht möglich. Die verwendeten Primer für die 5'-site sind Screen-NEU-Fr1-F1 und Screen-hR-Vektor-R3. Diese Primer sind in der Abbildung 21 grün markiert. Das erwartete PCR-Produkt besitzt eine Größe von 2620 bp (Abb. 24).

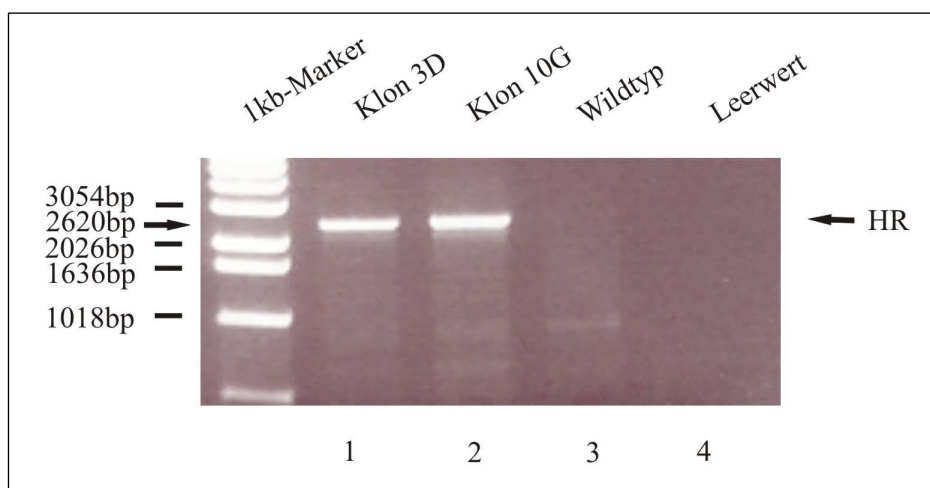


Abb. 24: PCR für die 5'-site.

Klon 3D und Klon 10G (Spur 1 und 2) zeigen eine 2620 bp Bande für erfolgte homologe Rekombination (HR). Beim Wildtyp ist keine Bande sichtbar. Eine Positivkontrolle ist für diese PCR nicht möglich. Als Größenstandard wurde ein 1kb-Marker verwendet.

Die Amplifikation der 3'-site erfolgte mit dem Primerpaar Screen-hR-Vektor-F2 und hR-genom-3'-R mit Hilfe der TaKaRa-Polymerase. Die Primer sind in Abb. 21 als orange farbene Pfeile dargestellt. Das amplifizierte Fragment besitzt eine Größe von 5233 bp (Abb. 25).

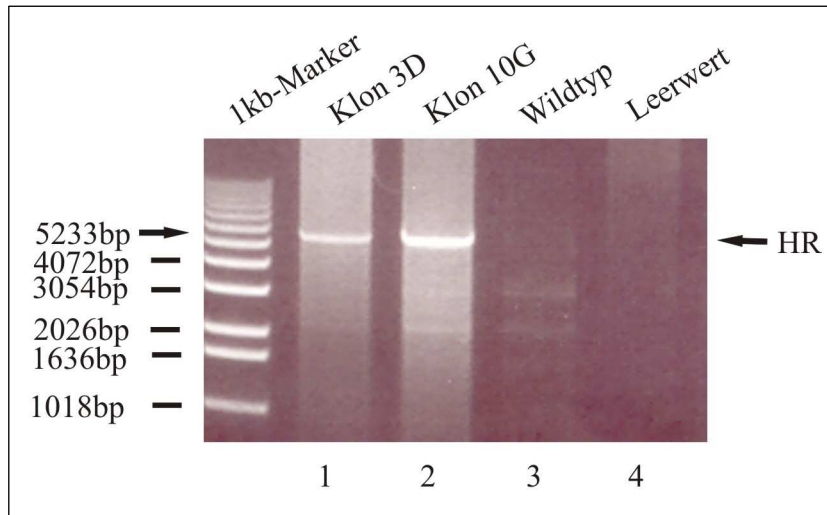


Abb. 25: PCR für die 3'-site.
 In Spur 1 und 2 sind die beiden homolog rekombinanten Klone 3D und 10G aufgetragen. Bei homologer Rekombination (HR) erscheint eine Bande der Größe von 5233 bp. Bei wildtypischer DNA erscheint kein PCR-Produkt.

3.1.2.2 Nachweis der homologen Rekombination bei den ES-Zellen mittels Southern Blot

Als weitere Screening-Methode für die transfizierten ES-Zellklone zur Bestätigung der homologen Rekombination wurde der Southern Blot eingesetzt (Abb. 26). So können große Fragmente detektiert und auf ihre richtige Größe überprüft werden. Das verwendete Enzym *Bam*HI schneidet im wildtypischen Genom im zu klonierenden Bereich des VKORC1L1-Gens an zwei Stellen. Eine Schnittstelle befindet sich vor dem Exon 1 im intronischen Bereich, die andere liegt im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 (grüne Pfeile in Abb. 26). Die radioaktiv markierte *Bam*HI-Sonde bindet am kurzen Arm vor dem Exon 1 des VKORC1L1, so dass sich ein 7,8 kb großes Fragment für den Wildtyp detektieren lässt. Hat eine homologe Rekombination des Targetingvektors stattgefunden, verschwindet die *Bam*HI-Schnittstelle zwischen Exon 2 und 3 und zwei neue Schnittstellen entstehen. Sie liegen vor der Neo-Resistenzkassette im Vektor und hinter dem Exon 3. Mit der *Bam*HI-Sonde lassen sich daher für die Klone mit erfolgter homologer Rekombination nun ein zusätzliches 4,9 kb großes Fragment nachweisen (Abb. 27). Mit der Neo-Sonde, welche in der Neomycin-Selektionskassette bindet, kann das durch homologe Rekombination entstandene 6,5 kb Fragment detektiert werden (Abb. 28).

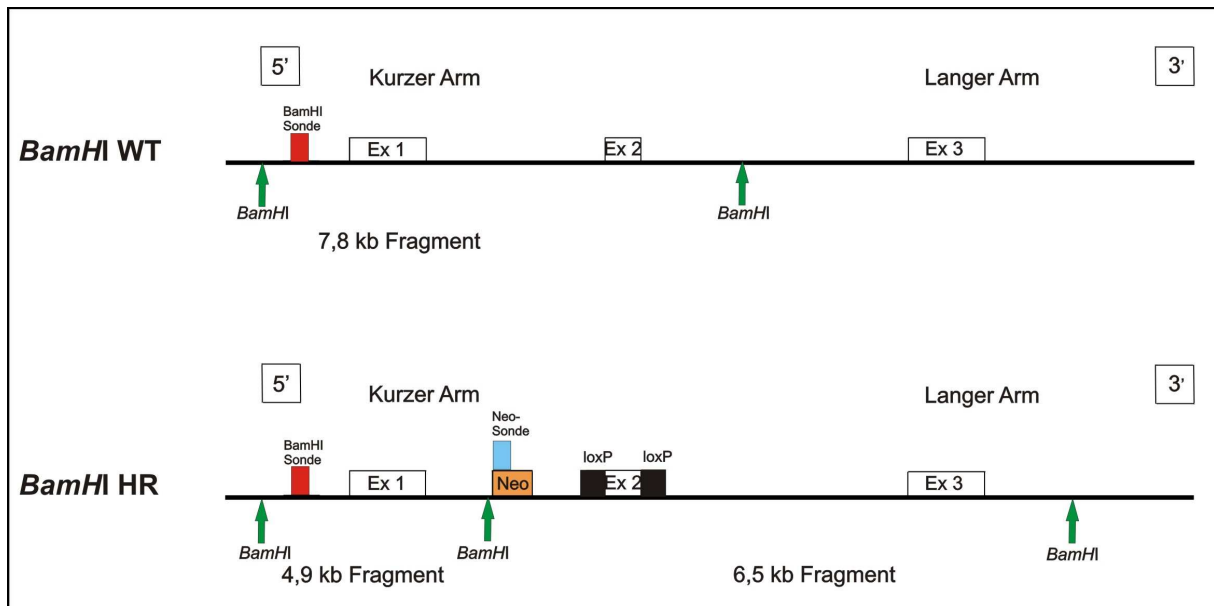


Abb. 26: Southern Blot-Strategie für das Screening der embryonalen Stammzellklone nach der Transfektion.

Der Wildtyp (WT) zeigt im Southern Blot nach Verdau mit dem Enzym *BamHI* und nach Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten *BamHI*-Sonde (rot) ein 7,8 kb Fragment. Die jeweiligen Schnittstellen des Enzyms sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet. Nach erfolgter homologer Rekombination (HR) verschwindet die ursprüngliche *BamHI*-Schnittstelle und zwei neue Schnittstellen entstehen. Mit der *BamHI*-Sonde wird eine 4,9 kb großes Fragment detektiert, die Neo-Sonde, welche innerhalb der Neomycinresistenzkassette (Neo, orange) bindet, macht ein 6,5 kb großes Fragment auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Die *BamHI*-Sonde für die 5'-site wurde über PCR hergestellt und anschließend für die Hybridisierung der mit *BamHI*-verdauten genomischen DNA verwendet. Auf dem entwickelten Röntgenfilm lassen sich für den Wildtyp eine Bande von 7,8 kb erkennen, bei den homolog rekombinanten Klonen erscheint eine weitere Bande von 4,9 kb (Abb. 26).

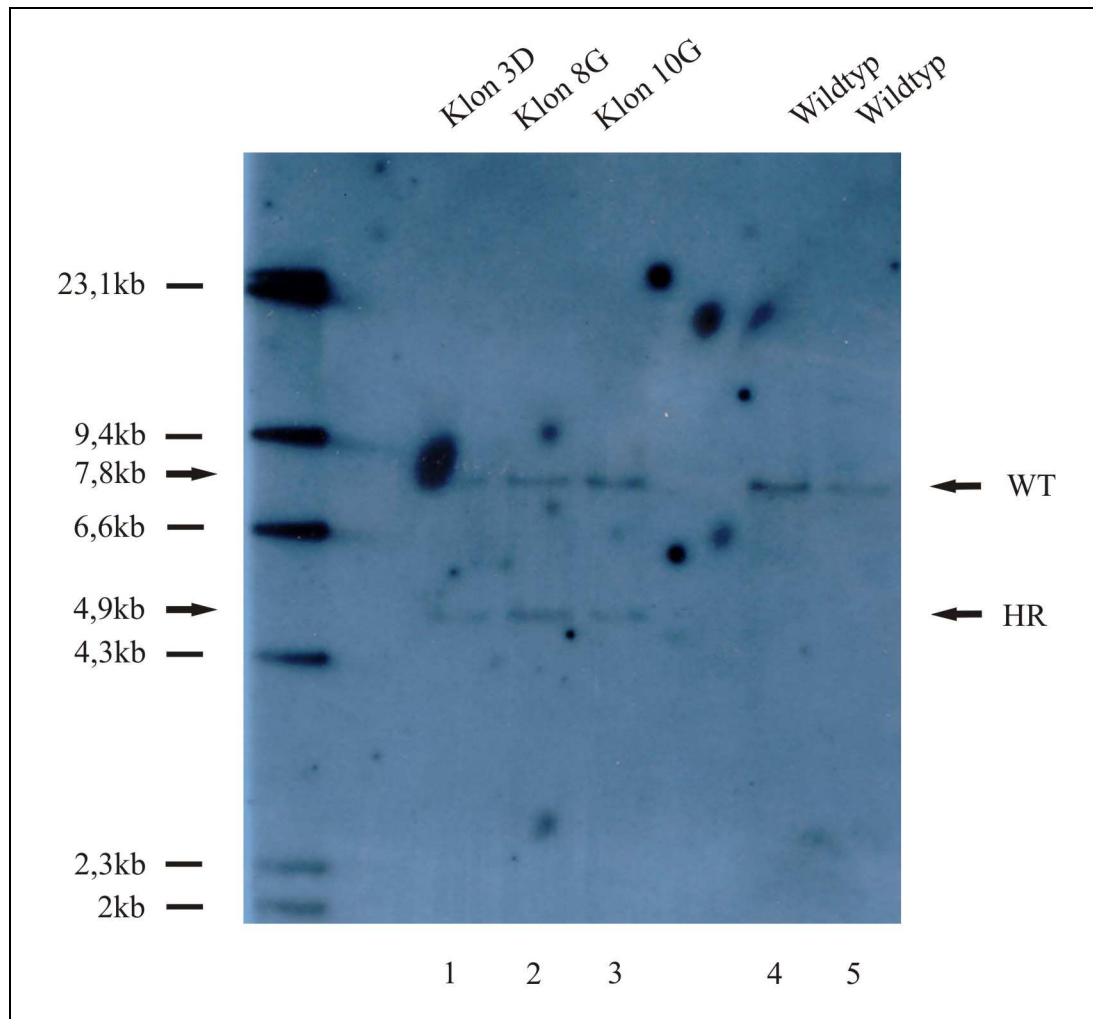


Abb. 27: Southern Blot für die 5'-site mit einer *Bam*HI-Sonde.

Die erwartete Bande für den Wildtyp beträgt 7,8 kb, bei homologer Rekombination erscheint eine weitere Bande von 4,9 kb. Die Klone 3D, 8G und 10G sind homolog rekombinant. WT = Wildtyp, HR = homologe Rekombination

Um die Integration der 3'-site zu überprüfen und sicherzustellen, dass das Konstrukt nur einmal im Genom vorhanden ist, wird ein Southern Blot mit der Neo-Sonde durchgeführt. Diese Sonde bindet in der Neomycinresistenz-Kassette des Vektorkonstrukts (Abb. 26). Bei einmaliger Rekombination an der richtigen Position erscheint eine Bande von 6,5 kb auf dem Röntgenfilm (Abb. 27). Für Klon 8G, welcher über PCR positiv auf homologe Rekombination getestet wurde, ist eine zweite Bande sichtbar. Dies spricht für eine mehrfache Integration der Neomycin-Kassette, so dass dieser Klon nicht für die Blastozysteninjektion verwendet werden kann.

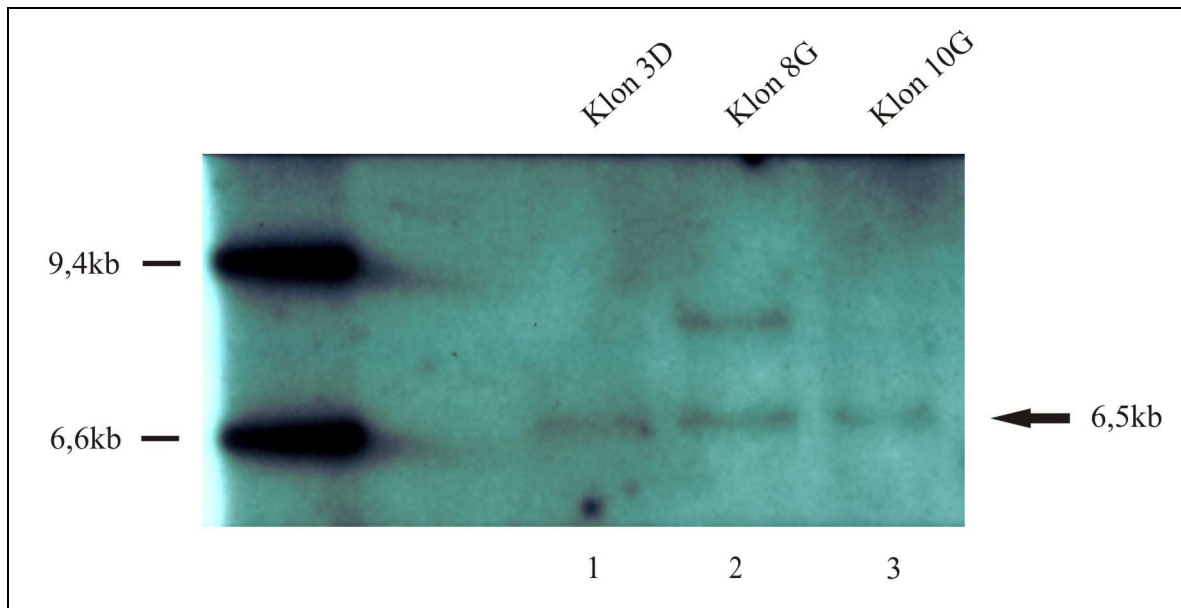


Abb. 28: Southern Blot mit einer Neo-Sonde.

Spur 1 mit Klon 3D und Spur 3 mit Klon 10G zeigen eine einzige Integration der Neomycinresistenzkassette. Klon 8G in Spur 2 weist eine mehrfache Integration der Neo-Kassette auf und kann daher nicht für die Blastozysteninjektionen verwendet werden.

3.1.3 Transferierte Blastozysten und erhaltene Maus-Chimären

Insgesamt wurden 400 ES-Zellklone nach der Transfektion und der Doppelsektion mit G418 und Gancyclovir gepickt und anschließend über PCR und Southern Blot analysiert. Bei den für die Transfektion verwendeten ES-Zellen handelt es sich um V6.5-Zellen, die ein 129/Sv-Genom besitzen, so dass eine Identifizierung der Chimäritätsrate über die Fellfarbe der Mäuse möglich ist. Die 129/Sv-Zellen besitzen das Agouti-Gen für braune Fellfarbe, welches dominant gegenüber dem wildtypischen Gen für schwarze Fellfarbe vererbt wird. Je höher der Anteil des 129/Sv-Genoms ist, desto stärker ist daher die braune Färbung bei den Chimären vertreten. Unter den gepickten Klonen befanden sich die beiden positiv getesteten Klone 3D und 10G, die jeweils eine einzige homologe Rekombination aufwiesen und in Köln am Institut für Genetik in CB20 Blastozysten injiziert werden konnten. Nach Injektion von 44 Blastozysten des Klons 3D und anschließendem Transfer in den Uterus von pseudoschwangeren Weibchen vom Stamm C57BL/6J konnten unter 12 Nachkommen 6 männliche Chimären über die braune Fellfarbe identifiziert werden. Die Chimäritätsrate betrug bei den einzelnen Tieren ca. 15, 30, 50, 70, 80 und 90%. Aus der Injektion von 37 Blastozysten des Klons 10G war unter 5 Nachkommen nur ein männliches chimäres Tier vorhanden, welches kurz nach der Geburt verstorben ist. Die sechs männlichen Chimären des Klons 3D wurden mit jeweils zwei bis drei C57BL/6J-Weibchen verpaart. Aus den Verpaarungen der Männchen hat lediglich die 15%-Chimäre von Juni 2007 bis Dezember 2007 insgesamt 52 Nachkommen produziert, die allerdings alle wildtypisch waren. Dies war

zum einen anhand der Fellfarbe erkennbar, zusätzlich wurde eine spezifische PCR mit der DNA aus den Schwanzspitzen der Mausnachkommen durchgeführt (Abb. 29).

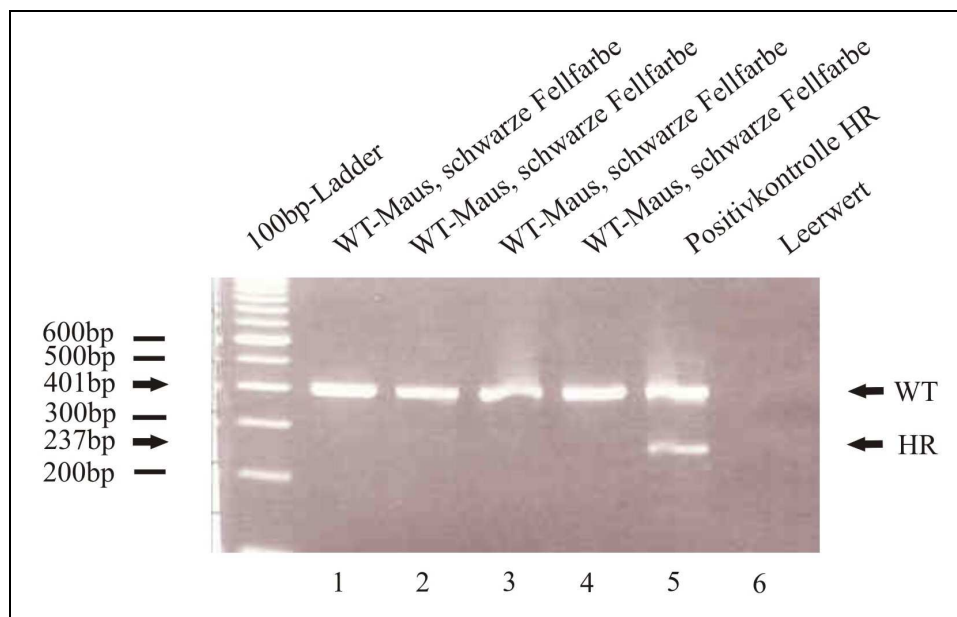


Abb. 29: Test-PCR der loxP-sites mit den Primern hR-F2 und hR-R2 zum Screenen der Nachkommen aus den Verpaarungen mit den Chimären.

In Spur 1 - 4 sind Wildtyp-Mäuse mit schwarzer Fellfarbe getestet worden. Es ist nur die wildtypische Bande von 401 bp für die loxP-site 1 zu erkennen. In Spur 5 ist DNA der verstorbenen 90% Chimäre als Positivkontrolle eingesetzt worden. Hier ist eine weitere Bande von 237 bp ist für die homologe Rekombination detektierbar. Als Standardmarker wurde eine 100 bp-Ladder verwendet. WT = Wildtyp, HR = homologe Rekombination.

Weitere Blastozysteninjektionen haben in der Schweizer Firma „PolyGene Transgenetics“ stattgefunden, nachdem die Verpaarungen der Kölner Mäuse nicht den erwünschten transgenen Nachwuchs erzeugten. Es wurden ebenfalls die Klone 3D und 10G verwendet. In zwei Injektionsrunden wurden insgesamt 70 Blastozysten in 5 Fostertiere vom Stamm C57BL/6J transferiert, allerdings wurden die meisten Nachkommen direkt nach der Geburt von den Muttertieren gefressen. Aus der zweiten Injektionsrunde haben 2 Chimären, die vom Klon 3D stammen und die jeweils eine Chimarität von etwa 20% zeigten, überlebt. Diese beiden Männchen wurden mit C57BL/6J-Weibchen verpaart. Nur eine der beiden Chimären hat Nachkommen produziert. Insgesamt sind 85 Nachkommen im Zeitraum von April 2008 bis Oktober 2008 aus der Verpaarung hervorgegangen.

