

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik
des Universitäts-Krankenhaus Eppendorf
aus der Abteilung für Klinische Chemie
Direktor: Prof. Dr. C. Wagener

**Abwesenheit von Mutationen an der APC-Bindungsstelle und
an den APC-Schnittstellen Arginin³³⁶ und Arginin⁵⁶² des
Gerinnungsfaktor VIII bei 65 Patienten mit venöser Thrombose**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Janneke Ohlhoff aus Oldenburg i.O.

Hamburg 2001

Datum der Disputation: 11.04.2004

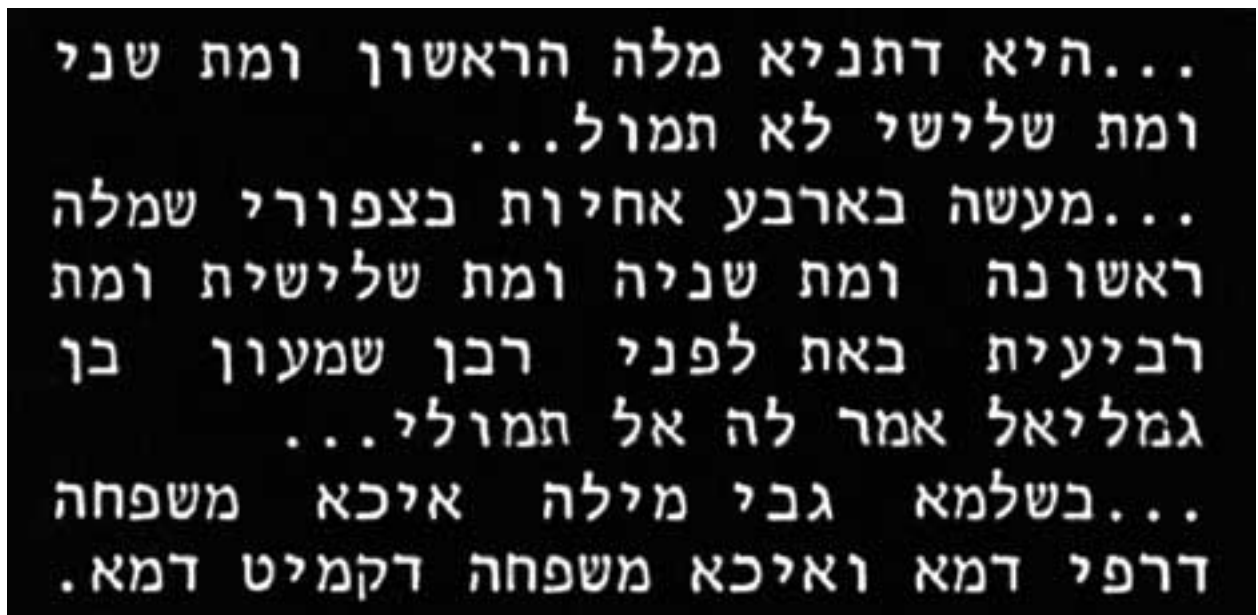
Gutachter: Prof. Dr. C. Wagener

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	4
2	PATIENTEN UND MATERIAL	11
2.1	PATIENTEN	11
2.1.1	PATIENTEN	11
2.1.2	KONTROLLGRUPPE	11
2.2	MATERIALIEN	11
2.2.1	ENZYME	11
2.2.2	CHEMIKALIEN	12
2.2.3	GERÄTE UND SOFTWARE	14
2.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	15
3	ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN	17
3.1	DNA-PRÄPARATION AUS VOLLBLUT	17
3.2	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA	17
3.3	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	18
3.3.1	VERWENDETE PRIMER	18
3.3.2	PRIMERSYNTHESE	19
3.3.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER PRIMER	20
3.3.4	PCR-BEDINGUNGEN	21
3.4	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN	26
3.5	SSCP-ANALYSE	27
3.5.1	GEL- UND LAUFBEDINGUNGEN	27
3.5.2	SILBERFÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN	27
3.6	DNA- SEQUENZANALYSE	28
3.6.1	AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN	28
3.6.2	SEQUENZIERUNGS-PCR	29
3.6.3	ALKOHOLISCHE FÄLLUNG	29
3.7	RESTRIKTIONSVERDAU VON PCR-PRODUKTEN	30

4	ERGEBNISSE	31
5	DISKUSSION	40
6	ZUSAMMENFASSUNG	48
7	LITERATUR	49
8	ANHANG	56
8.1	DANKSAGUNG	56
8.2	CURRICULUM VITAE	57
8.3	ERKLÄRUNG	59

1 Einleitung



... denn so wird gesagt: Wenn sie ihren ersten Sohn beschneidet, und er stirbt, und der zweite stirbt ebenfalls, dann muß sie ihren dritten Sohn nicht beschneiden...