Die Chimären in den folgenden Abbildungen stammen aus den Blastozysteninjektionen des Klons 3D, die am Institut für Genetik in Köln durchgeführt worden sind (Abb. 30 - 32). Die Mäuse mit 55%, 80% und 90% sind hier nicht gezeigt. Nur die Maus mit 15% Chimarität hat Nachkommen hervorgebracht. Die Mäuse mit einer Chimarität von 70 und 90% sind nach 5

bzw. 3 Monaten verstorben. Die 15%-Chimäre wurde nach einem Jahr wegen einer Krankheit getötet, die 80%-Chimäre verstarb nach 17 Monaten. Die 55%-Chimäre lebte insgesamt 19 Monate. In Abbildung 33 ist eine 20%-Chimäre aus der Blastozysteninjektion mit dem Klon 3D der Schweizer Firma Polygene zu sehen.



Abb. 30: 15%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.



Abb. 31: 30%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.



Abb. 32: 70%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1.



Abb. 33: 20%-Chimäre aus dem Klon 3D für VKORC1L1. Sie stammt aus der Blastozysteninjektion der Schweizer Firma Polygene.

Insgesamt haben von den 8 chimären männlichen Tieren, die aus zwei Blastozysteninjektionen des Klons 3D hervorgegangen waren, nur zwei insgesamt 114 Nachkommen erzeugt, die jedoch alle ein nicht-rekombinantes Wildtypgenom aufwiesen. Auffälliger Weise waren die beiden Tiere, die sich fortgepflanzt haben, diejenigen mit dem niedrigsten Chimäritätsgrad (15 bzw. 20%). Alle Tiere mit einer höheren Chimäritätsrate sind ohne Nachkommen vorzeitig verstorben. Von Klon 10G konnte in zwei Injektionsversuchen gar keine lebensfähige Chimäre erhalten werden. Da die Charakterisierung der Targeting-Konstrukte keine offenkundigen Fehler erkennen ließ (vgl. Kap. 3.1.1 und 3.1.2), wurden die verwendeten ES-Zellen mittels SKY-Analyse näher untersucht.

3.1.4 Karyotypbestimmung der injizierten ES-Zellklone mittels SKY-Analyse

Die neuentwickelte, molekular-zytogenetische Technik der spektralen Karyotypisierung nutzt eine kombinatorische Fluoreszenzmarkierung chromosomen-spezifischer Genbanken, welche die simultane und farblich differenzierte Darstellung aller Chromosomen eines Chromosomensatzes ermöglicht. Auf diese Weise können Chromosomen sehr einfach mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden karyotypisiert, diskrete Umlagerungen detektiert, komplexe Veränderungen aufgeklärt und Markerchromosomen identifiziert werden [Schröck et al., 1996; Liyanage et al., 1996]. Für die Durchführung einer SKY-Analyse sind qualitativ hochwertige Metaphase-Chromosomen in ausreichender Quantität erforderlich. Die Chromosomen werden nach Präparation über das Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (vgl. Kap. 2.2.20.4).

Da aus den Verpaarungen mit den chimären Mäusen aus Köln mit C57BL/J6-Weibchen nur eine Chimäre Nachkommen produziert hat und aus dem Klon 10G keine lebenden rekombinanten Tiere hervorgegangen sind, wurden die embryonalen Stammzellen der Klone 3D und 10G erneut in Kultur genommen und anschließend durch SKY-Analyse und durch das Spectra Cube System (Applied Spectral Imaging, Inc.) auf ihren Karyotyp untersucht [Garini et al., 1996; Melcher et al., 2000].

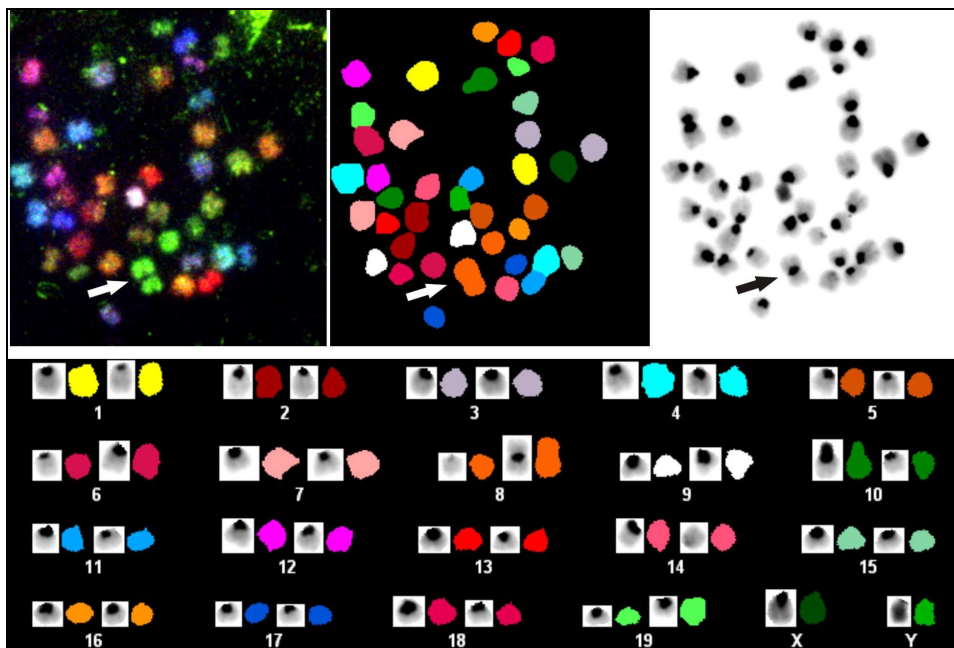


Abb. 34: Spectral Karyotyping-Analyse von Metaphasen des ES-Zellklons 3D für VKORC1L1.

Bilder der oberen Reihe von links nach rechts: RGB-Bild der Metaphase, Falschfarbenbild, DAPI-Färbung. Unteres Bild: Karyogramm mit den Chromsomen der DAPI-Färbung und dem Falschfarbenabgleich. Das Isochromosom 8 ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

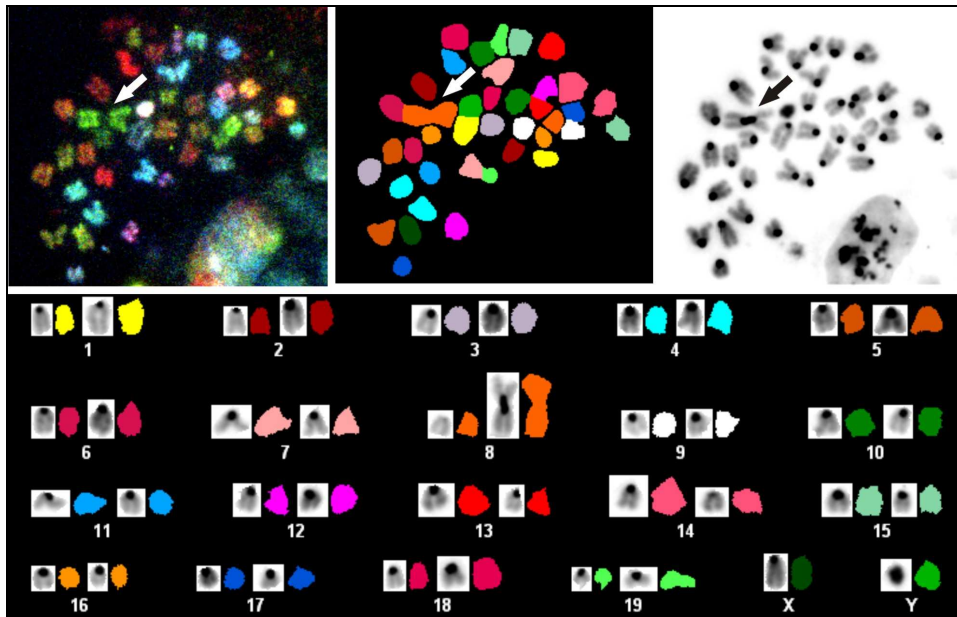


Abb. 35: Spectral Karyotyping-Analyse von Metaphasen des ES-Zellklons 10G für VKORC1L1. Bilder der oberen Reihe von links nach rechts: RGB-Bild der Metaphase, Falschfarbenbild, DAPI-Färbung. Unteres Bild: Karyogramm mit den Chromosomen der DAPI-Färbung und dem Falschfarbenabgleich. Das Isochromosom 8 ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der Spectral Karyotyping-Analyse basieren auf der Auswertung von 10 Metaphasen pro Klon. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden ein Rot-Grün-Blau-(RGB)-Bild und eine Aufnahme der DAPI (4'-6'-Diamino-2-Phenylindol)-Gegenfärbung gemacht, welche die Zuordnung der Chromosomen erleichtert. Durch die erhaltenen Karyogramme (Abb. 34 und 35) wird ersichtlich, dass in den analysierten Metaphasen jeweils 41 Chromosomen inklusive der Geschlechtschromosomen enthalten sind, dies entspricht nicht dem normalen Karyotyp der Maus mit $2n = 40$ Chromosomen. Es konnte sowohl für den Klon 3D als auch für den Klon 10G eine Trisomie des Chromosoms 8 identifiziert werden, die durch eine Translokation zweier Chromosomen 8 entstanden ist. Neben einem freien Chromosom 8 liegt zusätzlich ein Isochromosom 8 vor. Die Fusion der zwei Chromosomen am Centromer lässt sich sowohl im RGB-Bild als auch in der DAPI-Färbung gut erkennen. Die übrigen Chromosomenpaare der beiden ES-Zellklone sind strukturell unauffällig und zeigen keine abnormen Veränderungen.

3.2 Biochemische Charakterisierung des VKORC1L1-Proteins

Das VKORC1L1-Protein ist bisher biochemisch nicht näher charakterisiert worden. Es ist weder die physiologische katalytische Reaktion noch der Stoffwechselweg bekannt, an dem das Protein beteiligt ist. Als erster Schritt der Charakterisierung wurde daher das Expressionsprofil anhand eines Northern-Blots untersucht.

3.2.1 Northern Blot

Für den Northern Blot wurde eine Membran mit mRNA aus verschiedenen Geweben der Maus (nummeriert mit 1 - 8 in Abb. 36) von Stratagene mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde für VKORC1L1 hybridisiert. Die Membran enthielt mRNA von folgenden Geweben: Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskel, Milz und Testes. Als Expressions- und Ladekontrolle wurde dieselbe Membran anschließend mit einer β -Actin-Sonde hybridisiert. β -Actin gilt als Haushaltsgen mit einer weitgehend gleichförmigen Expression in allen Gewebetypen. Ist das β -Actin-Signal für einen Gewebetyp sehr stark, befindet sich im Verhältnis zu den anderen Proben mehr mRNA auf der Membran. Die Bande für das β -Actin erscheint bei einer Größe von 1,9 kb (Abb. 37). Die zusätzliche untere Bande repräsentiert das α -Actin mit 1,46 kb. Die β -Actin-Sonde bindet auch an die α -Actin-Form. Da α -Actin im Herz- und Skelettmuskel vorhanden sind, zeigen diese Gewebe im Northern Blot mit der β -Actin-Sonde ein deutliches Signal bei 1,46 kb.

Auf dem entwickelten Röntgenfilm, der mit der VKORC1L1-cDNA-Sonde hybridisiert wurde, entspricht die unterste Bande mit einer Größe von 1,1 kb der VKORC1L1-mRNA. Diese Bande ist in allen untersuchten Geweben sichtbar (Abb. 36). Des Weiteren tauchen bei einer Größe von etwa 4 kb und 5,5 kb zusätzliche Banden auf, welche die gleiche Expressionsstärke wie die jeweilige Bande für die VKORC1L1-mRNA besitzen. Diese Banden wurden bisher nicht näher charakterisiert. Etwas stärker ist das VKORC1L1-Gen in Gehirn und Leber (Spur 1 und 4) exprimiert. Die Testes (Spur 8) zeigen ebenfalls eine starke Expressionsrate im Vergleich zu den übrigen Geweben.

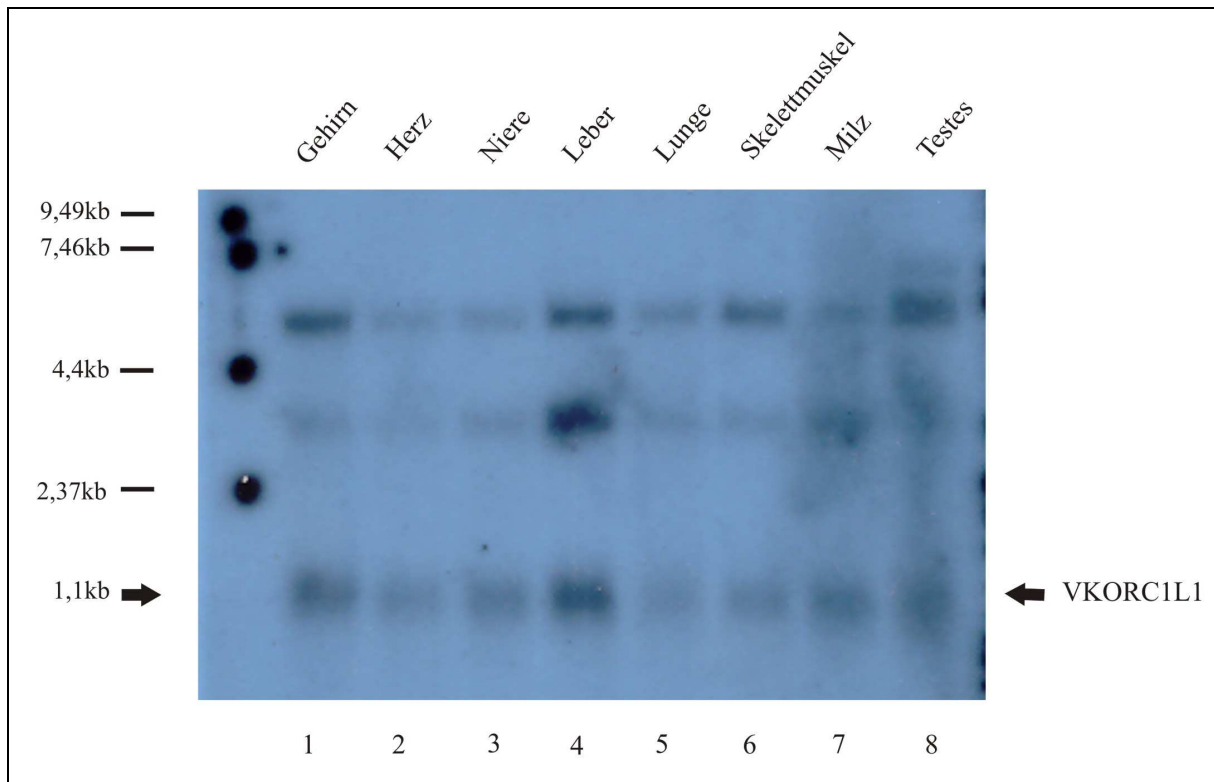


Abb. 36: mVKORC1L1-cDNA-Sonde.

Für den Northern Blot wurden Gewebe der Maus aus Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskel, Milz und Testes verwendet. Die mRNA von mVKORC1L1 ist als 1,1 kb Bande sichtbar. Zusätzlich erscheinen noch zwei weitere Banden mit Größen von 4 und 5,5 kb.

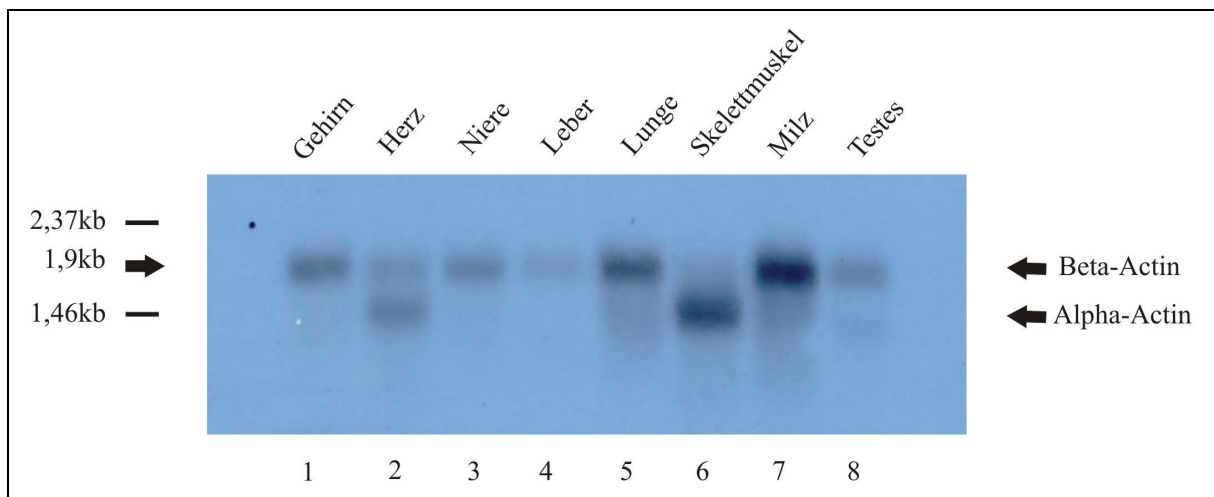


Abb. 37: β -Actin cDNA-Sonde zur Expressionskontrolle.

Zur Expressionskontrolle wurde der verwendete Blot mit einer β -Actin cDNA-Sonde gelabelt. Als 1,9 kb-Bande ist das β -Actin sichtbar, die untere Bande von 1,46 kb repräsentiert die α -Actin-Form, welche auch von der Sonde erkannt wird. α -Actin ist vor allem im Herz- und Skelettmuskel zu finden.

Ähnlich wie das paraloge Gen VKORC1, zeigt VKORC1L1 ein breites Expressionprofil ohne deutliche Bevorzugung oder Aussparung eines Gewebetyps. Aus dem Northern-Blot können daher wenige Rückschlüsse auf eine mögliche gewebespezifische Expression gezogen werden. Lediglich in der Leber ist die Expression erhöht.

3.2.2 Messung der enzymatischen Aktivität von VKORC1L1 mit Vitamin K₂-2,3-Epoxid als Substrat

Da das paraloge Gen VKORC1 als Oxido-Reduktase des Vitamin K-2,3-Epoxids fungiert und beide Gene eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (vgl. Kap.1.1.5 und 1.3), lag es nahe, die Funktion des VKORC1L1 in diesem Stoffwechselweg zu testen. Die beiden Reduktionsschritte, die VKORC1 katalysieren kann (vgl. Abb. 6), können durch Cumarinderivate, z.B. Warfarin, gehemmt werden. Darauf basiert die Verwendung dieser Substanzgruppe für die Antikoagulation in der Therapie und Prophylaxe humaner Thromboembolien ebenso wie der Einsatz als Rodentizide. Mutationen in VKORC1 sind als die genetische Grundlage für die Resistenzentwicklung gegenüber Cumarinen bei Menschen, Ratten und Mäusen beschrieben worden (vgl. Kap. 1.1.10 und 1.1.11). Für das hier untersuchte Protein VKORC1L1 liegen entsprechende Untersuchungen bisher nicht vor, da dessen physiologische Rolle bisher nicht bekannt ist.

3.2.3 Quantifizierung der VKOR-Reaktionsprodukte

Zur Quantifizierung des enzymatischen Umsatzes von Vitamin K-2,3-Epoxid musste zunächst eine quantitative Bestimmung der Produktmenge vorgenommen werden. Für die Chinoneichgerade wurden Messungen an der HPLC mit verschiedenen Chinonkonzentrationen durchgeführt. Mit dem sich ergebenden Wert von 0,0967 für die Steigung der Eichgeraden wurden die folgenden Berechnungen durchgeführt. Um die Stoffmenge Chinon in nmol pro mg Protein bestimmen zu können, ist es zunächst notwendig, die molare Chinonkonzentration zu ermitteln. Dazu lässt sich über die Formel für Geraden $x = y / m$ die Chinonkonzentration (x) aus dem Quotienten der gemessenen Chinon-HPLC-Fläche (y) und der Steigung der Chinoneichgeraden (m) errechnen.

$$\text{Chinonkonz. } c \text{ (}\mu\text{M)} = \text{Chinon-HPLC-Fläche} / 0,0967$$

Die Chinonstoffmenge n in Mol wird über die Beziehung $n = c \cdot V$ ermittelt, wobei c die errechnete Chinonkonzentration und V das eingesetzte Volumen des Reaktionsansatzes (500 μ l) darstellt.

3.2.4 Berechnung der Enzymaktivität

Um zu berechnen wie viel Prozent des eingesetzten Vitamin K-Epoxids durch die VKOR in Vitamin K-Chinon umgesetzt wurde, wird die gemessene HPLC-Chinonfläche ins Verhältnis zur Chinon- und Epoxidfläche gesetzt. Dabei wurde die Konzentration an Epoxid bei allen Experimenten dieser Serie konstant bei 10 µM gehalten.

$$\text{Aktivität [\%]} = \frac{\text{Chinon(HPLC - Fläche)}}{\text{Chinon(HPLC - Fläche)} + \text{Epoxid(HPLC - Fläche)}}$$

Über die relative Aktivität des Enzyms lässt sich berechnen, in welchem Verhältnis der Umsatz der mutierten VKOR-Proteine bzw. der Umsatz der VKOR aus unterschiedlichen Spezies zum Umsatz der Wildtyp-VKOR ohne Warfarin steht. Dabei wird die Aktivität des Wildtyps in Abwesenheit von Warfarin auf 100% normiert, und die anderen Ergebnisse werden dazu ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Relative Aktivität [\%]} = (\text{Aktivität} / \text{Aktivität des Wildtyps ohne Warfarin}) * 100$$

Bei der spezifischen Aktivität wird die gebildete Chinonmenge auf die jeweilige Proteingesamtmenge der Probe bezogen. Sie wird wie folgt berechnet:

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

3.2.5 Bestimmung der enzymatischen Reaktionskonstanten von VKORC1L1

Neben den VKORC1L1-Wildtyp-Proteinen der Spezies Maus und Ratte wurde auch das VKORC1-Protein der Stachelmaus (*Acomys spec.*) im enzymatischen Assay untersucht, da Stachelmäuse eine natürliche Resistenz gegen Warfarin haben sollen (vgl. Kap. 1.1.12).

Für die Aktivitätsmessung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden die VKORC1L1-Gene der verschiedenen Spezies in den pCep4-Vektor eingebracht, die Anfangs-PCR für die Klonierung erfolgte mit den entsprechenden Primern und der bereits vorhandenen cDNA von Maus und Ratte. Die cDNA der Stachelmaus (*Acomys*) wurde über mRNA-Isolation und cDNA-Synthese selbst hergestellt und sequenziert, da das Genom noch nicht veröffentlicht und bekannt ist. Die klonierten Vektoren wurden in *E.coli*-Bakterien transformiert und die erhaltenen Klone über Sequenzierung auf das gewünschte Plasmid

überprüft. Die richtige Plasmid-DNA wurde aus dem entsprechenden Bakterienklon isoliert und über Transfektion in HEK-293-EBNA-Zellen eingebracht, die das mutierte Protein exprimierten. Nach dem Ernten und Lysieren der Zellen erfolgten der VKOR-Aktivitätsassay und die Proteinkonzentrationsbestimmung. Die Messungen des Assays wurden mit Vitamin K₂-Epoxid durchgeführt, da die Basisaktivität des rekombinanten Proteins höher als bei Vitamin K₁-Epoxid ist. Das Vitamin K₂-Epoxid wird in den Konzentrationen von 0,5 bis 254 µM zugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde der Assay mit einem Isopropanol-Hexangemisch abgestoppt. Vitamin K₂-Epoxid und das Produkt der Enzymreaktion Vitamin K₂-Chinon konnten über eine HPLC-Säule aufgetrennt und quantifiziert werden. Die spezifische Aktivität wurde gegen die unterschiedlichen Vitamin K₂-Epoxidkonzentrationen aufgetragen, und mit Hilfe Computer-Software KaleidaGraph wurden die Werte für K_M und V_{max} für das VKORC1L1 der unterschiedlichen Spezies berechnet.

3.2.6 Kinetiken verschiedener Spezies – Berechnung von K_M und V_{max}

Für die Berechnung von K_M und V_{max} wurde die Computer-Software KaleidaGraph hinzu gezogen. Es ergaben sich die folgenden Werte für die untersuchten Spezies:

	V _{max}	K _M
hVKORC1L1 (hL1)	0,231	0,933
m VKORC1L1 (mL1)	0,267	0,897
r VKORC1L1 (rL1)	0,247	0,961
m VKORC1 (mC1)	0,141	0,871
r VKORC1 (rC1)	0,161	0,897
aVKORC1 (aC1)	0,200	0,781

Tab. 21: Errechnete Werte für V_{max} und K_M für die Proteine VKORC1L1 und VKORC1 zum Vergleich.

Die errechneten Werte für V_{max} und K_M sind in den Abbildungen 38 und 39 nochmals graphisch zusammengefasst. Dabei lassen sich keine wirklich großen Unterschiede zwischen den Spezies feststellen. Für die VKORC1L1-Werte der Maximalgeschwindigkeit V_{max} lässt sich feststellen, dass sie insgesamt über den VKORC1-Werten liegen. Dabei erreicht das mVKORC1L1 den höchsten Wert von 0,267, gefolgt von rVKORC1L1 mit 0,247 und hVKORC1L1 mit 0,231. Unter den VKORC1-Proteinen zeigt die *Acomys* die höchste V_{max} mit 0,2 und die Maus die niedrigste Maximalgeschwindigkeit mit 0,141. Der Wert des rVKORC1 liegt mit 0,161 zwischen diesen beiden.

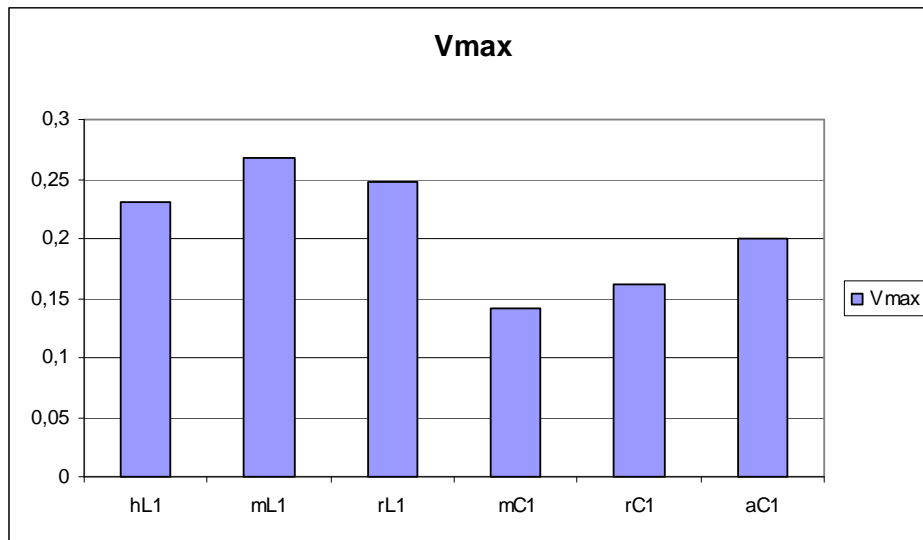


Abb. 38: Vergleich von V_{max} .
 hL1=humanes VKORC1L1, mL1=VKORC1L1 der Maus, rL1=VKORC1L1 der Ratte,
 mC1=VKORC1 der Maus, rC1=VKORC1 der Ratte, aC1=VKORC1 der Stachelmaus

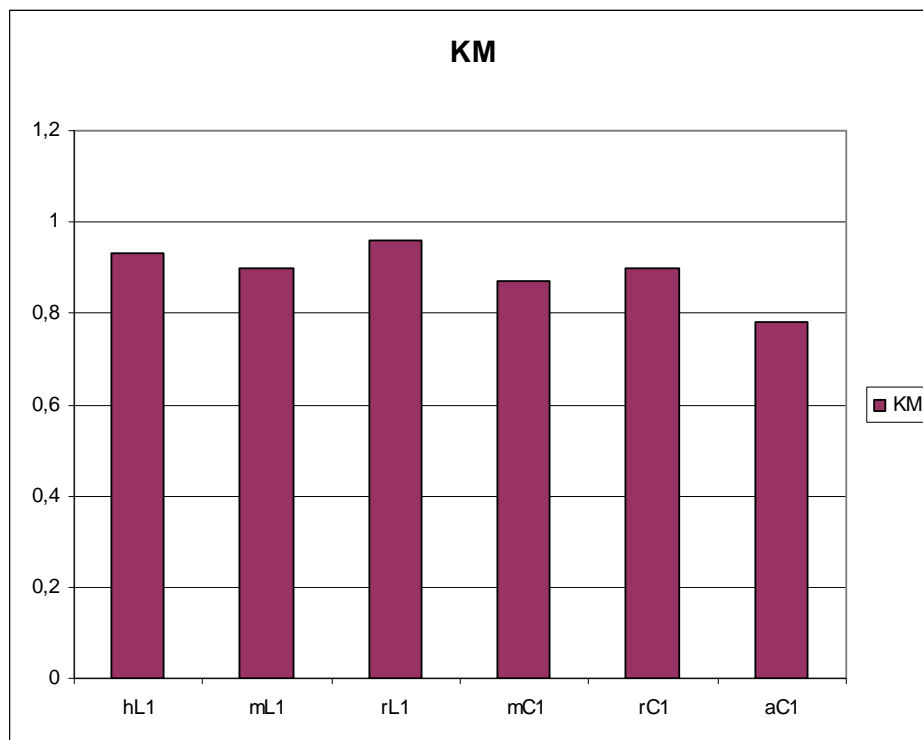


Abb. 39: Vergleich von K_M .
 hL1=humanes VKORC1L1, mL1=VKORC1L1 der Maus, rL1=VKORC1L1 der Ratte,
 mC1=VKORC1 der Maus, rC1=VKORC1 der Ratte, aC1=VKORC1 der Stachelmaus

Die K_M -Werte von VKORC1L1 und VKORC1 schwanken bei den Spezies zwischen 0,897 und 0,961 und weisen daher keine deutlich großen Unterschiede untereinander auf. Das VKORC1L1-Protein der Maus besitzt einen Wert für die Michaelis-Menten-Konstante von 0,897, gefolgt von dem humanen VKORC1L1 mit 0,933. Der höchste K_M des L1-Proteins konnte für die Ratte mit 0,961 bestimmt werden. Die Werte der Michaelis-Menten-

Konstanten für das VKORC1 liegen so wie auch die V_{\max} -Werte des C1 unter denen des VKORC1L1. Dabei weist die Stachelmaus für das VKORC1-Protein den kleinsten Wert mit 0,781 auf. Das VKORC1 der Ratte und das VKORC1L1 der Maus haben den gleichen K_M -Wert von 0,897. Unter den C1-Proteinen ist dieser Wert der höchste gemessene. Der Michaelis-Menten-Konstante von 0,871 für die Maus liegt zwischen denen von Stachelmaus und Ratte.

3.2.7 *In vitro* Mutagenese des hVKORC1L1-Proteins

Wie oben beschrieben, ist die Empfindlichkeit des paralogen VKORC1-Proteins gegenüber Warfarin von großer medizinischer Relevanz. Natürlich entstandene Mutationen dieses Proteins verleihen der VKOR-Reaktion eine partielle oder vollständige Warfarin-Resistenz. Nachdem die kinetischen Parameter von VKORC1 und dem hier untersuchten VKORC1L1 sich weitgehend ähnlich sind, sollte daher untersucht werden, ob sich die aus VKORC1 bekannten Mutationen in das L1-Protein projizieren lassen und dort dieselben Resistenzphänomene hervorrufen.

Die Mutagenese-Experimente wurden mit der humanen cDNA des VKORC1L1-Gens durchgeführt. Neben der Basisaktivität der mutanten Proteine wurde jeweils auch die Inhibition des VKORC1L1-Proteins durch Warfarin untersucht (Abb. 40 - 42). Für die Warfarinmessung wurden zum einen das wildtypische humane VKORC1L1-Protein und zum anderen fünf Mutationen (Y146C, Y146F, V36L, R65G, L135R) untersucht, die Resistenzmutationen im VKORC1-Gen (Y139C, Y139F, V29L, R58G, L128R) entsprechen. Die Mutationen wurden über *in vitro* Mutagenese in das pCep4-hVKORC1L1-Vektorkonstrukt eingefügt. Die klonierten Vektoren wurden in *E.coli*-Bakterien transformiert und die erhaltenen Klone über Sequenzierung auf das gewünschte Plasmid überprüft. Die richtige Plasmid-DNA wurde aus dem entsprechenden Bakterienklon isoliert und über Transfektion in HEK-293-EBNA-Zellen eingebracht, die das mutierte Protein exprimierten. Nach dem Ernten und Lysieren der Zellen erfolgten der VKOR-Aktivitätsassay und die Proteinkonzentrationsbestimmung. Im Assay wurden für den Wildtyp und die Mutationen jeweils unterschiedliche Warfarinkonzentrationen (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM) bei gleich bleibender Vitamin K_2 -Epoxid Konzentration (8 μM) zum Zelllysat zugegeben. Die Messungen wurden mit Vitamin K_2 -Epoxid durchgeführt, da die Basisaktivität der Proben höher als bei Vitamin K_1 -Epoxid ist. Nach einstündiger Inkubation wurde der Assay mit einem Isopropanol-Hexangemisch abgestoppt. Vitamin K_2 -Epoxid und das Produkt der

Enzymreaktion Vitamin K₂-Chinon konnten über eine HPLC-Säule aufgetrennt und quantifiziert werden. Alle Messwerte wurden aus drei unabhängigen Transfektionen ermittelt, wie im Folgenden beschrieben, ausgewertet und die spezifische Aktivität gegen die Warfarinkonzentration aufgetragen. Für den Wildtyp der Spezies Maus, Ratte und Stachelmaus wurde das VKORC1L1-Protein ebenfalls im Aktivitätsassay in Anwesenheit von Warfarin untersucht (Abb. 43).

3.2.8 Warfarinhemmstudien für das hVKORC1L1-Protein und die eingeführten Mutationen

In den folgenden Diagrammen ist die spezifische Aktivität des Wildtyps und der untersuchten Mutationen [in nmol/mg Protein] gegen die eingesetzte Warfarinkonzentration aufgetragen. Die Abbildung 40 zeigt zur Übersicht alle gemessenen Werte. In den beiden weiteren Diagrammen (Abb. 41 und 42) sind die Messungen separat mit Standardabweichung, die aus Übersichtsgründen nur nach oben eingezeichnet wurde, abgebildet.

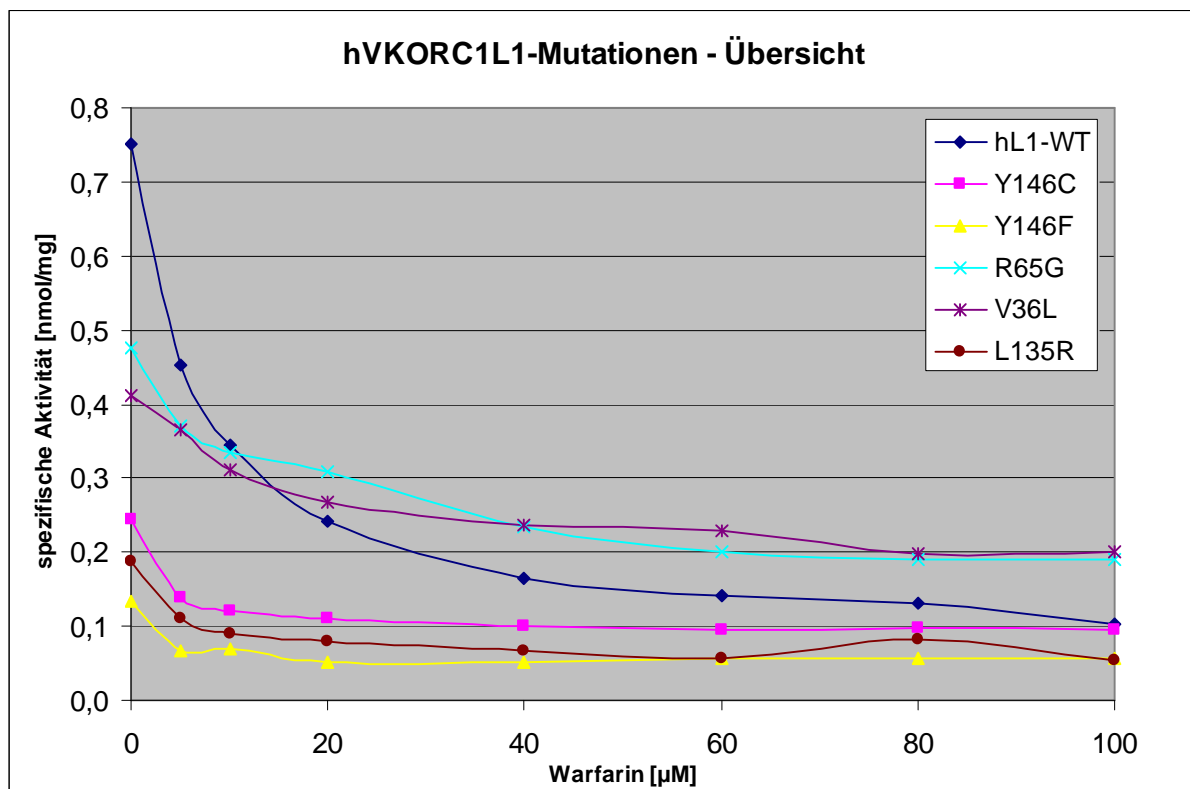


Abb. 40: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der hVKORC1L1-Mutationen Y146C, Y146F, R65G, V36L und L135R sowie des Wildtyps.

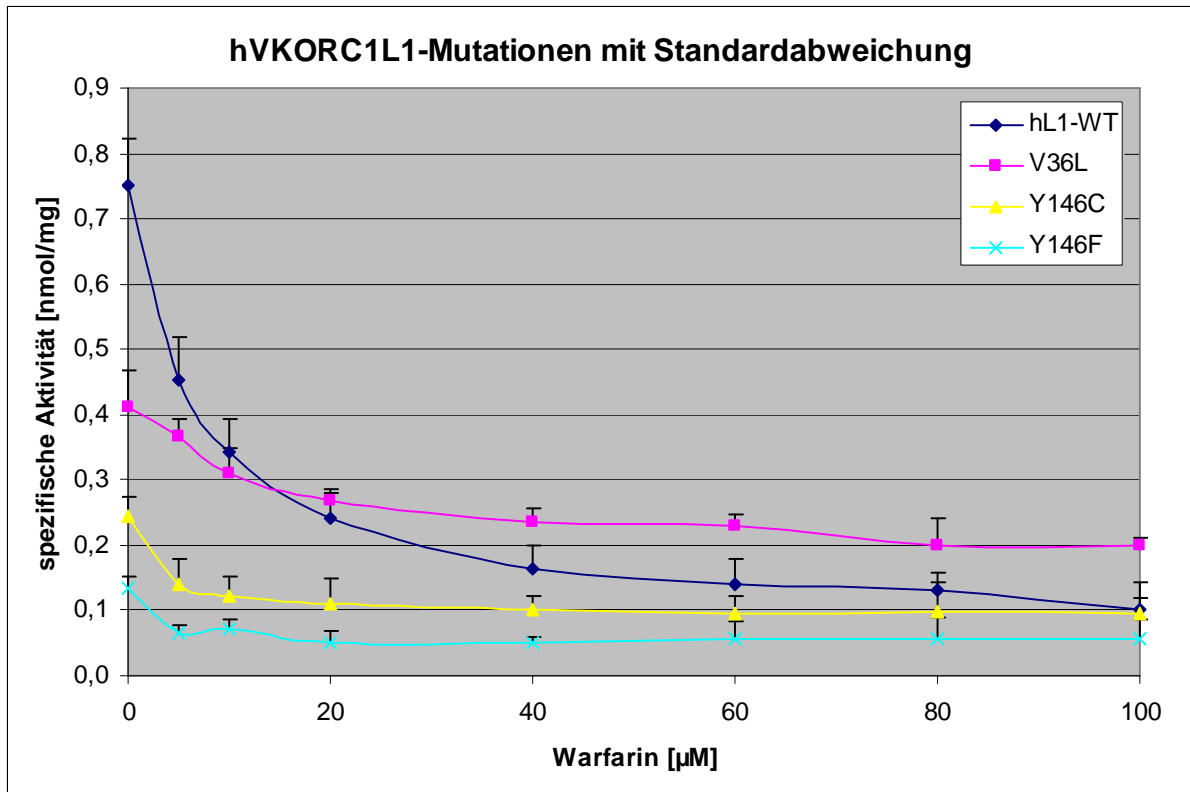


Abb. 41: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der hVKORC1L1-Mutationen Y146C, Y146F und V36L sowie des Wildtyps.

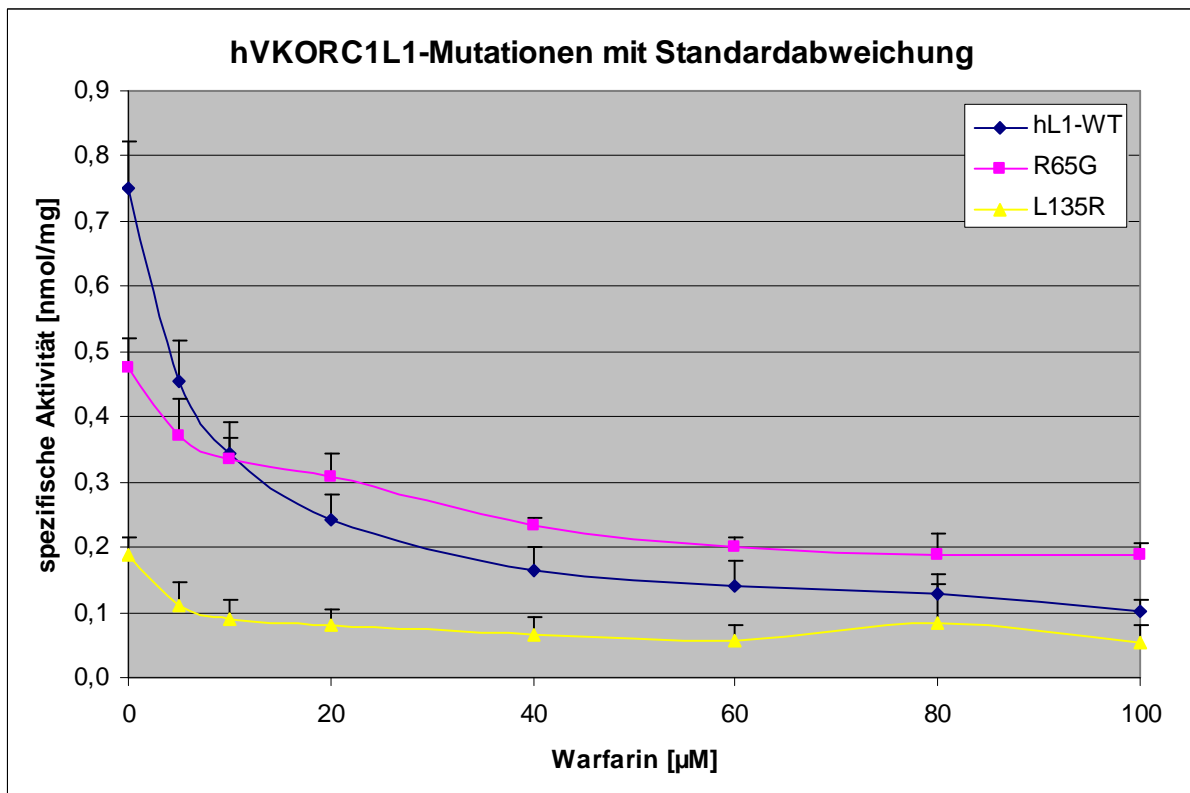


Abb. 42: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der hVKORC1L1-Mutationen R65G und L135R sowie des Wildtyps.