... einst geschah es bei den vier Schwestern in Sephoris: Als die erste ihren Sohn beschnitt, so starb er, als die zweite ihren Sohn beschnitt, so starb auch er, und als die dritte beschnitt ihren Sohn, so starb dieser auch. Da ging die vierte Schwester zu Rabbi Simeon ben Gamaliel, der ihr sagte: du mußt deinen Sohn nicht beschneiden...

... bei einer Beschneidung kann man erkennen, daß das Blut der einen Familie weiterfließt und das Blut der anderen Familie festgehalten wird...

Abbildung 1: Zitat aus dem babylonischen Talmud (Traktat 64 b)

Dieses Zitat aus dem babylonischen Talmud (Traktat 64 b) ist in etwa 1500 Jahre alt und somit eine der ersten Veröffentlichungen zum Gerinnungssystem.

Während früher die Blutungen als Störung der Hämostase klinisch im Vordergrund standen, bestimmen heute jedoch die thromboembolischen Komplikationen den klinischen Alltag. Venöse Thrombosen sind eine Erkrankung, an der einer von 1000 Menschen im Jahr (Dahlbäck 2000) erkrankt, so daß der Thromboseprophylaxe eine besondere Stellung in der Medizin zukommt. Der Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) spielt sowohl bei der Hämophilie als auch bei der Thrombophilie eine Rolle. Der Gerinnungsfaktor VIII ist ein Cofaktor, der selbst nicht proteolytisch wirksam ist, jedoch in Komplex ge-

bunden mit Phospholipiden und Faktor IX die Aktivierung von Faktor X um ein Vielfaches beschleunigt. Die Inaktivierung von Faktor V und Faktor VIII erfolgt über das aktivierte Protein C (APC) mit seinem Cofaktor Protein S. Die meisten angeborenen Risikofaktoren, die die Balance zwischen der Gerinnung und der Antikoagulation stören, betreffen das Protein C-System. Der wohl bekannteste Risikofaktor ist die Faktor V-Leiden-Mutation, bei der ein einzelner Basenaustausch an der Base 1691 zu dem Verlust der Schnittstelle für das aktivierte Protein C führt. Der Ersatz von Adenin durch Guanin führt zu einem Einbau von Arginin statt Glutamin an Aminosäure 506 im *Faktor V*-Gen und resultiert in der APC-Resistenz bei 20-40 % der Thrombophilie-Patienten (Dahlbäck 2000). Diese APC-Resistenz ergibt sich aus zwei Mechanismen. Zum einen führt dieser Basenaustausch zum Verlust der APC-Schnittstelle, eine proteolytische Spaltung des aktivierten Faktor V wird verhindert, und daraus resultiert eine Hyperkoagulabilität. Zum anderen führt diese Mutation auch zum Verlust der Kofaktor-Funktion des Faktor V bei der Degradierung des aktivierten Faktor VIII. Das heterozygote Vorkommen steigert das Risiko eines thromboembolischen Geschehens um den Faktor 5-10. Bei einer homozygot vorliegenden Mutation steigt das Risiko sogar um den Faktor 50-100 (Dahlbäck 2000). In neueren Untersuchungen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen erhöhten Faktor VIII-Konzentrationen und einer erhöhten Thromboseneigung (Kamphuisen et al. 2000), deren Ursache nicht allein durch die Tatsache, daß der Faktor VIII zu den „Akute-Phase-Proteinen“ zählt, zu erklären ist. „Akute-Phase-Proteine“ sind Proteine, deren Konzentration im Plasma in akuten Phasen wie z.B. Streß, Unfall, Operation, Entzündung etc. erhöht ist. Das menschliche *Faktor VIII*-Gen wurde zwischen 1982 und 1984 von der Arbeitsgruppe Gitschier et al. (1984) kloniert und war zu der Zeit mit 186 000 Basenpaaren das größte beschriebene Gen überhaupt. Es ist am langen Arm des X-Chromosom an der distalen Bande (Xq28) lokalisiert (Poustka et al. 1991, Freije et al. 1992). Wie aus der Abbildung 2 ersichtlich ist, codieren 26 Exons den Faktor VIII, von denen 24 Exons zwischen 69 und 262 Basenpaaren groß sind. Die zwei verbleibenden Exons, Exon 14 und Exon 26, sind deutlich größer und enthalten 3106 und 1958 Basenpaare, wobei der Großteil von Exon 26 eine untranslatierte Sequenz ist. Die Faktor VIII-Sequenz ohne Introns besteht aus ungefähr 9000 Basenpaaren und kodiert ein Vorläuferprotein mit 2351 Aminosäuren. Wie ebenfalls aus der Abbildung 2 ersichtlich ist, liegen im Intron zwischen Exon 22 und Exon 23 zwei zusätzliche Transkripte, die F VIII A (Levinson et al. 1990) und F VIII B (Levinson et al. 1992) genannt werden.