Die Ausgangsaktivität des hVKORC1L1-Wildtyps ist mit einer spezifischen Aktivität von 0,75 nmol/mg am höchsten, gefolgt von der Mutation R65G mit knapp 0,5 nmol/mg und V36L mit 0,4 nmol/mg. Die Mutationen Y146C, Y146F und L135R weisen dagegen eine deutlich niedrigere Aktivität auf, die sich im Bereich zwischen 0,1 und 0,25 nmol/mg befindet. Der Wildtyp lässt sich mit 100 μ M Warfarin auf eine spezifische Aktivität von 0,1 nmol/mg hemmen, und bereits mit 10 μ M Warfarin kann die Aktivität auf die Hälfte des Ausgangswerts erniedrigt werden. Die Mutationen R65G und V36L zeigen eine gewisse Resistenz gegen Warfarin. Ihre Aktivität bleibt bei Anwesenheit von Warfarin trotz niedrigerer Ausgangsaktivität über der des Wildtyps. Sie werden zudem bei höchster Warfarinkonzentration nur auf etwa die Hälfte des Ursprungswerts gehemmt. Die spezifische Aktivität der übrigen drei Mutationen Y146C, Y146F und L135R wird mit Warfarin bei einer Konzentration von 100 μ M auf 0,1 bzw. 0,05 nmol/mg gehemmt. Die Hemmkurven befinden sich damit unter der des Wildtyps.

3.2.9 Warfarinhemmung für verschiedene Spezies

Des Weiteren wurde die Aktivität des VKORC1L1-Proteins für die Maus und die Ratte in Anwesenheit von unterschiedlichen Warfarinkonzentrationen gemessen. Ebenso wurde das VKORC1-Protein der Stachelmaus (*Acomys*) untersucht, da natürliche Resistenzen für sie beschrieben wurden, welche auf molekularer Ebene allerdings noch nicht untersucht worden sind. Als Vergleichswert wurde das humane VKORC1L1-Protein herangezogen.

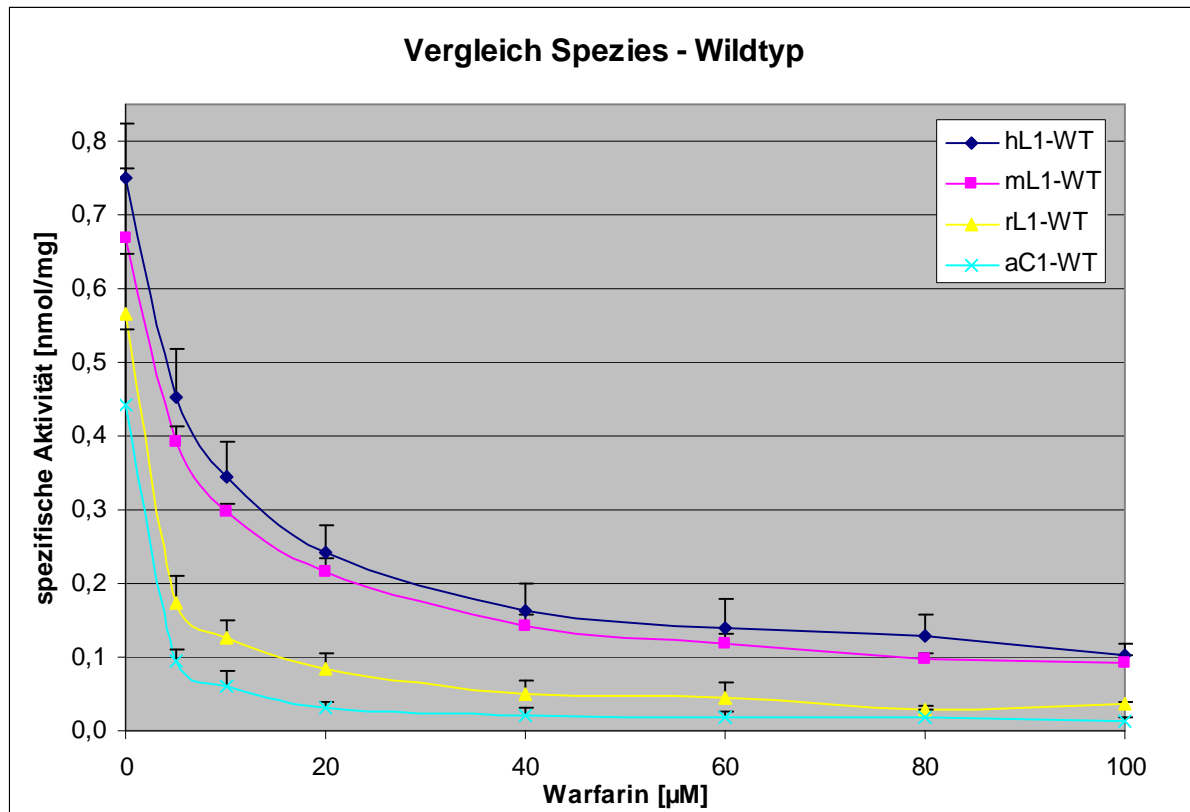


Abb. 43: Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Warfarin der VKOR-Proteine verschiedener Spezies. hL1=humanes VKORC1L1, mL1=VKORC1L1 der Maus, rL1=VKORC1L1 der Ratte, aC1=VKORC1 der Stachelmaus.

Das hVKORC1L1-Protein besitzt die höchste Ausgangsaktivität mit 0,75 nmol/mg, es folgen das mVKORC1L1 mit knapp 0,7 nmol/mg und das rVKORC1L1 mit etwa 0,65 nmol/mg. Das VKORC1-Protein von *Acomys* erreicht eine Aktivität in Abwesenheit von Warfarin von etwa 0,45 nmol/mg. Es lässt sich in allen drei Spezies für das Wildtypprotein keine Warfarinresistenz nachweisen. Das jeweilige Protein lässt sich gut hemmen, die Werte für die spezifische Aktivität liegen bei einer Konzentration von 100 µM Warfarin zwischen 0 und 0,1 nmol/mg.

3.3 Bioinformatische Analysen des VKORC1L1-Proteins

Mit Hilfe von speziellen computergestützten Programmen lassen sich für Sequenzen von Genen und Proteinen Aussagen über ihre Homologie untereinander treffen. Weiterhin können mit ihnen strukturelle Eigenschaften und funktionelle Bereiche von Proteinen erkannt und verglichen werden. Das VKORC1L1-Protein wird in den folgenden bioinformatischen Untersuchungen im Vergleich zum homologen VKORC1-Protein betrachtet, um so Unterschiede und Gemeinsamkeiten aufzuspüren.

3.3.1 Multiple Alignments und evolutiver Stammbaum

Für die Untersuchung des Konservierungsgrades der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine VKORC1 und VKORC1L1 in verschiedenen Spezies wurde ein Multiple Alignment mit den entsprechenden Sequenzen aus der Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) und dem Programm Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>) durchgeführt (Abb. 44) [Corpet, 1988]. Aminosäuren, die sich evolutiv nicht verändert haben und in den Spezies hoch konserviert sind, sind rot markiert. Die Positionen, welche blau gekennzeichnet sind, markieren Aminosäuren, die sich in vielen Spezies erhalten haben aber keine so starke Konservierung aufweisen. Das VKORC1 von Maus, Ratte und Mensch weist eine Identität von etwa 85% auf, das VKORC1L1 zwischen diesen Spezies ist bis zu 97% identisch. Die beiden Proteine sind zu etwa 50% zueinander homolog.

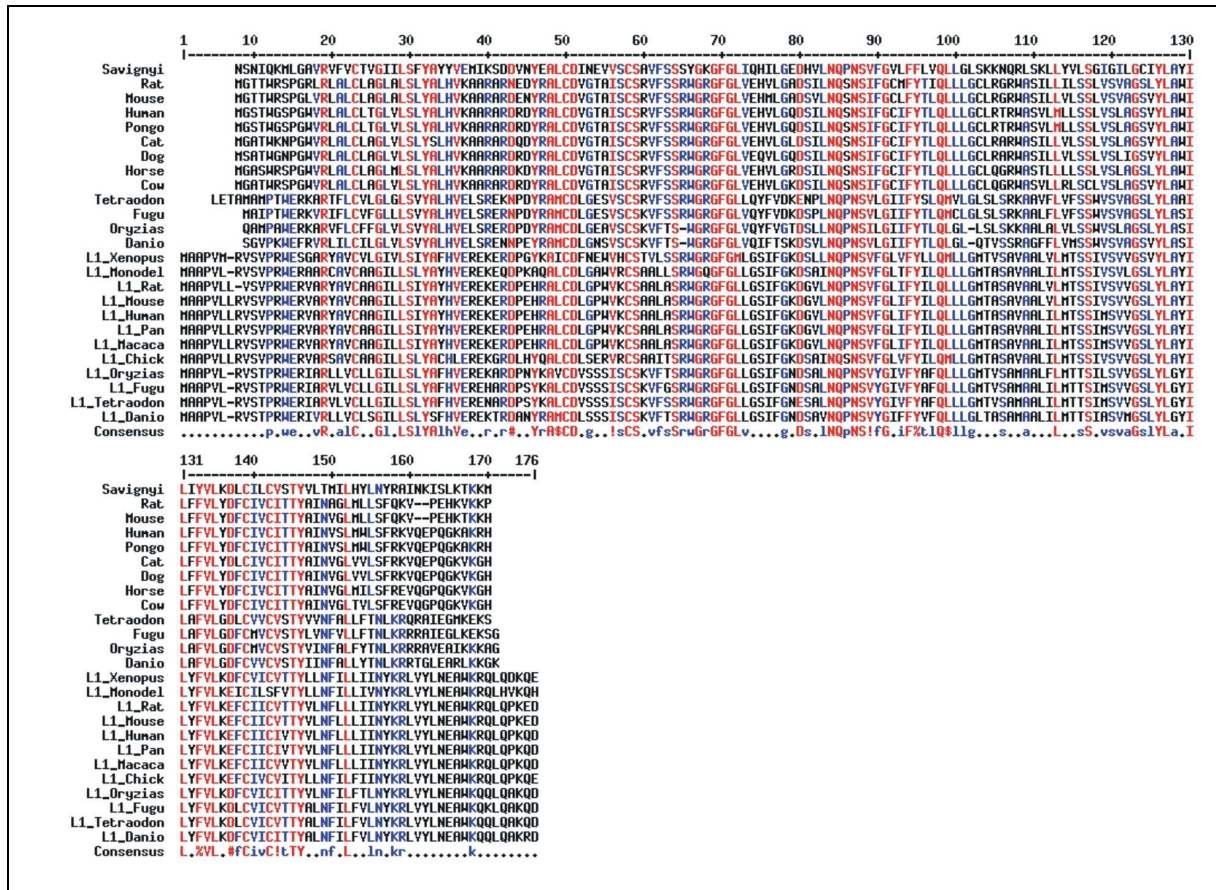


Abb. 44: Multiple Alignment der Aminosäuresequenzen des VKORC1- und VKORC1L1-Proteins verschiedener Spezies mit Hilfe des Multalign-Programms. Das VKORC1L1-Protein ist mit L1 vor der Speziesbezeichnung gekennzeichnet. Bei allen übrigen Aminosäuresequenzen handelt es sich um das VKORC1. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Die hoch konservierten Aminosäuren sind in rot markiert.

Aus Sequenzvergleichen der VKORC1- und VKORC1L1-Proteine verschiedener Spezies wurde weiterhin ein evolutiver Stammbaum erstellt, um zu klären, wann die beiden Proteine im Lauf der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entstanden sind. Der phylogenetische Baum wurde mit *proml* des PHYLIP-Programms (Phylogeny Inference Package) kalkuliert [Felsenstein 1989, 2005]. Einige Sequenzen mussten durch *codeml* des PAML-Programms (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) rekonstruiert werden [Yang 1997, 2007]. Als ursprünglichste eukaryotische Spezies mit einer verfügbaren Sequenz wurde die Seescheide *Ciona savignyi* für die Analysen herangezogen. Weiterhin wurden Sequenzen verschiedener Fischarten wie *Tetraodon*, *Fugu*, *Oryzias* und *Danio* sowie zahlreicher Vertebraten verwendet. Für das VKORC1-Protein des Krallenfrosches *Xenopus* konnte die Sequenz aus den Datenbanken nicht für die Berechnungen verwendet werden, da ein Einschub von zusätzlichen Sequenzabschnitten im Gen vorliegt. Dies könnte allerdings auf Fehler während des Sequenzierungsprozesses zurückzuführen sein. So lässt sich leider keine Analyse für die Proteine bei einem Amphibium als Übergangsglied vom Wasser- zum

Landleben erstellen. Für Bakterien konnten keine separaten Sequenzen für das VKORC1 und VKORC1L1 ermittelt werden, sie besitzen ein VKOR-ähnliches Protein, welches das gemeinsame Vorläuferprotein von VKORC1 und VKORC1L1 sein könnte. Beispielhaft wurde in der Abbildung 45 für die evolutive Entwicklung der Aminosäuresequenz die vermutete Warfarinbindungsstelle, das TYA-Motiv, eingezeichnet.

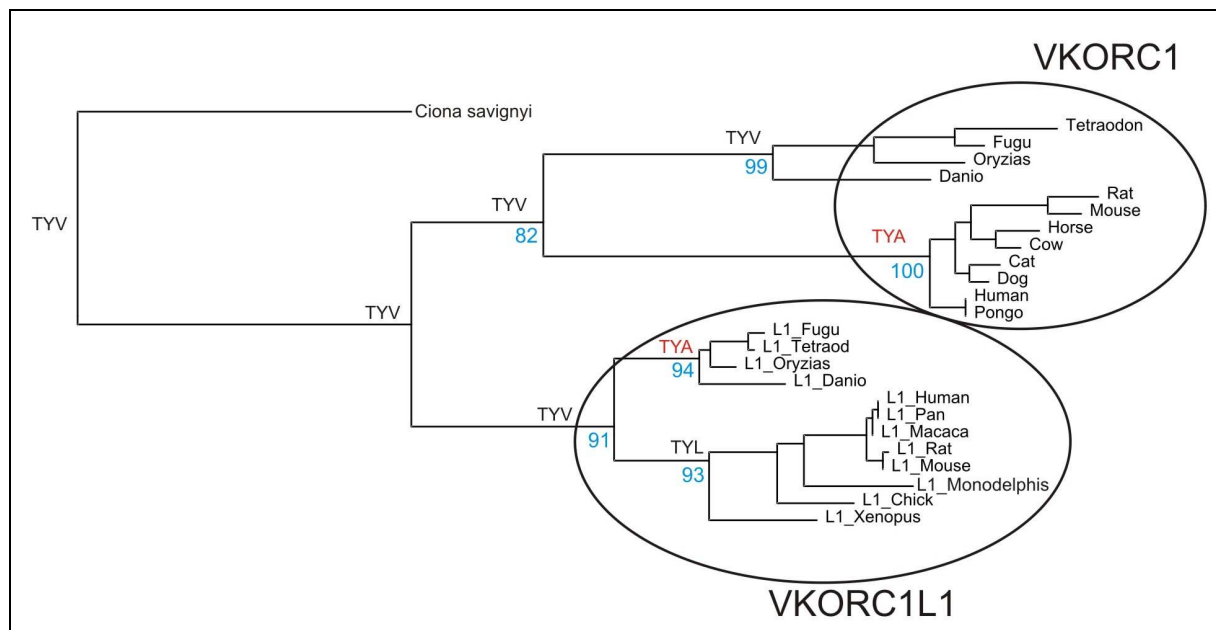


Abb. 45: Evolutiver Stammbaum für die VKORC1- und VKORC1L1-Proteine. Als Ein-Buchstaben-Code sind die Aminosäuren des angenommenen Warfarinbindungszentrums als Beispiel angegeben (TYV, TYL, TYA). Die blauen Zahlen an den jeweiligen Verzweigungen des Stammbaums sind die Scores für den Konservierungsgrad der Proteine. Die Spezies sind mit den lateinischen oder englischen Namen benannt. *Ciona savignyi* = Seescheide, *Tetraodon* = Kugelfisch, *Fugu* = Kugelfisch, *Oryzias* = Reisfisch, *Danio* = Zebrafisch, Human = Mensch, *Pan* = Schimpanse, *Macaca* = Rhesusaffe, Rat = Ratte, Mouse = Maus, *Monodelphis* = Spitzmausbeutelratte, *Pongo* = Orang-Utan, Cow = Rind, Cat = Katze, Dog = Hund, Horse = Pferd, Chick = Huhn, *Xenopus* = Krallenfrosch.

Der evolutive Stammbaum der VKOR-Proteine lässt erkennen, dass sich die VKORC1-Proteine und die VKORC1L1-Proteine aller rezenten Vertebraten in zwei getrennte Familien einordnen lassen und dass *Ciona savignyi* außerhalb dieser beiden Gruppen liegt. Die Proteine zeigen einen sehr hohen Konservierungsgrad, welcher an den Verzweigungen des phylogenetischen Baums zwischen 80 und 100% liegt (blaue Zahlen in Abb. 45). Der Stammbaum legt weiterhin nahe, dass das VKORC1 und das VKORC1L1 aus einer Duplikation eines Vorläuferproteins hervorgegangen sein müssen und dass die Aufspaltung der beiden Proteine mit der Entstehung der Vertebraten im Kambrium vor 542 bis 488 Millionen Jahren einher geht. Auffällig in diesem Stammbaum ist die Position der Fische. Sie zeigen für das VKORC1 und das VKORC1L1 jeweils eine Sonderstellung innerhalb der jeweiligen Proteingruppe. Interessanterweise ähnelt das VKORC1 der Fische an mehreren

Aminosäurepositionen der Sequenz der VKORC1L1-Proteine, obwohl es insgesamt ganz eindeutig der VKORC1-Gruppe zugeordnet werden kann. Das TYV-Motiv verändert sich beispielsweise neben anderen Aminosäurebereichen nach Trennung des VKORC1 und des VKORC1L1. Innerhalb der VKORC1-Gruppe zeigen die Vertebraten die Aminosäuresequenz TYA, bei den Fischen bleibt das TYV-Motiv bestehen. In den VKORC1L1-Proteinen findet eine Veränderung dieser Sequenz erst etwas später statt. Die Vertebraten entwickeln dabei das TYL-Motiv, die Fische weisen die TYA-Sequenz auf. Ein weiteres Beispiel ist die konservierte Aminosäureabfolge EHVL an der Position 67 – 70 im VKORC1-Protein, wohingegen für die L1-Gruppe ein GSIF-Motiv zu finden ist. Im Gegensatz dazu besitzen die Fische - bis auf *Danio* mit QIFT – an dieser Stelle eine QYFV-Abfolge für das C1-Protein.

3.3.2 Ein Proteinmodell für das VKORC1L1-Protein

Aus dem Vergleich zwischen der Aminosäuresequenz des VKORC1 und des VKORC1L1 wurden diejenigen konservierten Positionen im VKORC1L1-Protein ermittelt, welche vom VKORC1 abweichen und damit spezifisch für das VKORC1L1 sind. Weiterhin konnten Aminosäuren identifiziert werden, die spezifisch für das VKORC1 der Fische und das VKORC1L1-Protein sind. In der folgenden Abbildung (Abb. 46) sind diese konservierten Positionen farblich kenntlich gemacht und die veränderten Aminosäuren aufgeführt. Für die Abbildung wurde das Proteinmodell für das VKORC1 hinzu gezogen [Tie et al., 2005; vgl. auch Kap. 1.1.6].