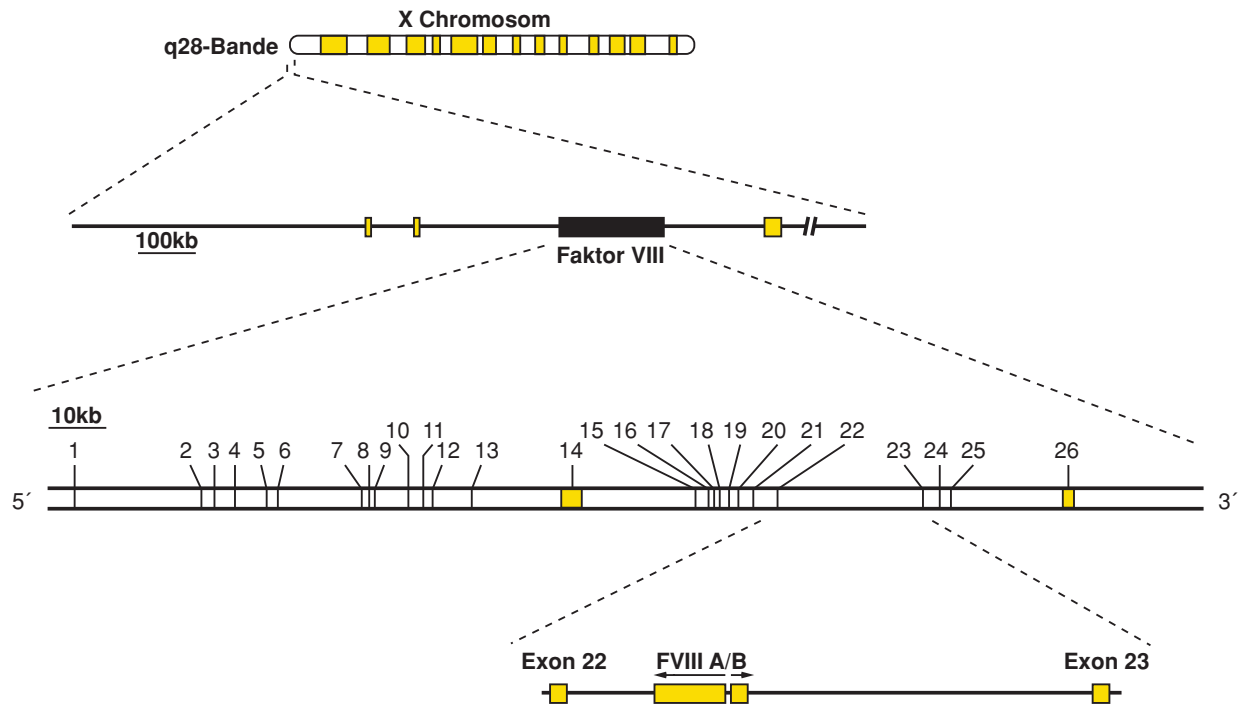


Abbildung 2: Genstruktur des humanen Gerinnungsfaktor VIII
(FVIII A und FVIII B sind zusätzliche Transkripte im Intron zwischen Exon 22 und 23).

F VIII B ergibt ein Transkript mit einer Größe von 2500 Basenpaaren, das in der gleichen Richtung wie das übrige *Faktor VIII*-Gen transkribiert wird und dabei sowohl ein eigenes Exon als auch Exon 23 bis 26 nutzt. F VIII A besitzt keine Introns und wird in gegenläufiger Richtung transkribiert. Die Funktionen der Proteine, für die F VIII A und F VIII B kodieren, sind noch unbekannt. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen Faktor VIII-Antigen (Zelechowska et al. 1985) und das Vorhandensein von Faktor VIII-mRNA in Hepatozyten (Wion et al. 1985) legen die Vermutung nahe, daß der Faktor VIII hauptsächlich in der Leber gebildet wird, obwohl auch andere Gewebe nachweisbar Faktor VIII-mRNA aufweisen (Wion et al. 1985). In der Sequenzierung ergab die Analyse der Faktor VIII-cDNA ein reif sezerniertes Protein bestehend aus 2332 Aminosäuren. Das ungefähre Gewicht beträgt 265 kDa ohne Kohlenhydrate.

Wie anhand der Abbildung 3 gezeigt wird, ist im Laufe der Evolution das *Faktor VIII*-Gen relativ unverändert geblieben. So ist z.B. in den Spezies Mensch, Schwein, Maus und Hund die APC-Bindungsstelle bis auf eine Aminosäure identisch.