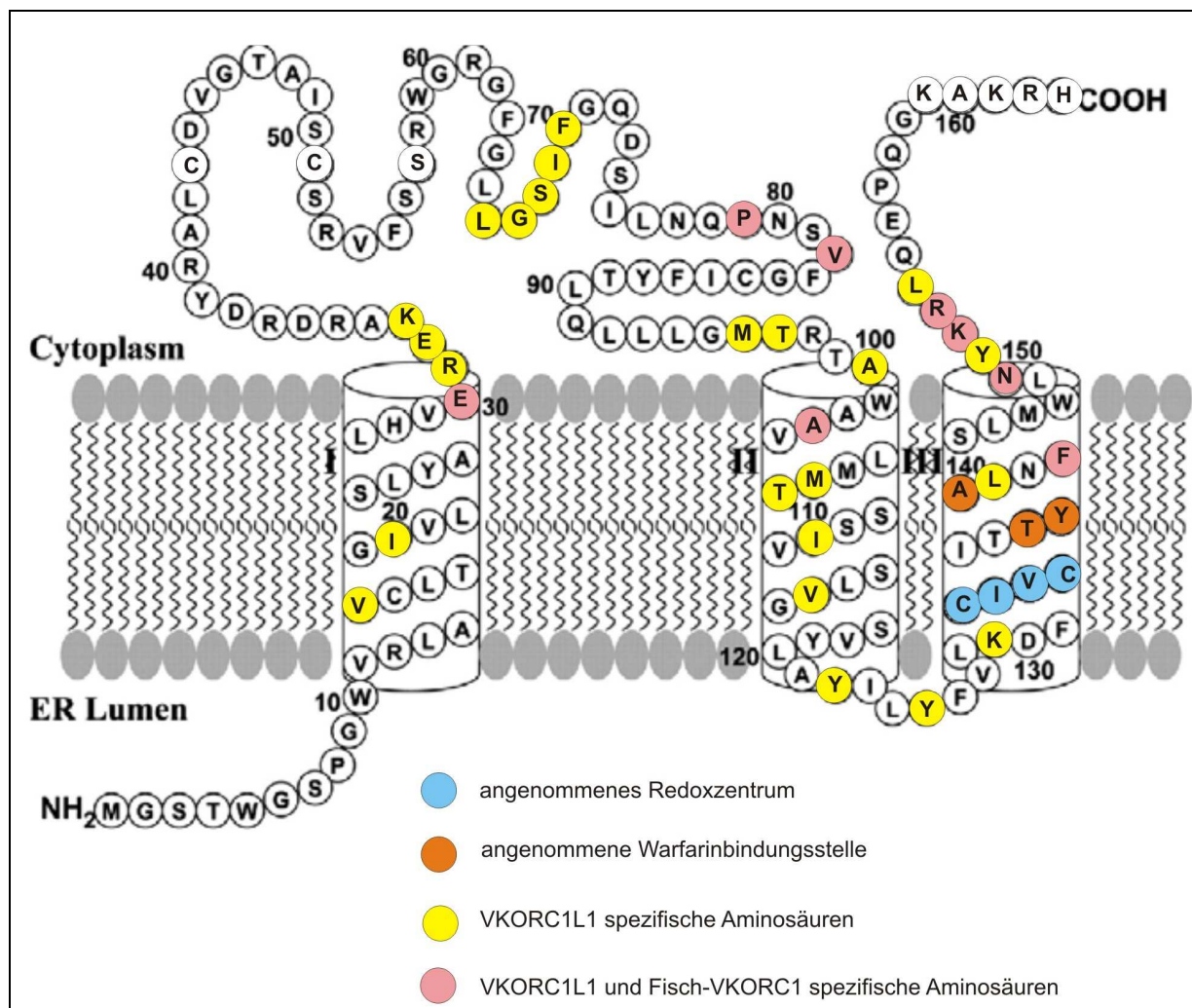


Abb. 46: Proteinmodell des VKORC1 mit konservierten Positionen für das VKORC1L1 (nach Tie et al., 2005). In gelb sind die konservierten, VKORC1L1-spezifischen Aminosäuren markiert. Aminosäuren, die für das VKORC1L1 und das VKORC1 der Fische konserviert sind, sind rosa gekennzeichnet. Des Weiteren sind das TYA-Motiv als angenommene Warfarinbindungsstelle (orange) und das angenommene Redoxzentrum CIVC (blau) farblich hervorgehoben. Für die Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Die Nummerierung entspricht den Aminosäurepositionen im VKORC1-Protein. ER = endoplasmatisches Reticulum.

Spezifische Aminosäuren für das VKORC1L1 sind über das gesamte Protein verteilt, konzentrieren sich aber in der zweiten und dritten Transmembrandomäne sowie in der Grenze zwischen dem Cytoplasma und den Transmembrandomänen. In der ersten Transmembrandomäne sind an den Positionen 15 und 20 ein Leucin (L) nach Isoleucin (I) und ein Leucin nach Valin (V) verändert. Diese Aminosäuren sind alle unpolar. An der Grenzfläche zwischen erster Transmembrandomäne und Cytoplasma befinden sich an der Position 30 - 33 vier vom VKORC1 abweichende Aminosäuren. Statt Lysin (K), zweimal Alanin (A) und Arginin (R) kommen dort eine Glutaminsäure (E), die auch für das VKORC1 der Fische spezifisch ist, Arginin (R), eine weitere Glutaminsäure und Lysin (K) vor. Auffällig ist hierbei, dass im VKORC1L1 die vier Aminosäuren polar sind, im VKORC1 die beiden Alanine dagegen unpolar. Die nächsten hintereinander liegenden Aminosäuren, die alle nur im L1-Protein zu finden sind, liegen im cytoplasmatischen Teil des VKORC1L1 an den Positionen 66 - 70. Valin (unpolar), Glutaminsäure (polar), Histidin (polar), Valin (unpolar) und Leucin (unpolar) sind im VKORC1L1 gegen Leucin (L, unpolar), Glycin (G, unpolar), Serin (S, polar), Isoleucin (I, unpolar) und Phenylalanin (F, unpolar) ausgetauscht. Im Hinblick auf die Polaritäten ist hier nur durch das Glycin eine Veränderung von einer polaren zu einer unpolaren Aminosäure entstanden. Des Weiteren folgen im cytoplasmatischen Bereich zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne zwei Aminosäuren, die für das VKORC1L1 und das VKORC1 der Fische spezifisch sind. Es handelt sich zum einen um ein unpolares Prolin (P), welches ein polares Serin an Position 79 ersetzt. Zum anderen ist an Position 82 ein unpolares Valin (V) statt eines ebenfalls unpolaren Isoleucins zu finden. Drei L1-spezifische Aminosäuren liegen am Übergang der zweiten Transmembrandomäne zum Cytoplasma. Es handelt sich dabei um ein unpolares Methionin (M) und ein polares Threonin (T) an den Stellen 96 und 97. Im VKORC1-Protein sind hier die Aminosäuren Cystein (polar) und Leucin (unpolar) vorhanden. Die Polaritäten an diesen beiden Stellen sind somit vertauscht. Die Aminosäure an der Stelle 100 ist von einem polaren Arginin im C1-Protein zu einem unpolaren Alanin (A) verändert. Ein weiteres Alanin innerhalb der zweiten Transmembrandomäne, welches VKORC1L1- und Fisch-VKORC1-spezifisch ist, befindet sich statt eines polaren Serins (S) an Position 103. Es folgen in der zweiten Transmembrandomäne vier L1-spezifische Aminosäuren, die auf derselben Höhe des TYA- und des CIVC-Motivs der dritten Transmembrandomäne liegen. Es handelt sich dabei um den Austausch Leu107Met, Leu108Thr, Leu110Ile und Ala114Val. Dies sind bis auf das Isoleucin (I) durchweg unpolare Aminosäuren, so dass nur das Isoleucin anstelle des Leucins eine Polaritätsveränderung verursacht. Die Positionen 122, 125 und 129 weisen die polaren

Aminosäuren Tyrosin (Y) und Lysin (K) im VKORC1L1 auf, im VKORC1 sind stattdessen Tryptophan (W, polar), Phenylalanin (F, polar) und Tyrosin (Y, unpolar) vertreten. Eine weitere Veränderung in der Aminosäuresequenz des L1 zeigt sich an Position 141. Hier ist ein Isoleucin nach Leucin (L) ausgetauscht, beide sind unpolar. Zwei Aminosäuren weiter befindet sich ein VKORC1L1- und Fisch-VKORC1-spezifisches, unpolares Phenylalanin (F), welches ein Valin, ebenfalls unpolar, in den VKORC1-Proteinen der übrigen Spezies ersetzt. Am Übergang der dritten Transmembrandomäne des Proteins ins Cytoplasma liegen fünf Aminosäureaustausche hintereinander (Position 150 - 154), wovon drei nicht nur im VKORC1L1 sondern auch im VKORC1 der Fische vorhanden sind. Dies sind die Aminosäuren Asparagin (N, polar), Tyrosin (Y, polar), Lysin (K, polar), Arginin (R, polar) und Leucin (L, unpolar). Sie ersetzen Serin, Phenylalanin, Arginin, Lysin und Valin des VKORC1. Die Polarität ist damit durch die Austausch Tyr151Phe und Arg154Val verändert.

3.3.3 Die menschlichen Chromosomen 7 und 16 im Homologievergleich zu den Chromosomen von verschiedenen Spezies

Mit der Stammbaumanalyse konnte gezeigt werden, dass die Entstehung der beiden Proteine VKORC1 und VKORC1L1 mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Duplikation eines Vorläuferproteins zurückzuführen ist. Um festzustellen, ob sich die Duplikation heute immer noch durch eine Lokalisation der beiden Gene auf demselben Chromosom widerspiegelt oder ob sich die Gene getrennt voneinander auf unterschiedlichen Chromosomen weiterentwickelt haben, wurden die chromosomalen Positionen des VKORC1- und des VKORC1L1-Gens bei verschiedenen Spezies analysiert (Tab. 22).

Spezies	VKORC1 Chromosom	VKORC1L1 Chromosom	VKORC1 Mensch	VKORC1L1 Mensch
Mensch	16	7	16	7
Maus (<i>mus musculus</i>)	7	5	16	7
Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	1	12	16	7
Pferd (<i>Equus caballus</i>)	13	13	16	7
Hund (<i>Canis familiaris</i>)	6	6	16	7
Katze (<i>Felis catus</i>)	?	?	16	7
Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	16	?	16	?
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	16	7	16	7
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	20	3	16	7
Rind (<i>Bos taurus</i>)	25	1	16	7
Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	?	19	?	7
Kugelfisch (<i>Takifugu rubripes</i>)	?	?	?	7
Reisfisch (<i>Oryzias latipes</i>)	19	14	16	7
Kugelfisch (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	15	7	16	7
Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	?	5	?	7
Krallenfrosch (<i>Xenopus tropicalis</i>)	?	?	16	7

Tab. 22: Lokalisation des VKORC1- und des VKORC1L1-Gens auf den Chromosomen von verschiedenen Spezies.

In der ersten und zweiten Spalte der Tabelle sind die Chromosomen bei den verschiedenen Spezies aufgelistet, auf denen das VKORC1- und das VKORC1L1-Gen zu finden sind. Bei einigen Tierarten konnte zwar eine genomische Sequenz für das entsprechende Gen gefunden und zugeordnet werden, allerdings waren die Chromosomenlokalisationen in der verwendeten Datenbank nicht aufgeführt. Für einige Spezies ließen sich keine Gensequenzen finden. Diese Gene ohne Zuordnung sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. In Spalte 3 und 4 ist die Zuordnung des jeweiligen Chromosoms der Tierart zum menschlichen Chromosom angegeben. Die genomischen Sequenzen wurden aus der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) bezogen.

Für die Spezies Maus, Ratte, Schimpanse, Rhesusaffe, Rind, Reisfisch, Kugelfisch konnten sowohl das VKORC1- als auch das VKORC1L1-Gen zwei verschiedenen Chromosomen zugeordnet werden. Für einige Spezies wie Orang-Utan, Huhn und Zebrafisch konnte nur eines der beiden Gene eindeutig einem Chromosom zugewiesen werden. Für die Katze, den Kugelfisch und den Krallenfrosch ließ sich für beide Gene über die verwendete Datenbank kein entsprechendes Chromosom ermitteln. Der Homologievergleich der nicht chromosomal zuzuordnenden genomischen Sequenz mit der menschlichen Sequenz konnte allerdings diese Genabschnitte dem Bereich des humanen VKORC1 (Chromosom 16) und dem VKORC1L1 (Chromosom 7) zuweisen. Das Pferd und der Hund zeigen eine Lokalisation der beiden Gene

auf jeweils demselben Chromosom (rot markiert in Tab. 22). Beim Pferd handelt es sich um das Chromosom 13 und beim Hund um das Chromosom 6.

In Abbildung 47 ist eine schematische Übersicht der Homologiebereiche für das VKORC1- und das VKORC1L1-Gen beispielhaft zwischen dem Menschen und dem Schimpansen (*Pan troglodytes*), dem Rind (*Bos taurus*) und der Maus (*Mus musculus*) dargestellt.

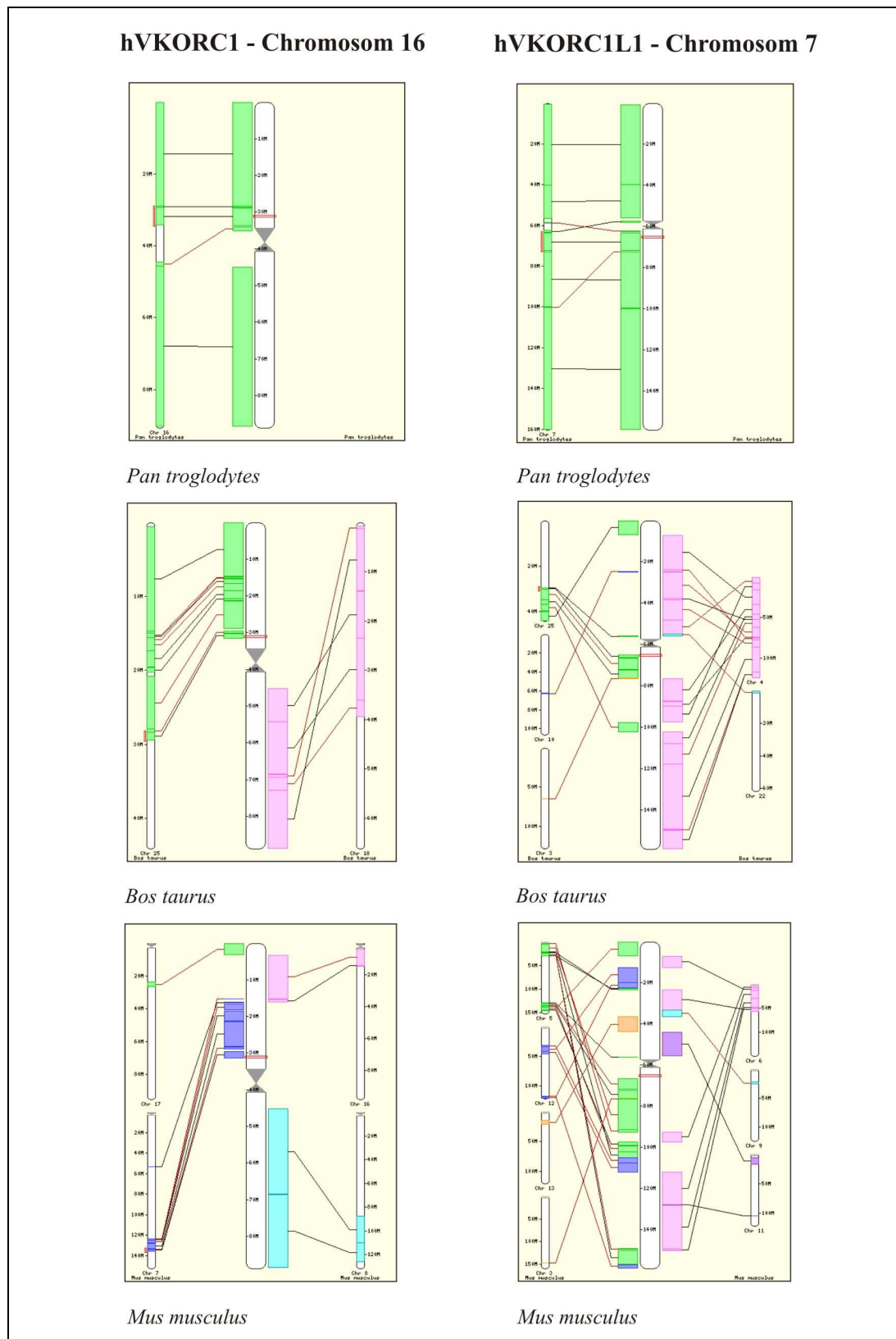


Abb. 47: Homologien zwischen dem humanen Chromosom 16 und 7 und den Chromosomen von Schimpanse (*Pan troglodytes*), Rind (*Bos taurus*) und Maus (*Mus musculus*).

Auf der linken Seite ist in der Mitte das menschliche Chromosom 16 mit dem VKORC1-Gen dargestellt, auf der rechten Seite befindet sich das menschliche Chromosom 7 mit dem VKORC1L1-Gen (jeweils weiße Ideogramme). Rechts und links vom Chromosom 16 und 7 sind die jeweiligen Chromosomen mit den homologen Bereichen für die ausgewählten Spezies gekennzeichnet. Der rote Balken im Chromosom 16 und 7 symbolisiert die Lage des VKORC1- bzw. des VKORC1L1-Gens. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) erstellt.

Aus der Abbildung 47 ist ersichtlich, dass bei den genomisch mit dem Menschen nah verwandten Spezies, wie dem Schimpansen, fast die gesamten Chromosomen 7 und 16 den humanen Chromosomen 7 und 16 entsprechen. Nur ein Bereich um das Centromer bleibt davon jeweils ausgespart. In dieser centromerischen Region liegt auf dem menschlichen Chromosom 16 konstitutives Heterochromatin vor, welches kurze DNA-Sequenzen in Millionen von Kopien umfasst. Auf Grund dieser kurzen Sequenzen befinden sich keine Gene in diesem Bereich. Beim Rind dagegen sind die Abschnitte des humanen Chromosoms 16 auf 2 Chromosomen verteilt, das Chromosom 7 findet sich in 5 Chromosomen des Rindes wieder. Den Chromosomen der Maus lassen sich jeweils nur kurze menschliche Chromosomenbereiche zuordnen. Die Bereiche der beiden humanen Chromosomen sind auf 4 bzw. sogar 7 Maus-Chromosomen verteilt.

Aus der Tabelle 22 ist ersichtlich, dass die Gene VKORC1 und VKORC1L1 bei Hund und Pferd beide auf dem gleichen Chromosom liegen. Es stellt sich die Frage, ob bei diesen Spezies die Gene in Folge der Duplikation noch nah beieinander liegen oder ob sie durch Chromosomenumlagerungen zufällig auf dem gleichen Chromosom zu liegen gekommen sind. Für diese Analyse wurden die jeweiligen Chromosomen von Pferd und Hund und die Lokalisation der Gene dargestellt (Abb. 48). Wie in der Abbildung 48 zu erkennen ist, liegen das VKORC1- und das VKORC1L1-Gen auf dem Chromosom 6 beim Hund (*Canis familiaris*) nicht nebeneinander, sondern sind durch einen etwa 16 Mb großen chromosomalen Bereich voneinander getrennt. Beim Pferd (*Equus caballus*) dagegen liegen die beiden Gene auf Chromosom 13 sehr nah beisammen. Zwischen ihnen befindet sich nur ein 0,9 Mb umfassender Chromosomenabschnitt.

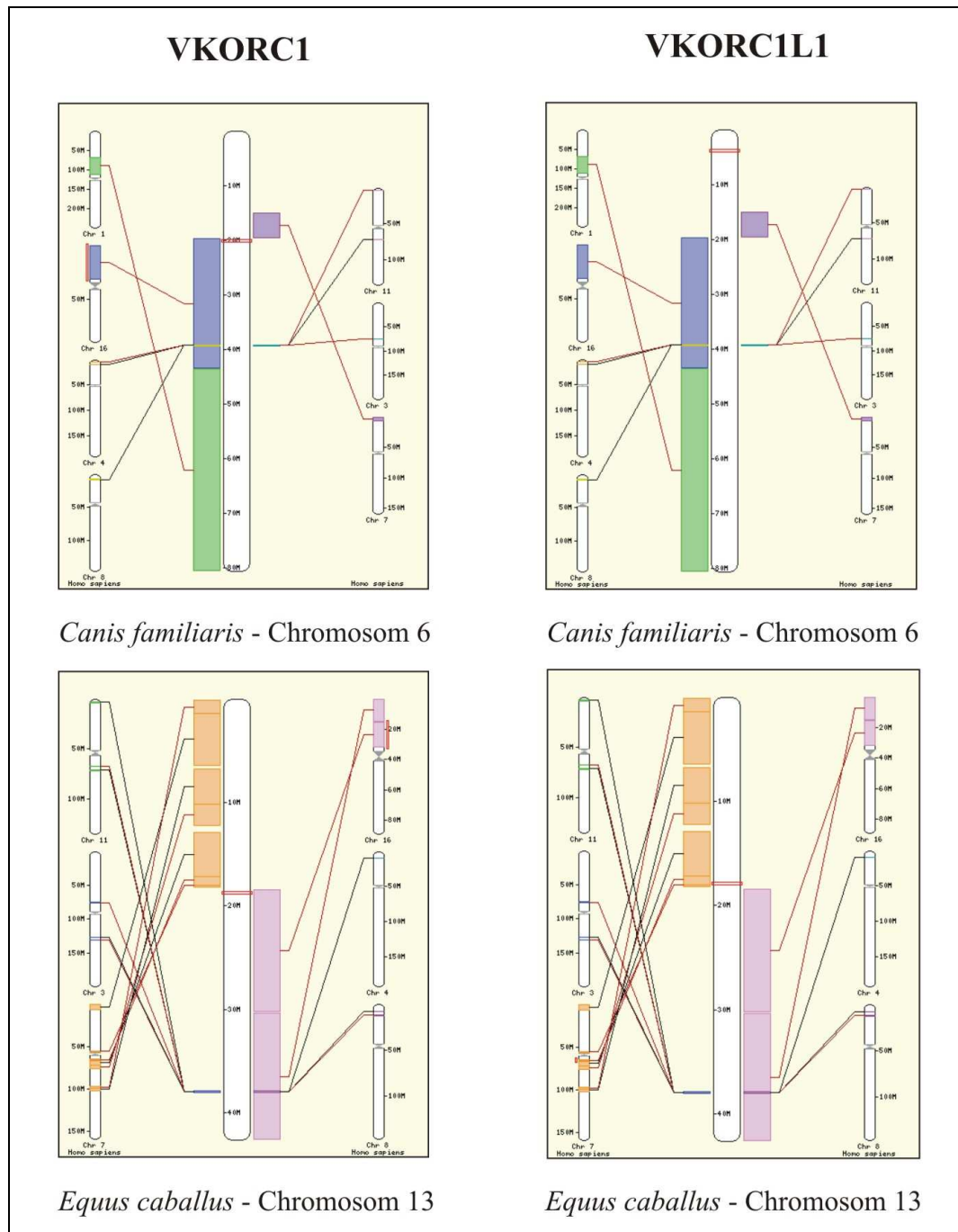


Abb. 48: Lokalisation des VKORC1- und des VKORC1L1-Gens auf den Chromosomen des Hundes (*Canis familiaris*) und des Pferds (*Equus caballus*).

In der linken Spalte ist das VKORC1-Gen und in der rechten Spalte das VKORC1L1-Gen als roter Balken auf dem mittleren Chromosom von Hund bzw. Pferd dargestellt. Die farblich markierten Balken seitlich des mittleren Chromosoms kennzeichnen die homologen Abschnitte zu den humanen Chromosomen, die links und rechts von jeder Abbildung zu sehen sind. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) erstellt.

4 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen zum Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1 Protein (VKORC1L1) durchgeführt, dessen Funktion bisher noch nicht geklärt werden konnte und das auch in der Literatur bis jetzt noch nicht charakterisiert wurde. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher zum einen in der Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen und zum anderen in der biochemischen Charakterisierung des Proteins mittels gewebespezifischer Expressionsstudien, enzymkinetischer Betrachtungen und positionsabhängiger *in vitro* Mutagenesen sowie Warfarinhemmstudien. Die erhaltenen Daten sollen Aufschlüsse über die Funktion des Proteins und die Stoffwechselwege geben, in die es involviert sein könnte. Des Weiteren werden über Aminosäuresequenz-Alignments und über einen phylogenetischen Stammbaum bioinformatische Analysen zur evolutiven Entstehung und Entwicklung des VKORC1L1 durchgeführt. Homologievergleiche zwischen dem menschlichen Chromosom 7, auf dem das VKORC1L1-Gen lokalisiert ist, sowie dem Chromosom 16 mit dem VKORC1-Gen und den jeweiligen Chromosomen verschiedener Spezies sollen aufklären, ob sich die Duplikation der beiden Gene noch in einer benachbarten Lokalisation auf einem gemeinsamen Chromosom zeigt.

4.1 Generierung einer Knockout-Maus für das VKORC1L1-Gen

4.1.1 Die chimären Mäuse

Mit Hilfe des *in vivo* Mausmodells, der homologen Rekombination in ES-Zellen und des Cre/loxP-Systems sollte die physiologische Rolle des VKORC1L1-Gens untersucht werden. Dabei könnte der Phänotyp einer gewebespezifisch VKORC1L1-defizienten Maus Rückschlüsse auf die Aufgaben des Proteins zulassen. Dazu wurde zunächst ein geeigneter Targetingvektor (Abb. 20) kloniert, der in embryonale Stammzellen transfiziert wurde. Zum Screenen der Klone wurde eine passende Screeningsstrategie entwickelt (vgl. Abb. 21 und Abb. 26). Die zwei mittels PCR und Southern Blot positiv getesteten ES-Klone wurden in Blastozysten injiziert und von scheinchwangeren Ammenmäusen ausgetragen. Die daraus hervorgegangenen sechs chimären Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen mit wildtypischen C57BL/6J-Weibchen verpaart. Auffällig war, dass nur eine 15%ige Chimäre Nachkommen hervorgebracht hat, die anderen fünf männlichen Chimären schienen steril zu sein. Eine andere Erklärung für das Ausbleiben von Nachwuchs bei diesen fünf Tieren könnte in

frühzeitigen Aborten der Embryonen liegen. Allerdings gab es auf solche Abgänge keine Hinweise, wie z.B. Blut im Käfig.

Die 52 Nachkommen der 15% Chimäre, die innerhalb eines halben Jahres geboren wurden, waren alle durchweg wildtypisch, so dass anzunehmen ist, dass bei dieser chimären Maus keine Keimbahntransmission des Vektorkonstrukts stattgefunden hat. Da die Chimärität sehr gering ist, kann es allerdings auch sein, dass noch nicht genügend Nachwuchs geboren wurde. Die Testes besitzen so wie der restliche Organismus der Chimäre ein Mosaik aus den genetisch veränderten Zellen und den wildtypischen Zellen. Aus Erfahrung weiß man, dass mutierte Keimzellen, wie die Spermien der chimären Mäuse, weniger lebensfähig sind als die nicht-mutierten und ein Agouti-Nachwuchs daher erst mit einer zeitlichen Verzögerung geboren wird [Olds-Clarke, 1989; Silver, 1995]. Auffällig war allerdings bei der 15%igen Chimäre, dass nach einem halben Jahr selbst mit neuen zugesetzten jungen Wildtyp-Weibchen keine weiteren Jungtiere geboren wurden. Es könnte daher sein, dass bei diesem Männchen eine frühzeitige Alterung oder eine vorzeitig einsetzende Sterilität Ursache für das Ausbleiben der Nachkommen sind.

Da die Verpaarungen mit den sechs Chimären nicht erfolgreich verlaufen sind, wurde nach einem halben Jahr Züchtungsversuch ein weiterer Anlauf mit einer erneuten Blastozysteninjektion unternommen. Diese wurde von der Firma Polygene in der Schweiz durchgeführt und brachte zwei männliche Tiere mit einer Chimärität von jeweils etwa 20% hervor. Auch diese Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen mit jeweils drei 6-wöchigen C57BL6/J-Weibchen verpaart. Eine Chimäre blieb ohne Nachwuchs, das andere Männchen hat innerhalb von 19 Monaten 85 Nachkommen produziert, die allesamt wildtypisch waren. Auch hier lassen sich die gleichen Überlegungen wie zur 15% Chimäre anstellen. Entweder liegt bei dieser Maus aus der Schweiz keine Keimbahntransmission vor oder der Agouti-Nachwuchs lässt noch auf sich warten. Weiterhin ist zu erwähnen, dass eine geringe Chimärität der Mäuse generell nicht gegen eine Keimbahntransmission sprechen muss. Es lässt sich beobachten, dass Tiere mit einer hohen Chimärität oft nicht völlig genetisch gesund sind und/oder Fertilitätsprobleme aufweisen [Silver, 1995]. Daher wäre eine Sterilität bei diesen Mäusen nichts Ungewöhnliches. In vielen Fällen gehen gerade aus den Tieren mit geringer Chimäritätsrate die Agouti-Nachkommen hervor, da sie insgesamt fitter zu sein scheinen.

Betrachtet man die Chimären genauer, fällt auf, dass die 90% Chimäre (hier nicht gezeigt), die bereits nach drei Monaten verstorben ist, im Gegensatz zu den Geschwistern sehr klein und zurückgeblieben war. Sie zeigte kein Größenwachstum und war körperlich sehr schwach. Die 30% Chimäre dagegen wirkte sehr adipös und schwerfällig (Abb. 31). Auch ihre Verpaarungen waren ohne Nachwuchs. Die übrigen Chimären aus Köln und der Schweiz schienen dagegen ohne äußerlich sichtbare gesundheitliche Beeinträchtigungen zu sein. Dennoch ist anscheinend aufgrund des frühen Todes einiger Tiere die allgemeine Fitness herabgesetzt, beziehungsweise tritt eine vorzeitige Alterung ein. Dies könnte daran liegen, dass die chimären Mäuse eine reduzierte Gendosis des VKORC1L1-Proteins besitzen. Der über homologe Rekombination in die ES-Zellen eingeführte Targetingvektor trägt noch die Neomycin-Selektionskassette, die unter Umständen die Produktion des VKORC1L1-Genprodukts stören kann. Wenn nun das VKORC1L1-Protein grundlegende Funktionen in der Embryonalentwicklung einnimmt oder im adulten Organismus für bestimmte Prozesse und Signalwege von großer Wichtigkeit ist, dann kann die Entwicklung der Embryonen gestört sein bzw. gar nicht ablaufen. Eine reduzierte Dosis des VKORC1L1-Proteins könnte nicht ausreichen, um den Organismus der Chimären regulär funktionieren zu lassen. Defekte in der Fortpflanzung, in der Alterung, in der Bekämpfung des oxidativen Stresses oder im Fettstoffwechsel wären beispielsweise mögliche schwerwiegende gesundheitliche Konsequenzen.

4.1.2 Die SKY-Analyse zur Karyotypbestimmung der injizierten ES-Zellklone

Um der Frage nachzugehen, ob ein Chromosomendefekt in den für die Transfektion verwendeten embryonalen Stammzellen ursächlich für die schlechte Effizienz der Blastozysteninjektionen sein könnte, wurde eine SKY-Analyse zur Bestimmung des Karyotyps der verwendeten ES-Zellklone 3D und 10G vorgenommen. Wie im Ergebnisteil erläutert, gingen aus mehrfachen Injektionsversuchen des Klons 3D nur insgesamt 8 Chimären hervor, aus dem Klon 10G konnten gar keine Chimären produziert werden. Wie sich in den erstellten Karyogrammen (Abb. 34 und Abb. 35) zeigte, wiesen sowohl Klon 3D als auch der Klon 10G eine Trisomie des Chromosoms 8 auf. Es handelt sich um Translokation zweier Chromosomen 8 zu einem Isochromosom mit einem zusätzlichen freien Chromosom 8. Der Karyotyp war mit 41 Chromosomen aberrant im Vergleich zum normalen Karyotyp der Maus mit $2n = 40$ Chromosomen. Die Arbeitsgruppe um Jaenisch stellte fest, dass ein häufiges Problem bei der Generierung von Knockout-Mäusen eine niedrige Effizienz oder sogar das Ausbleiben der Keimbahntransmission ist [Liu et al., 1997]. In diesen

Untersuchungen zeigte sich, dass eine Beziehung zwischen der Wachstumsrate und dem Karyotyp der ES-Zellen und ihrer Keimbahngängigkeit besteht. Liu et al. wiesen nach, dass chromosomale Veränderungen häufiger in embryonalen Stammzellen vorkommen. Zellen, die eine veränderte Zahl an Chromosomen, insbesondere die Trisomie 8, aufweisen, wurden in drei unabhängig voneinander erhaltenen Zelllinien gefunden. Diese Veränderung geht einher mit einem selektiven Wachstumsvorteil der Zellen. Die Selektion der abnormen Zellen führt zu einer Dezimierung oder einem kompletten Verlust der normalen ES-Zellen während der fortlaufenden Zellpassagen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es mit einer Trisomie 8 seltener zu einer Keimbahntransmission kommt. Da in den untersuchten Klonen 3D und 10G die Trisomie 8 bestätigt werden konnte, könnte dieser Befund die verminderte Keimbahntransmission der embryonalen Stammzellen und den ausbleibenden heterozygoten Nachwuchs für den VKORC1L1-Knockout erklären. Aus den in dieser Arbeit verwendeten Stammzellen der Linie V6.5 werden allerdings am Institut für Genetik in Köln routinemäßig Chimären produziert, die rekombinanten Nachwuchs und letztlich auch die jeweiligen Knockout-Mäuse hervorbringen (G. Spohn und J. Brüning, pers. Mitteilung).

Eine japanische Studie aus dem Jahre 2006 berichtet über die chromosomale Analyse von 540 embryonalen Stammzelllinien der Maus, die im Zeitraum von 2001 bis 2004 in japanischen Instituten verwendet wurden. Dabei zeigten 66,5% der untersuchten Linien einen normalen Chromosomensatz, der Rest wies eine veränderte Chromosomenanzahl von $n = 39, 41$ oder 42 auf. 35 ES-Zelllinien zeigten den abnormen Karyotyp mit einer Trisomie 8. Ein normaler diploider Chromosomensatz konnte lediglich für 58,3% der Zelllinien, die aus 129Sv-Zellen gewonnen wurden, bestimmt werden [Sugawara et al., 2006]. Diese Untersuchungen zeigen eine relativ große Verbreitung der Veränderungen in der Chromosomenzahl und im Karyotyp von ES-Zelllinien, die in Japan eingesetzt wurden. Eine chromosomale Analyse der ES-Zellen scheint für eine erfolgreiche Schaffung von neuen Mausmodellen durch Keimbahntransmission daher wichtig und sinnvoll.

Leider konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden, ob der ausbleibende Erfolg bei der Generierung einer VKORC1L1-Knockout-Maus auf die Trisomie 8 der ES-Zellen und/oder auf andere Faktoren zurück zu führen ist.

4.2 Biochemische Charakterisierung des VKORC1L1-Proteins

4.2.1 Northern Blot Analysen

Zur Untersuchung eines noch unbekanntes Proteins stehen zahlreiche biochemische Verfahren zur Verfügung, die Aussagen zu seiner Lokalisation und Funktion erlauben. Da für das VKORC1L1-Protein bis jetzt keine spezifischen Antikörper existieren - einige wurden ohne Erfolg während dieser Arbeit ausgetestet - waren immunhistologische Untersuchungen wie z. B. Wholemout-Antikörperfärbungen an Mausembryonen zur Analyse der gewebespezifischen Expression nicht möglich. Der Northern Blot, der für diese Arbeit herangezogen wurde, ist eine alternative molekularbiologische Methode zur Untersuchung der Expressionsrate von Genen in verschiedenen Geweben über die jeweilige relative mRNA-Menge. Auf der verwendeten Membran ist die spezifische Markierung von RNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit komplementären Gensonden möglich. Im Falle des VKORC1L1-Proteins zeigte sich eine starke Bande von 1,1 kb für Mausgewebe aus Gehirn, Leber und den Testes. Dies spricht für eine erhöhte Expression in diesen Geweben. Aber auch in anderen Geweben wird das VKORC1L1 auf niedrigerem Level exprimiert, so dass keine genaue Aussage über eine spezifische Expression und somit über eine konkrete Funktion des Proteins getroffen werden kann. Das Vorhandensein des Proteins in der Leber könnte Rückschlüsse auf seine Beteiligung im Vitamin K-Zyklus geben, da hier die Vitamin K-abhängigen Blutgerinnungsfaktoren gebildet werden und diese eine Carboxylierung für ihre Aktivierung durchlaufen müssen, die Vitamin K erfordert. Northern Blot Studien zum VKORC1-Protein zeigten in der Leber ebenfalls die stärkste Expression [Rost et al., 2004]. Da das VKORC1L1 auch im Gehirn exprimiert wird, könnte eine Teilnahme am oxidativen Stressabbau angenommen werden. Die durch die normale Stoffwechselaktivität erzeugten freien Radikale sind im Gehirn besonders schädlich, so dass Reaktionen, die Radikale unschädlich machen können, besonders wichtig sind. Über Reduktionsvorgänge, wie sie auch im Vitamin K-Zyklus stattfinden, würde das VKORC1L1-Protein als Oxidoreduktase potentiell dafür in Frage kommen. In den Testes wäre eine Involvierung des Proteins in die Keimzellentwicklung wie beispielsweise bei der Reifung der Spermien denkbar. Damit hätte es wesentlichen Einfluss auf die Fertilität und die Reproduktion. Ein defektes VKORC1L1 oder eine zu geringe Dosis des Proteins in den Testes könnte eventuell eine Sterilität des Tieres bedingen. Betrachtet man die erhaltenen chimären Mäuse, in denen unter Umständen eine verringerte Dosis des VKORC1L1-Proteins vorliegt, wenn die Selektionskassette des

Targetingvektors die Expression des Gens behindern sollte, könnte dies eine weitere Erklärung für das Ausbleiben des Nachwuchses der generierten Chimären sein.

Des Weiteren tauchen im Northern Blot zwei zusätzliche Banden bei einer Hybridisierung mit der VKORC1L1-cDNA-Sonde auf. Sie besitzen eine Größe von etwa 4 kb und 5,5 kb und sind in ihrer Expressionstärke jeweils mit der 1,1 kb Bande identisch. Dies lässt vermuten, dass es vielleicht noch weitere Isoformen des VKORC1L1-Proteins gibt, die zum Teil identische Sequenzabschnitte zum L1-Protein aufweisen, aber bisher noch nicht entdeckt wurden und möglicherweise auf Spleißvarianten des VKORC1L1-Gens zurück zu führen sind. Diese Spleißvarianten oder Vorläuferproteine müssten allerdings in etwa denselben Mengen wie das L1-Protein in den Geweben vorliegen, was wiederum unwahrscheinlich ist. In Datenbanken sind Isoformen dieser Größe bisher nicht veröffentlicht worden. Ein Northern Blot für das menschliche VKORC1L1, der im Rahmen der Entdeckung des VKORC1-Proteins im Jahre 2004 durchgeführt worden ist (unveröffentlicht), zeigte allerdings ebenfalls eine Zusatzbande bei 5 kb und bestätigt somit die größeren Banden aus dem Northern Blot für das VKORC1L1 der Maus.

4.2.2 Enzymkinetiken

VKORC1 und das hier bearbeitete paraloge Protein VKORC1L1 gehören zu einer neuen Familie von Proteinen, die zwar in Pro- und Eukaryonten weit verbreitet sind (vgl. Kap. 1.1.6 und 3.3.1), bisher aber nur unvollständig charakterisiert werden konnten. VKORC1 ist die lange gesuchte Oxdio-reduktase des Vitamin K-Zyklus, die für die Rückgewinnung von Vitamin KH_2 sorgt, welches im Zuge der posttranslationalen Carboxylierung von Proteinen verbraucht wird [Rost et al. 2004; Li et al. 2004; Chu et al., 2006; Jin et al., 2007]. Seine natürlichen Substrate sind die Epoxide von Vitamin K_1 und K_2 . Die physiologische Rolle des paralogen VKORC1L1 ist bisher nicht untersucht worden. Wegen der hohen Homologie auf Proteinebene lag es nahe, zunächst auf die Substrate des VKORC1 zurück zu greifen.

Im Rahmen der enzymkinetischen Untersuchungen wurden die Maximalgeschwindigkeit V_{max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_M für das VKORC1 und VKORC1L1 der Spezies Mensch Maus, Ratte und Stachelmaus bestimmt. Die Messungen sollten Aufschluss über die enzymatische Aktivität der Proteine und so über ihre Funktionsweise geben. Auffällig ist, dass sich die gemessenen Aktivitäten und mit der Computer-Software KaleidaGraph berechneten enzymkinetischen Werte untereinander nur geringfügig unterscheiden. Ein großer

Unterschied zwischen den Werten der V_{\max} und der K_M für das VKORC1 und für das VKORC1L1 lässt sich nicht feststellen. Lediglich das VKORC1 der Maus besitzt eine halb so große V_{\max} wie ihr VKORC1L1-Protein. Insgesamt erreicht das VKORC1 seine Maximalgeschwindigkeit bei niedrigeren Konzentrationen von Vitamin K₂-Epoxid als das VKORC1L1. Dies zeigt, dass auch das VKORC1L1-Protein mit beinahe gleicher Effizienz wie das homologe VKORC1-Protein die Umsetzung von Vitamin K₂-Epoxid zu Vitamin K₂-Chinon bewerkstelligen kann. Die Daten würden somit für eine Oxidoreduktase-Aktivität des VKORC1L1 im Vitamin K-Zyklus sprechen. Ein weiterer Beleg für diese Annahme ist das im Protein vorhandene CXXC-Motiv, welches als Redoxzentrum fungiert [Tie et al., 2005; Oldenburg et al., 2006; Wajih et al., 2007]. Weiterhin besitzen das C1- und L1-Protein ähnliche Werte für die Michaelis-Menten-Konstante K_M , welche ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat Vitamin K₂-Epoxid ist. Ein niedriger Wert zeigt dementsprechend eine hohe Affinität an, d. h. wenig Substrat ist zur Sättigung nötig. Auch diese Beobachtung spricht für eine effiziente Aktivität beider Proteine bei der Reduktion von Vitamin K₂-Epoxid. Messungen an Lebermikrosomen von warfarinsensitiven Mäusen ergaben einen doppelt so großen V_{\max} -Wert für die Vitamin K-Epoxid-Reduktase [Lasseur et al., 2006]. Allerdings kann mit diesen Werten kein direkter Vergleich angestellt werden, da die Ergebnisse auf der Verwendung von Mikrosomen und von Vitamin K₁-Epoxid beruhen. In dieser Arbeit wurden dagegen HEK-Zelllysate eingesetzt, die das jeweilige Protein überexprimierten. Die Messungen wurden darüber hinaus mit Vitamin K₂-Epoxid durchgeführt.

4.2.3 Warfarinhemmstudien für Mutationen im humanen VKORC1L1-Protein

Eine charakteristische Eigenschaft des paralogen VKORC1-Proteins ist seine Sensitivität gegenüber dem Antikoagulant Warfarin. Mutationen in Patienten und Rattenpopulationen, die zu einer Resistenz gegen Warfarin führten, waren ein wesentlicher Schritt bei der Identifizierung des Proteins [Rost et al. 2004]. Vermutlich unter dem Selektionsdruck der weit verbreiteten Bekämpfung mit Antikoagulantien sind Mutationen bei warfarinresistenten Ratten häufig anzutreffen [Pelz et al., 2005]. Später folgten dann systematische *in vitro* Mutagenesen an interessanten Aminosäurepositionen des VKORC1 [Rost et al., 2005].

Da das VKORC1L1-Protein die Umsetzung von Vitamin K-Epoxid zum Vitamin K-Chinon fast ebenso gut wie das VKORC1 durchführen kann (vgl. Kap. 3.2.6), stellte sich die Frage, ob das VKORC1L1-Protein ebenfalls sensitiv gegenüber Warfarin ist und durch entsprechende Mutagenese resistent gemacht werden könnte. Zu diesem Zweck wurden fünf

Mutationen ausgewählt, die im paralogen VKORC1-Protein zur partiellen Warfarinresistenz führen, und im Aktivitätsassay in Anwesenheit von Warfarin gemessen. Bei der Messung mit Warfarin ist auffällig, dass zwei Mutationen eine Resistenz zeigten, die für das VKORC1-Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei um die Aminosäureaustausche R65G und V36L im VKORC1L1-Protein. Diese Mutationen scheinen eine andere Funktion zu übernehmen als die Aminosäureaustausche R58G und V29L im VKORC1-Protein. Beide VKORC1-Mutationen wurden im Assay sensitiv auf Warfarin getestet und waren nicht resistent, obwohl sie in Patienten mit Warfarinresistenz gefunden wurden [Rost et al., 2004]. Die menschliche Mutation L128R im VKORC1 und die warfarinresistenten Rattenmutationen Y139C und Y139F waren im VKORC1L1-Protein warfarin-sensitiv, im Aktivitätsassay für das VKORC1-Protein war dagegen eine Resistenz nachweisbar. Zudem zeigten die drei VKORC1L1-Mutationen L135R, Y146C und Y146F eine sehr niedrige Basisaktivität. Es scheint also trotz hoher Homologie zwischen beiden Proteinen und gleicher Vitamin K-Recyclingfähigkeit einen Unterschied in der Funktionsweise des VKORC1L1 zu geben, da die genannten Mutationen eine andere Warfarinempfindlichkeit zeigen als die entsprechenden Mutationen in VKORC1.

Mehrere Daten sprechen für die Beteiligung des VKORC1L1-Proteins im Vitamin K-Zyklus. Es besitzt zum einen die Fähigkeit, das Vitamin K-Epoxid zum Vitamin K-Chinon zu reduzieren, zum anderen lässt es sich durch Warfarin ebenso wie das VKORC1-Protein hemmen. Die nahe liegende Annahme, dass es sich beim VKORC1L1-Protein um ein „Backup-Protein“ handeln könnte, welches beim Ausfall des VKORC1-Proteins „einspringt“ und seine Funktion übernimmt, widerlegen dagegen einige Beobachtungen. Patienten, die eine Warfarinresistenz aufweisen beziehungsweise an einem erblich bedingten Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (VKCFD2) leiden, zeigen eine Störung im Vitamin K-Zyklus (vgl. Kap. 1.1.8 und 1.1.10), die auf Mutationen im VKORC1-Protein zurück zu führen sind. Das VKORC1L1 ist bei diesen Patienten voll funktionsfähig. Mutationen in VKORC1 können zur klinischen Resistenz gegenüber Warfarin führen, während die „paralogen“ Mutationen in VKORC1L1 zumindest *in vitro* diesen Effekt nicht zeigen (vgl. Kap. 3.2.8). Ein intaktes L1-Protein kann ein mutiertes C1 *in vivo* nicht ersetzen. Bei der Erkrankung VKCFD vom Typ 2 liegen Mutationen im VKORC1-Protein vor, die zu einem kompletten Ausfall der Enzymaktivität führen. Auch bei diesen Patienten kann das intakte VKORC1L1 diesen Funktionsverlust *in vivo* nicht ersetzen. Würde das VKORC1L1 bei einem Ausfall des VKORC1 als Backup-Enzym seine Aufgabe übernehmen, müsste bei

den Patienten der Recyclingprozess des Vitamin K und folglich die Blutgerinnung dennoch geregelt und ohne Komplikationen ablaufen. Darüber hinaus müsste dieser Prozess auch weiterhin in Patienten, die eine Warfarinresistenz vermittelnde Mutation im VKORC1-Protein besitzen, warfarin-sensitiv sein, wenn das VKORC1L1 gemeinsam mit dem VKORC1 die Bereitstellung von Vitamin K-Chinon gewährleistet. Eine weitere Beobachtung an Knockout-Mäusen für das VKORC1-Protein bestätigt die Vermutung, dass das VKORC1L1 nicht als Backup-Protein im Vitamin K-Zyklus für das VKORC1 fungiert. Diese Mäuse weisen bei einem inaktivierten VKORC1-Gen und weiterhin intaktem VKORC1L1-Gen eine gestörte und unvollständig ablaufende Blutgerinnung auf. Die Mäuse zeigen starke Blutungen und versterben bereits bei der Geburt, wenn sie nicht mit Vitamin K zusätzlich gefüttert werden (G. Spohn, Daten unveröffentlicht).

4.2.4 Warfarinhemmstudien für das VKORC1- und VKORC1L1-Protein verschiedener Spezies

Neben der klinischen Bedeutung des VKORC1 bei der Kontrolle der Blutgerinnung durch Antikoagulantien des Warfarin-Typs, spielt die Resistenz gegenüber diesen Substanzen eine ökonomisch wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Nagetierplagen. Es wurden daher auch die VKORC1L1-Proteine der Maus und der Ratte für einen Vergleich mit dem menschlichen Protein herangezogen, um die Warfarinsensitivität in den Nagern zu analysieren. Im Warfarinassay zeigte sich, dass die beiden Kurvenverläufe der Warfarinhemmung bei den Nagern sehr dem Verlauf des menschlichen VKORC1L1 ähneln. Lediglich die Basisaktivität ist bei Maus und Ratte etwas geringer. Eine Warfarinresistenz ist für die wildtypischen VKORC1L1-Proteine in keiner Spezies nachzuweisen. Darüber hinaus wurde das VKORC1-Protein der Stachelmaus betrachtet, dessen Sequenz noch unveröffentlicht ist. Die Sequenz wurde mit Hilfe eines in einer Zoohandlung gekauften Tieres ermittelt, daher ist seine genaue Herkunft nicht bekannt. Die Stachelmaus ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da durch Untersuchungen an Wildfängen aus Ägypten eine Resistenz gegenüber Warfarin, Difenacoum und Brodifacoum gezeigt werden konnte [Mahmoud, Redfern, 1981]. Erstaunlicherweise weist die *Acomys* im durchgeführten Assay eine Sensitivität gegenüber dem eingesetzten Antikoagulant Warfarin auf, die Basisaktivität ist dabei im Vergleich zum Wildtyp der Maus und der Ratte erniedrigt. Es kann zum einen sein, dass die Stachelmaus, aus der die DNA gewonnen wurde, und die wiederum als Grundlage für die Sequenzierungsanalyse diente, keine natürliche Resistenz aufweist und aus einer Population stammt, die sensitiv auf Antikoagulantien reagiert. Andererseits ist es denkbar, dass weitere

Mechanismen oder noch unbekannte Enzyme in der Stachelmaus existieren, die eine Warfarinresistenz vermitteln. Es existieren momentan keine Projekte, in denen Stachelmäuse systematisch gefangen und auf Resistenzen überprüft werden, wie es bei den Ratten und Mäusen der Fall ist. Daher wäre die Erweiterung des Artenspektrums auf die Stachelmaus zur Untersuchung des VKORC1-Gens sicherlich sinnvoll.

4.3 Bioinformatische Analysen des VKORC1L1-Proteins

4.3.1 Sequenzvergleiche des VKORC1- und VKORC1L1-Proteins

Über ein Multiple Alignment von Aminosäuresequenzen des VKORC1- und VKORC1L1-Proteins verschiedener Spezies ließen sich nicht nur hohe Homologien innerhalb der jeweiligen Proteine, sondern auch zwischen VKORC1 und VKORC1L1 nachweisen. Da die Proteinstruktur des VKORC1L1-Proteins noch unbekannt ist, stellte sich die Frage, wie viele Transmembrandomänen in diesem Protein vorliegen. Anhand von Computerprogrammen wie z. B. Feature Aligner lassen sich unter anderem 4 Transmembrandomänen vorhersagen. Dabei würde die erste Transmembrandomäne die Aminosäuren 17 - 37, die zweite die Aminosäuren 92 - 112 umfassen, und die dritte Domäne wäre an Position 114 - 134 zu finden. Die vierte Transmembrandomäne würde von den Aminosäuren 135 - 155 gebildet. Ein anderes Berechnungsprogramm z. B. TMHMM nimmt drei Transmembrandomänen an, wobei im Vergleich zum VKORC1, für die drei Domänen bestätigt wurden [Tie et al., 2005], diese in den Aminosäurepositionen leicht verschoben sind. Dies liegt unter anderem an den hydrophilen Eigenschaften der konservierten und L1-spezifischen Aminosäuren, die sich in der zweiten und dritten Transmembrandomäne befinden. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den beiden Proteinen und der experimentellen Bestätigung von drei Domänen im VKORC1 ist die Annahme von ebenfalls drei Transmembrandomänen für das VKORC1L1 und deren Lokalisation an den entsprechenden Positionen sehr wahrscheinlich. Darüber hinaus sprechen auch die konservierten Aminosäuren des VKORC1L1 und des VKORC1 von Fischen an der Grenze zwischen Cytoplasma und der Membran für die Position der drei Transmembrandomänen wie sie in Abbildung 46 gezeigt ist. Bei zufälliger Mutation und ohne Selektion wäre zu erwarten, dass die konservierten und die VKORC1L1-spezifischen Aminosäuren auf das gesamte Protein verteilt sind. Das Alignment und das daraus resultierende Proteinmodell (vgl. Abb. 46) zeigen dagegen, dass die L1-spezifischen Aminosäuren sich auf spezielle Positionen wie vor allem auf den Übergangsbereich zwischen Cytoplasma und Transmembrandomäne und innerhalb der zweiten und dritten Domäne

konzentrieren. Des Weiteren sind die L1-spezifischen Aminosäuren häufig unmittelbar hintereinander angeordnet. Die Grenzbereiche 30 - 34 der ersten Transmembrandomäne, 96 - 100 der zweiten und 150 - 154 der dritten Transmembrandomäne in der Abbildung 46 könnten darüber hinaus ein Hinweis sein, dass die genaue Lokalisation dieser Grenzflächen zwischen Cytoplasma und Membran funktionell wichtig ist. Die Aminosäuren, die im cytoplasmatischen Teil des Proteins an der Position 66 - 70 liegen und ebenfalls L1-spezifisch sind, könnten für eine weitere Bindung und Fixierung des Substrats zuständig sein, so dass es in den Bereich zwischen zweiter und dritter Transmembrandomäne eingebracht wird. Innerhalb der hydrophoben Membran befinden sich nun das reaktive Redoxzentrum mit dem CIVC-Motiv, sowie die angenommene Warfarinbindungsstelle, das TYA-Motiv. Diesen wichtigen Positionen direkt gegenüber liegen übereinander gelagert vier Aminosäuren in der zweiten Domäne, die VKORC1L1-spezifisch sind und jeweils im Abstand von vier Aminosäuren auftreten. Geht man von einer Helix-Anordnung der Aminosäuren aus, würden die jeweils vierten Aminosäuren das Rückgrat dieser Struktur bilden. Dies spricht für eine wichtige funktionale Aufgabe der Aminosäuren bei der Umsetzung des Substrats in diesem Bereich. Zum anderen könnte dieser Abschnitt gemeinsam mit den katalytischen Einheiten in der dritten Transmembrandomäne zusammenwirken und so die enzymatische Aktivität des Proteins unterstützen und gewährleisten.

4.3.2 Evolutiver Stammbaum

Für die Erstellung eines evolutiven Stammbaums wurden die Aminosäuresequenzen des VKORC1- und des VKORC1L1-Proteins verglichen. Über Algorithmen von Computerprogrammen (z. B. CAMA) kann die evolutive Konservierung und Entwicklung dieser Proteine nachvollzogen werden. Mittels der phylogenetischen Analysen konnte aufgeklärt werden, dass das VKORC1- und das VKORC1L1-Protein in aller Wahrscheinlichkeit aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein durch eine Duplikation entstanden sind, als sich die Vertebraten im Kambrium vor 488 - 542 Millionen Jahren entwickelt haben. Bei den rezenten Spezies sind die C1- und L1-Familien klar zu unterscheiden (Abb. 45). Interessant ist die Sonderstellung der Fische innerhalb beider Familien. Sie besitzen ein VKORC1-Protein, welches an sehr vielen Positionen Aminosäuren aufweist, die dem VKORC1L1-Protein der übrigen Vertebraten entsprechen. Bei Betrachtung der Gesamtsequenz ist dennoch die Zuordnung zu der C1- bzw. L1-Familie unzweideutig. Dies deutet darauf hin, dass bei den Fischen das VKORC1L1- und das VKORC1-Protein nach der Duplikation noch keine jeweils spezifischen Funktionen übernommen haben,

sondern eventuell gemeinsam eine Aufgabe wahrnehmen. Auch ein Gen-Dosiseffekt ist denkbar. Erst mit dem Landgang der Vertebraten vor 365 Millionen hat sich anscheinend mit der Zeit die spezifische Funktion des VKORC1-Proteins ausgebildet, die in den im Wasser lebenden Lebewesen noch nicht erforderlich war.

Die essentielle Rolle des VKORC1 im Vitamin K-Zyklus und damit in der Blutgerinnung ist eine hoch spezialisierte Funktion, die vor der Entwicklung eines zirkulierenden Blutes nicht erforderlich war. Nahezu alle untersuchten Prokaryonten und viele Invertebraten weisen aber ein VKOR-ähnliches Gen auf [Goodstadt und Ponting, 2004]. Es kann vermutet werden, dass die VKORC1L1-Proteine eher die ursprüngliche Funktion dieser Proteine beibehalten, die sie bereits vor der Duplikation ausgeführt haben. Ein Beleg dafür ist die - im Vergleich zu VKORC1 - höhere Konservierung des VKORC1L1-Proteins zwischen den Spezies und die hohe Homologie des VKORC1L1 zum prokaryotischen „Vorläuferprotein“. Somit scheint das VKORC1L1-Protein essentielle Funktionen im Organismus zu übernehmen, die bereits vor der Entstehung der Landvertebraten von großer Bedeutung für das Überleben der verschiedenen Spezies waren.

4.3.3 Homologievergleich von Chromosomen verschiedener Spezies zum Menschen

Es konnte durch bioinformatische Analyse gezeigt werden, dass der Entstehung von VKORC1 und VKORC1L1 höchstwahrscheinlich eine Duplikation eines Vorläufergens zugrunde liegt. Um nun zu untersuchen, ob sich diese Genduplikation noch in einer rezenten Spezies durch der Lokalisation der beiden Gene auf demselben Chromosom fassen lässt, wurde die Homologie der Chromosomen analysiert. Beim Menschen liegt das VKORC1-Gen auf Chromosom 16 und das VKORC1L1-Gen auf Chromosom 7. Für fast alle untersuchten Spezies liegen die beiden Gene auf unterschiedlichen Chromosomen, die jeweiligen Chromosomenabschnitte und genetischen Kopplungsgruppen entsprechen den VKORC1- und VKORC1L1-Genbereichen beim Menschen (vgl. Kap. 3.3.3). Eine Genduplikation muss demnach vor langer Zeit stattgefunden haben und ist nicht mehr in der Anordnung der Gene auf den Chromosomen erkennbar. Interessanter Weise finden sich bei Hund und Pferd dagegen die beiden Gene auf dem gleichen Chromosom. Um festzustellen, ob die beiden Gene durch zufällige Chromosomenumlagerungen unabhängig von der Duplikation des Vorläufergens auf demselben Chromosom zu finden sind, wurde die chromosomale Umgebung der Gene näher analysiert. Beim Pferd sind die betrachteten Gene sehr nah beieinander lokalisiert und nur durch einen 0,9 Mb großen Chromosomenbereich voneinander

getrennt (vgl. Abb. 48). Beide Gene sind aber Teil zweier verschiedener größerer Chromosomenabschnitte, die sich „en bloc“ bei anderen Spezies unverändert wieder finden. Man kann also davon ausgehen, dass sie sich im Laufe der Evolution durch Fusion der Chromosomenabschnitte zufällig auf dem Chromosom 13 „wiedergefunden“ haben. Beim Hund liegen beide Gene zwar auf demselben Chromosom 6, sind aber durch 16,4 Mb voneinander getrennt. Wie aus Abb. 48 ersichtlich, ist das C1-Gen (weiterhin) Teil eines größeren konservierten Blocks, während das L1-Gen völlig isoliert liegt. Auch das spricht für eine zufällig, sekundäre Syntenie, die nicht mit der angenommenen Genduplikation zu tun hat. In den betrachteten rezenten Spezies findet sich also kein chromosomaler „Fußabdruck“ der postulierten Genduplikation.

4.4 Ausblick

Kenntnisse über den Vitamin K-Zyklus, seine beteiligten Komponenten sowie deren Reaktionsmechanismen und die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des VKORC1 eröffnen die Möglichkeit, neue für die Gerinnungshemmung effektivere Medikamente mit weniger starken Nebenwirkungen als die momentan eingesetzten Vitamin K Antagonisten zu entwickeln. Auch könnten langfristig Coumarinderivate generiert werden, die eine vereinfachte Dosierung und so eine bessere Einstellung des Patienten auf das Präparat ermöglichen. Im Zusammenhang mit der Proteinaufreinigung des VKORC1-Proteins ließen sich auch Bindungsstudien des Warfarins an das kristallisierte und reine VKORC1 mit anschließender Röntgenstrukturanalyse durchführen. Dies könnte dazu dienen, die Charakterisierung der exakten Bindungsstellen von Vitamin K aufzuklären und den Wirkmechanismus der Coumarine als Vitamin K-Antagonisten auch auf molekularer Basis besser zu verstehen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main der Versuch einer Aufreinigung und der Kristallisation des VKORC1- und des VKORC1L1-Proteins unternommen. Die Proteine konnten bereits in großen Mengen in der Hefe *Pichia pastoris* rekombinant exprimiert werden. Allerdings erwies sich die Aufrechterhaltung der Reduktase-Funktion bzw. die Solubilisierung der integralen Membranproteine als sehr schwierig. Die Strukturaufklärung des VKORC1L1-Proteins könnte Hinweise auf Substratbindungspartner und so auf seinen Wirkungsort geben. Weiterhin wäre die Aufreinigung der beiden homologen Proteine wichtig für die Herstellung von Antikörpern gegen spezifische Epitope, so dass Coimmunopräzipitationen die Identifizierung weiterer Bindungspartner für das VKORC1 und das VKORC1L1 möglich machen. Die Interaktionspartnersuche ist besonders auch für das VKORC1L1-Protein interessant, da seine Funktionen und die Stoffwechselwege, in welche es involviert ist, noch nicht aufgeklärt werden konnten. Der Phänotyp einer VKORC1L1-Knockout-Maus könnte im Hinblick darauf ebenfalls Aufschluss geben, so dass die Generierung dieser Maus weiterhin ein wichtiges Ziel ist. Da eine VKORC1-Knockout-Maus bereits existiert, wäre eine Kreuzung der beiden transgenen Tiere zur Schaffung einer Doppelknockout-Maus ein weiteres interessantes Forschungsgebiet. So könnten Einblicke gewonnen werden, ob die beiden Proteine miteinander interagieren und sich in ihrer Funktion beeinflussen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	Acomys
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	bis / auf
a.d.	aqua dest
Ann.-Temp.	Annealingtemperatur
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
c	Konzentration
C	Cytosin
ca.	circa
C1	VKORC1
L1	VKORC1L1
CCD	(charge coupled-device)-Kamera
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4 ⁻ - 6 ⁻ - diamidino- 2- phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
GF	Growth factor
GGCX	γ-Glutamyl-Carboxylase
E	Enzym
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERO 1	Endoplasmatische-Retikulum-Oxidase 1
ES	embryonale Stammzellen
et al.	et altera (und andere)
F	Forward-Primer
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
Fr	Fragment
G	Guanin
G418	Geneticin
γ -CRS	γ-Carboxylierungserkennungssequenz
Gla	γ-Carboxyglutaminsäure
Glu	γ-Glutaminsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
h	human
HEK	“human embryonic kidney cells”
HPLC	“high performance liquid chromatografie”
HR	homologe Rekombination
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knockout
kDa	Kilodalton
μCi	mikroCurie
μl	Mikroliter
m	Maus
Mb	Megabase

MCS	Multiple Cloning Site
MGP	Matrix Gla Protein
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
min	Minute
MMC	Mitomycin C
mRNA	messenger-RNA
Neo	Neomycin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Produkt
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
r	Ratte
R	Reverse-Primer
RGB	Rot-Grün-Blau -Bild
RNA	Ribonukleinsäure
S	Substrat
sec	Sekunde
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHBD	Steroidhormon-Bindungsdomänen
SKY	Spektrale Karyotypisierung
SNP	“single nucleotide polymorphism”: einzelner polymorpher Basenaustausch
SP	Serinprotease
Std.	Stunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TK	Thymidin-Kinase
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ μ l	Unit (Enzymeinheit) pro Mikroliter
UV	ultraviolett
V	Volt
V_0	Katalysegeschwindigkeit
VKCFD	kombinierter Mangel aller Vitamin K-abhängigen Faktoren
Vol	Volumen
VKD	Vitamin K-abhängige Proteine
VKOR	Vitamin K-2,3- Epoxid-Reduktase
VKORC1	Vitamin K-2,3- Epoxid-Reduktase
VKORC1L1	Vitamin K-2,3- Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1 Protein
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
WT	Wildtyp

LITERATURVERZEICHNIS

Austin S., Ziese M., Sternberg N., 1981: A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729 - 736.

Bachhuber et al., 2004: Hämophilie – Die Antworten. *Eschig Verlag*, 2. Auflage: 13.

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., Matschiner J. T., 1970: Vitamin K activity of phyllochinone oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 141(2): 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., Runge K. W., 2004: The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* 2: 2118 - 2132.

Biesalsky, H. K. (Hrsg.): Ernährungsmethodik. 2. Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart 1999.

Binkley S. B., MacCorquodale D. W., Thayer S. A., Boisy E. A., 1939: The isolation of vitamin K₁. *J. Biol. Chem.* 130: 219 - 234.

Bolton-Maggs P. H. B., Pasi K. J., 2003: Haemophilias A and B. *Lancet* 361: 1801 - 1809.

Booth S. L., Suttie J. W., 1998: 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.

Bowen D. J., 2002: Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55: 1 - 18.

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

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.

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-Epoxide Reductase Enzyme Complex in the Endoplasmatic 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-epoxide reductase enzyme complex in rat liver. *Thromb. Haemost.* 80: 128 - 133.
- Capecchi M. R.**, 1989: Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288 - 1292.
- 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.
- Chu P.-H., Huang T.-Y., Williamson J., Stafford D. W.**, 2006: Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for the conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 19308 - 19313.
- Citarella F., Wuillemin W. A., Lubbers Y. T. P., Hack C. E.**, 1997: Initiation of contact system activation in plasma is dependant on factor XII autoactivation and not on enhanced susceptibility of factor XII for kallikrein cleavage. *Br. J. Haematol.* 99: 197 - 205.
- 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.
- Corpet F.**, 1988: Multiple sequence alignment with hierarchial clustering. *Nucl. Acids Res.* 16(22): 10881 - 10890.
- Dam H.**, 1929: Cholesterinstoffwechsel in Hühnereiern und Hühnchen. *Biochem. Zeitschrift* 215: 475 - 492.
- Dam H.**, 1935: The antihæmorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J.* 29(6): 1273 - 1285.
- D'Andrea G., D'Ambrosio R. L., Di Perna P., Chetta M., Santacroce R., Brancaccio V., Grandone E., Marqaqlione M.**, 2005: A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105(2): 645 - 649.
- Desideri D., Aldighieri R., Lovet M. L., Tardieu A.**, 1978: Note preliminaire sur la mise en évidence, a Marseille, d'une résistance au coumaféne chez *Rattus rattus*. *Bull. Soc. pathol. Exot.* 71: 210 - 215.
- Docherty K.**, 1996: Transgenic animals. *Proc. Nut. Soc.* 55: 613 - 618.
- Dodds W. J.**, 1980: Hemostasis and coagulation. in: KANEKO, J. J.: Clinical biochemistry of domestic animals. 3. Aufl., *Academic Press Inc.*, New York: 671 - 718.
- 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.
- Ducy P. et al.**, 1996: Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590): 448 - 452.
- Dupé V., Davenne M., Brocard J., Dolle P., Mark M., Dierich A., Chambon P., Rijli F. M.** 1997: In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124: 399 - 410.
- Esmon C. T.**, 2000: Regulation of blood coagulation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1477: 349 - 360.
- Espana F., Ratnoff O. D.**, 1983: Activation of Hageman factor by sulfatides in the absence of plasma proteases. *J. Lab. Clin. Med.* 102: 31 - 45.
- Evans M. J., Kaufman M. H.**, 1981: Establishment in culture in pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154 - 156.
- Felsenstein J.**, 1989: PHYLIP - Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164 - 166.
- Felsenstein J.**, 2005: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fraser J. D., Price P. A.**, 1988: Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla-protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J. Biol. Chem.* 263(23): 11033 - 11036.
- Fregin A., Rost S., Wolz W., Kresova 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., Bouchard B. A., Furie B. C.**, 1999: Vitamin K dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 93(6): 1798 - 1808.
- Gage B. F., Lesko L. J.**, 2008: Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis* 25(1): 45 - 51.
- Garini Y., Maville M., Manoir S., Buckwald R. A., Laci M., Katzir N., Wine D., Bar-Am I., Schröck E., Cabib D., Ried T.**, 1996: Spectral karyotyping. *Bioimaging* 4:65 - 72.
- Geleijnse J. M., Vermeer C., Grobbee D. E., Schuggers L. J., Knapen M. H., van der Meer I. M., Hofman A., Witteman J. C.**, 2004: Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr.* 134(11): 3100 - 3105.
- Gill C. J.**, 2004: Diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 18(6): 1277 - 1299.

- Goodstadt L., Ponting C. P.**, 2004: Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends. Biochem. Sci.* 29: 289 - 292.
- 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.
- Graw J., Brackmann H.-H., Oldenburg J., Schneppenheim R., Spannagl M., Schwaab R.**, 2005: Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet.* 6(6): 488 - 501.
- Greaves J. H., Ayres P.**, 1967: Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature* 215: 877 - 878.
- Greaves J. H., Sheperd D. S., Qui R.**, 1982: Field trials of second-generation anticoagulant against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J. Hygiene* 89: 295 - 301.
- Gu H., Marth J. D., Orban P. C., Mossmann H., Rajewsky K.**, 1994: Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103 - 106.
- Guo F., Gopaul D. N., van Duyne G. D.**, 1997: Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389: 40 - 46.
- Hall J. M. et al.**, 1972: Structure and function of oxidation-reduction enzymes. Pergamon Press, Oxford: 433 - 443.
- Hasty P., Rivera-Perez J., Bradley A.**, 1991: The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11(11): 5586 - 5591.
- Honore B., Vorum H.**, 2000: The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett* 466(1): 11 - 18.
- Iwamoto J., Takeda T., Sato Y.**, 2004: Effects of vitamin K2 on osteoporosis. *Curr Pharm Des.* 10(21): 2557-2576.
- Jackson W. B., Ashton A. D., Delventhal K.**, 1988: Overview of anticoagulant rodenticide usage and resistance. *Current Advances in Vitamin K Research* (Suttie J. W., Hg.), Elsevier, New York.
- Jaenisch R.**, 1988: Transgenic animals. *Science* 240: 1468 - 1474.
- Joermann G., Gemmeke H., Pelz H.-J., Lauenstein G., Nachtigall G.**, 2001: Was tun gegen Ratten und Hausmäuse? - Hinweise zur sachgerechten Anwendung von Mitteln zur Nagetierbekämpfung.
- Jin D.-Y., Tie J.-K., Stafford D. W.**, 2007: The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines. *Biochemistry* 46: 7279 - 7283.

- 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(2):185 - 191.
- Joyner A. L.,** 1991: Gene targeting and gene-trap screens using embryonic stem cells: new approaches to mammalian development. *BioEssays* 13: 649 - 656.
- Joyner A. L.,** 1993: Gene Targeting. A practical approach. New York: *IRL Press at Oxford University Press.*
- 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.
- Köhler M. R., Gräve W.,** 1999: SKY (Spectral Karyotyping): Ein neues, molekularzytogenetisches Verfahren zur Chromosomenanalyse. *Biospektrum* 1/ 1999, 5. Jahrgang.
- 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(17): 9058 - 9062.
- Kulman J. D., Harries 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(4): 1370 - 1375.
- Kulman J. D., Harris J. E., Nakazawa N., Ogasawara M., Satake M., Davie E. W.,** 2006: Vitamin K-dependent proteins in *Ciona intestinalis*, a basal chordate lacking a blood coagulation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(43): 15794 - 15799.
- Kulman J. D., Harris J. E., Xie L., Davie E. W.,** 2007: Proline-rich Gla protein 2 is a cell-surface vitamin K-dependent protein that binds to the transcriptional coactivator Yes-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(21): 8767 - 8772.
- 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.
- Lasseur R., Grandemange A., Longin-Sauvageon C., Berny P., Benoit E.,** 2006: Heterogeneity of the coumarin anticoagulant targeted vitamin K epoxide reduction system. Study of kinetic parameters in susceptible and resistant mice (*mus musculus domesticus*). *J Biochem Mol Toxicol* 20(5): 221 - 229.
- 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.
- Li T., Lange L. A., Li X., Susswein L., Bryant B., Malone R., Lange E. M., Huang T. Y., Stafford D. W., Evans J. P.,** 2006: Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. *J. Med. Genet.* 43(9): 740 - 744.
- Linnemann M., Kühl M.,** 2004: Biochemie für Mediziner. *Springer Verlag* 7. Auflage.

- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Disteché C. M., Bronstein P., Jaenisch R.**, 1997: Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Developmental Dynamics* 209: 85 - 91.
- Liyanage M., Coleman A., du Manoir S., Veldman T., McCormack S., Dickson R. B., Barlow C., Wynshaw-Boris A., Janz S., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Schröck E., Ried T.**, 1996: Multicolour Spectral Karyotyping of Mouse Chromosomes. *Nature Genetics* 14: 312 - 315.
- 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(6620): 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 dicoumarol-binding site in rat liver NAD(P)H: quinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 267: 22298 - 22204.
- Mahmoud W., Redfern R.**, 1981: The response of the Egyptian spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and the two other species of commensal rodents to anticoagulant rodenticides. *J. Hyg. (Lond)* 86(3): 329 - 334.
- Malik Z., Cabib D., Buckwald R. A., Talmi A., Garini Y., Lipson S. G.**, 1996: Fourier Transform Multipixel Spectroscopy for Quantitative Cytology. *J. Microscopy* 182: 133 - 140.
- Mann, K. G. Lorand L.**, (1993): Proteolytic enzymes in coagulation, fibrinolysis, and complement activation. Part A: Mammalian Blood Coagulation Factors and Inhibitors. *Methods in Enzymology, Academic Press Inc., San Diego* 222: 1 - 10.
- Marchetti G., Caruso P., Lunghi B., Pinotti M., Lapecorella M., Napolitano M., Canella A., Mariani G., Bernardi F.**, 2008: Vitamin K-induced modification of coagulation phenotype in VKORC1 homozygous deficiency. *J. Thromb. Haemost.* 6(5): 797 - 803.
- Martin G. R.**, 1981: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned in teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7634 - 7638.
- McMahon A. P., Bradley A.**, 1990: The Wnt-12 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62: 1073 - 1085.
- Melcher R., Steinlein C., Feichtinger W., Müller C. R., Menzel T., Lührs H., Scheppach W., Schmid M.**, 2000: Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet. Cell Genet.* 88: 145 - 152.
- Miyata M., Kudo G., Lee Y. H., Yang T. J., Gelboin H. V., Fernandez-Salguero P., Kimura S., Gonzalez F., J.**, 1999: Targeted disruption of the microsomal epoxide hydrolase gene. Microsomal epoxide hydrolase is required for the carcinogenic activity of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Biol Chem* 274: 23963 - 23968.
- 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.

- Mullis K. B., Faloona F. A.**, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* 155: 335 - 350.
- Myszka D. G., Swenson R. P.**, 1991: Synthesis of the photoaffinity probe 3-(p-azidobenzyl)-4-hydroxycoumarin and identification of the dicoumarol binding site in rat liver NAD(P)H:quinone reductase (EC 1.6.99.2) *J Biol Chem* 266: 4789 - 4797.
- Nakagaki, T., Foster D. C., Berkner K. L., Kisiel W.**, 1991: Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: Evidence for the tissue factor dependant autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochem.* 30: 10819 - 10824.
- Nelsestuen G. L., Zytkevich T. H., Howard J. 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.
- Newman P., Shearer M. J.**, 1998: Vitamin K metabolism. *Subcell Biochem.* 30: 455 - 488.
- 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.
- Oldenburg J., Bevans C. G., Müller C. R., Watzka M.**, 2006: Vitamin K epoxy reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid Redox Signal* 8(3-4): 347 - 353.
- Oldenburg J., Watzka M., Rost S., Müller R.**, 2007: VKORC1: molecular target of coumarins. *J. Thromb. Haemost.* 4 (Suppl. 1): 1 - 6.
- Olds-Clarke P.**, 1989: Sperm from tw32/+ mice: capacitation is normal, but hyperactivation is premature and nonhyperactivated sperm are slow. *Dev Biol.* 131(2): 475 - 482.
- Penzlin H.**, 1996: *Lehrbuch der Tierphysiologie*, Gustav Fischer Verlag
- Pelz H.-J.**, 1990: Resistenzprobleme bei der Bekämpfung von Ratten und Hausmäusen mit Antikoagulantien. *Gesunde Pflanzen* 42: 435 - 439.
- Pelz H.-J., Rost S., Huenerberg M., Fregin A., Heiberg A. C., Baert K., MacNicoll 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.
- Plaza S. M., Lamson D. W.**, 2005: Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Altern. Med. Rev.* Bd. 10, Nr. 1, S. 24 - 35.
- Ratnoff O.D., Davie E. W.**, 1962: The activation of Christmas factor (factor IX) by activated plasma thromboplastin antecedent (activated factor XI). *Biochemistry* 1: 677 - 685.
- Reddigari S. R., Shibayama Y., Brunnee T., Kaplan A. P.**, 1993: Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 268: 11982 - 11987.

Renz-Polster H., Krautzig S., 2008: *Basislehrbuch Innere Medizin* 4.Auflage: 342 ff.

Riddel, J. P. Jr., Aouizerat B. E., Miaskowski C., Lillicrap D. P., 2007: Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 24(3): 123 - 131.

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 transkriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 352(22): 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.

Rishavy M. A., Pudota B. N., Hallgren K. W., Qian W., Yakubenko A. V., Song J.-H., Runge K. W., Berkner K. L., 2004: A new model for vitamin K-dependent carboxylation: the catalytic base that deprotonates vitamin K hydrochinone is not Cys but an activated amine. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(38): 13732 - 13737.

Rishavy M. A., Hallgren K. W., Yakubenko A. V., Shtofman R. L., Runge K. W., Berkner K. L., 2006: Brønsted analysis reveals Lys218 as the carboxylase active site base that deprotonates vitamin K hydrochinone to initiate Vitamin k-dependent protein carboxylation. *Biochemistry* 45: 13239 - 13248.

Robertson J., Lillicrap D., James P. D., 2008: Von Willebrand disease. *Pediatr Clin North Am.* 55(2): 377 - 392.

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: 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: 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., 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.

Rost S., Geisen C., Fregin A., Seifried E., Müller C. R., Oldenburg J., 2006: Founder mutation Arg485Pro led to recurrent compound heterozygous GGCX genotypes in two German patients with VKCFD type I. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 17(6): 503 - 507.

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. Hygiene* 81: 197 - 201.

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.**, 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12): 5463 - 5467.
- Sauer B.**, 1987: Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 2087 - 2096.
- Saxena S. P., Israels E. D., Israels L. G.**, 2001: Novel vitamin K-dependent pathway regulating cell survival. *Apoptosis* 6: 57 - 68.
- Schmidt-Krey I., Haase W., Mutucumarana V., Stafford D. W., Kühlbrandt W.**, 2007: Two-dimensional crystallisation of human vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase. *J Struct Biol.* 157(2): 437 - 442.
- Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T.**, 1996: Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 273: 494 - 497.
- Schurgers L. J., Dissel P. E., Spronk H. M., Soute B. A., Dhore C. R., Cleutjens J. P., Vermeer C.**, 2001: Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Z. Kardiol.* 90 Suppl. 3: 57 - 63.
- Schwenk F., Baron U., Rajewsky K.**, 1995: A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP- flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23: 5080 - 5081.
- Setzer H. W.**, 1959: The spiny mice (*Acomys*) of Egypt. *Journal of the Egyptian Public Health Association* 34(3): 127 - 146.
- Shaw E., Giddings J. C., Peake I. R., Bloom A. L.**, 1979: Synthesis of procoagulant factor VIII, factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. *Br J Haematol.* 41(4): 585 - 596.
- Shearer M. J., McBurney A., Barkhan P.**, 1974: Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man. *Vitam Horm* 32: 513 - 542.
- 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.
- Silver L. M.**, 1995: Mouse Genetics. *Oxford University Press.*
- Silverberg M., Dunn J. T., Garen L., Kaplan A. P.**, 1980: Autoactivation of human Hageman factor: Demonstration utilizing a synthetic substrate. *J. Biol. Chem.* 255: 7281 - 7286.
- 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.
- 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.
- Stafford D. W.,** 2005: the vitamin K cycle. *J. Thromb. Haemost.* 3: 1873 - 1878.
- 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.
- 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., Roepstorff 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.
- Stryer L.,** 2003: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Sugawara A., Goto K., Sofuni T., Ito T.,** 2006: Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan. *Comp Med.* 56(1): 31 - 34.
- Sung H. Y., Song J., Lee H.-W.,** 2004: Functional genomics Approach using mice. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37(1): 122 - 132.
- Suttie J. W.,** 1988: Vitamin K-dependent carboxylation of glutamyl residues in proteins. *Biofactors* 1: 55 - 60.
- Suttie J. W.,** 1994: Vitamin K Antagonists. *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (Colman R. W., Hirsh J., Marder V. J., Salzman E. W., Hg.), J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Suttie J. W.,** 1995: The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 15: 399 - 417.
- 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 longterm treatment. *Blood* 96: 1816 - 1819.

- Thijssen H. H., Janssen Y. P., Vervoort L. T.,** 1994: Microsomal lipoamide reductase provides vitamin K epoxide reductase with reducing equivalents. *Biochem. J.* 297: 277 - 280.
- Thomas K. R., Capecchi M. R.,** 1987: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryoderived. *Cell* 51(3):503 - 512.
- 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.
- Tie J., Nicchitta C., von Heijne C., Stafford D. W.,** 2005: Membrane topology mapping of Vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/ cotranslation. *J. Biol Chem.* 280(16): 16410 - 16416.
- Usui Y., Tanimura H., Nishimura N., Kobayashi N., Okanoue T., Ozawa K.,** 1990: Vitamin K concentrations in the plasma and liver of surgical patients. *Am J Clin Nutr* 51: 846 - 852.
- Wajih, N., Sane D. C., Hutson S. M., Wallin R.,** 2004: The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 279(24): 25276 - 25283.
- Wajih N., Sane D. C., Hutson S. M., Wallin R.,** 2005: Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxyglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem* 280: 10540 - 10547.
- Wajih N., Hutson S., Wallin R.,** 2007: Disulfid dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmatic reticulum: A protein disulfid isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxid reduction. *J. Biol. Chem.* 282(4): 2626 - 2635.
- 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 (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone)-dependent carboxylation reaction. *Biochem J.* 169: 95 - 101.
- 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(13): 2542 - 2544.
- Wang C. P., Yagi K., Lin D. Y., Makabe K. W., Stafford D. W.,** 2003: Identification of a gene encoding a typical gamma-carboxyglutamic acid domain in the tunicate *Halocynthia roretzi*. *J Thromb Haemost.* 1(1): 118 - 123.

- Wang D., Chen H., Momary K. M., Cavallari L. H., Johnson J. A., Sadée W.,** 2008: Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood* 112(4): 1013 - 1021.
- Wilson D. E., Reeder D. M.,** 1993: Mammal Species of the World: A taxonomic and geographic reference. *Smithsonian Books*.
- Wilson D. E., Reeder D. M.,** 2005: Mammal Species of the World. *John Hopkins University Press*.
- 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.
- Yang Z.,** 1997: PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13(5): 555 - 556.
- Yang Z.,** 2007: PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 24(8): 1586 - 1591.
- Yin T., Hanada H., Miyashita K., Kokubo Y. et al.,** 2008: No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 like 1 (VKORC1L1) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population. *Thrombosis Research* 122(2): 179 - 184.
- Yin T., Miyata T.,** 2007: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1-rationale and perspectives. *Thrombosis Research* 120(1): 1 - 10.
- Zhang B., Ginsburg D.,** 2004: Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2: 1564 - 1572.
- Zijlstra M., Bix M., Simister N. E., Loring J. M., Raulet D. H., Jaenisch R.,** 1990: Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 344: 742 - 746.

POSTERPRÄSENTATIONEN

„On the molecular basis of warfarin resistance in rats“

Humangenetikkonferenz der European Society of Human Genetics (ESHG) in München, Juni 2004.

„Site-directed mutagenesis of VKORC1, the target protein of coumarin-type anticoagulants“

35. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2004.

„On the molecular basis of warfarin resistance in rats“

36. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2005.

„Creation and characterization of a knockout mouse for the VKORC1L1-gene“

37. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2006.

„Novel variants in VKORC1 – the target protein of coumarin-type anticoagulants – in rodents from warfarin-resistance areas in Europe, Asia and America“

37. Hämophilie-Symposium in Hamburg, November 2006.

„Creation and characterization of a knockout mouse for the VKORC1L1-gene“

19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Bonn, März 2007.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Pelz H.-J., Rost S., Huenerberg M., Fregin A., Heiberg A. C., Baert K., MacNicoll 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.

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.

Teile der vorliegenden Dissertation werden in folgender Publikation veröffentlicht:

Schwarz R., Seibel P. N., Rahmann S., Schoen C., Huenerberg M., Müller C. R., Dandekar T., Karchin R., Schultz J., Müller T.: „Detecting species-site dependencies in large multiple sequence alignments” *Bioinformatics* (eingereicht im Januar 2009)

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Clemens Müller-Reible für die Möglichkeit, diese Arbeit zu dem spannenden Thema am Institut für Humangenetik anfertigen zu können. Ich möchte mich ganz herzlich für die theoretische und praktische Unterstützung und Betreuung während dieser Zeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Johannes Oldenburg vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Bonn, der das Projekt mitbetreut hat und mit vielen hilfreichen Anregungen zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Krohne vom Lehrstuhl für Zoologie I möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken, für die er sich freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Jens Brüning vom Institut für Genetik in Köln für die gute Kooperation und Zusammenarbeit. So war es mir möglich, in seiner Arbeitsgruppe die Transfektionen für die Knockout-Maus durchzuführen und die Chimären zu generieren.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Gabi Spohn, Dr. André Kleinridders und Dr. Thomas Wunderlich vom Institut für Genetik in Köln für die gute Zusammenarbeit am Knockout-Mausprojekt, die fachliche Unterstützung und für die Einarbeitung in die Stammzellkultur.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Jörg Schultz vom Lehrstuhl für Bioinformatik, der mich bei den bioinformatischen Analysen sehr unterstützt hat.

Ein großes Dankeschön spreche ich Claus Steinlein aus für die tolle fachliche Betreuung und für die Einarbeitung in die Karyotypbestimmung mittels SKY-Analyse.

Dr. Andreas Fregin, Dr. Simone Hasenmüller und Anne Schaafhausen möchte ich besonders für die gemeinsame gute und freundschaftliche Zusammenarbeit am Vitamin K-Projekt danken. Sie waren mir in jeglicher Hinsicht eine große Hilfe und Unterstützung und standen mir bei theoretischen und praktischen Fragen stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die mich mit ihrer Hilfsbereitschaft und Gesprächen die Zeit über begleitet und für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Mein besonderer Dank geht dabei an Katrin Voß für ihre aufmunternden Worte und ihre Diskussionsbereitschaft.

Ein ganz lieber Dank geht an Philipp für seinen Rückhalt und seine Ermutigung in dieser Zeit.

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Anja für die Unterstützung, die vielen guten Ratschläge sowie für ihre Geduld und ihr Verständnis bedanken. Kiitos Teille!

CURRICULUM VITAE

Name: Mirja Maaret Hünenberg
Geburtsdatum: 10.08.1979
Geburtsort: Helsinki/ Finnland
Staatsangehörigkeit: deutsch-finnisch

Schulbildung:

1986-1990 Grundschule Hoheneggelsen

1990-1999 Gymnasium Marienschule Hildesheim
Leistungskurse: Biologie und Chemie
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1999-2004 Diplom-Studium der Biologie an der Universität Würzburg
Hauptfach: Neurobiologie
Nebenfächer: Mikrobiologie, Genetik

Oktober 2003-
Juli 2004 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Universität
Würzburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Clemens Müller-
Reible
Thema: „Enzymkinetische Untersuchungen und Warfarinhemmstudien
der Vitamin K-Epoxid-Reduktase *in vitro*“

seit Oktober 2004 Anfertigung der Promotionsarbeit am Institut für Humangenetik der
Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr.
Clemens Müller-Reible
Thema: „Erstcharakterisierung des Vitamin K-Epoxid-Reduktase
Komplex 1-like 1 Proteins“

Juni-September 2005 mehrmonatiger Aufenthalt in Köln zur Kooperation mit dem Institut
und Oktober 2006 für Genetik in Köln

Februar/ März 2003 Studentische Hilfskraft in der Tierphysiologie

Februar 2005 Teilnahme am Grundkurs Tierschutz- und Versuchstierkunde an der
Universität Würzburg

Fremdsprachenkenntnisse: Englisch, Französisch, Finnisch