HUMFVIII	HAGMSTLFLV
PIGFVIII	QAGMSTLFLV
MURFVIII	QAGMSTLFLV
CANFVIII	QAGMSTLFLV

Abbildung 3: Spezieskonservierung der APC-Bindungsstelle

Wie aus der Abbildung 4 deutlich wird, besteht das Protein aus einer sich wiederholenden Domänenstruktur: A1- A2- B- A3- C1- C2 (Vehar et al. 1984). Diese Struktur ähnelt dem Aufbau des Faktor V. Die B-Domänen stehen jedoch in keinerlei Beziehung zueinander. Die Ähnlichkeit mit Caeruloplasmin beschränkt sich auf die Anordnung der A-Domänen: A1- A2- A3 (Vehar et al. 1984, Koschinsky et al. 1986, Kane et al. 1986). Die C-Domäne weist eine gewisse Ähnlichkeit zu Discoidin (Vehar et al. 1984) und einer Rezeptor-Tyrosinkinase (Johnson et al. 1993), die in Mammacarcinomzellen gefunden wurden. Keine Homologie besteht zwischen der B-Domäne und anderen Proteinen in Protein-Sequenz-Datenbanken.

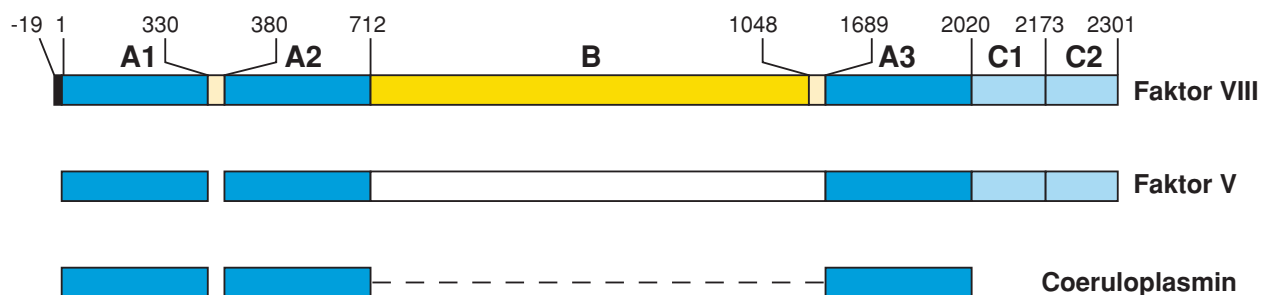


Abbildung 4: Faktor VIII Domänenstruktur im Vergleich zu Faktor V und Coeruloplasmin

Der Faktor VIII ist sehr empfindlich für proteolytisches "Processing" vor und nach seiner Sekretion, und der Großteil des sezernierten Faktor VIII besteht aus der schweren Kette mit der A1- und A2-Domäne und einem unterschiedlich großen Anteil der B-Domäne, der nicht kovalent an die leichte Kette mit der A3-, C1- und C2-Domäne

(Vehar et al. 1984) gebunden ist. Anhand von rekombinant hergestelltem Faktor VIII mit unvollständiger B-Domäne ließ sich zeigen, daß diese Domäne für die Gerinnungsaktivität unerheblich ist (Eaton et al. 1986). Wahrscheinlich wird sie von Thrombin durch Spaltung an Stelle R740 während der Gerinnung abgespalten. Der inaktive Gerinnungsfaktor VIII zirkuliert im Plasma an ein riesiges Trägerprotein nicht kovalent gebunden, den Von-Willebrand-Faktor. Diese Bindung schützt ihn vor proteolytischem Abbau. Ist diese Bindung gestört, sinkt die Faktor VIII-Konzentration im Plasma. Der Faktor VIII hat im menschlichen Organismus die Aufgabe, als Cofaktor die Aktivierung des Gerinnungsfaktor X durch den Faktor IX auf einer Phospholipidoberfläche zu katalysieren. Dabei verstärkt er den Gerinnungsstimulus um ein Vielfaches. Proteolytische Spaltung vermittelt sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung. Um diese Cofaktorrolle einnehmen zu können, muß der Faktor VIII zunächst an zwei bestimmten Stellen geschnitten werden. Diese Modifizierung erfolgt an den Grenzflächen zwischen zwei Domänen, zum einen an der Aminosäure 372, der Verbindung zwischen der A1- und der A2-Domäne, zum anderen an der Aminosäure 1689, der Verbindung zwischen der B- und der A3-Domäne (Pittman et al. 1988, Hill-Eubanks et al. 1989). Während die erste Schnittstelle wohl die Bindungsstelle der A2-Domäne birgt (Fay et al. 1993), wird mit der zweiten Schnittstelle die Verbindung zum von-Willebrand-Faktor gelöst (Leyte et al. 1991). Auf diese Art und Weise vermag der Faktor VIII mit den Phospholipidmembranen mittels der C2-Domäne zu interagieren und so einen Komplex mit den membran-gebundenen Faktoren IX und X zu bilden.

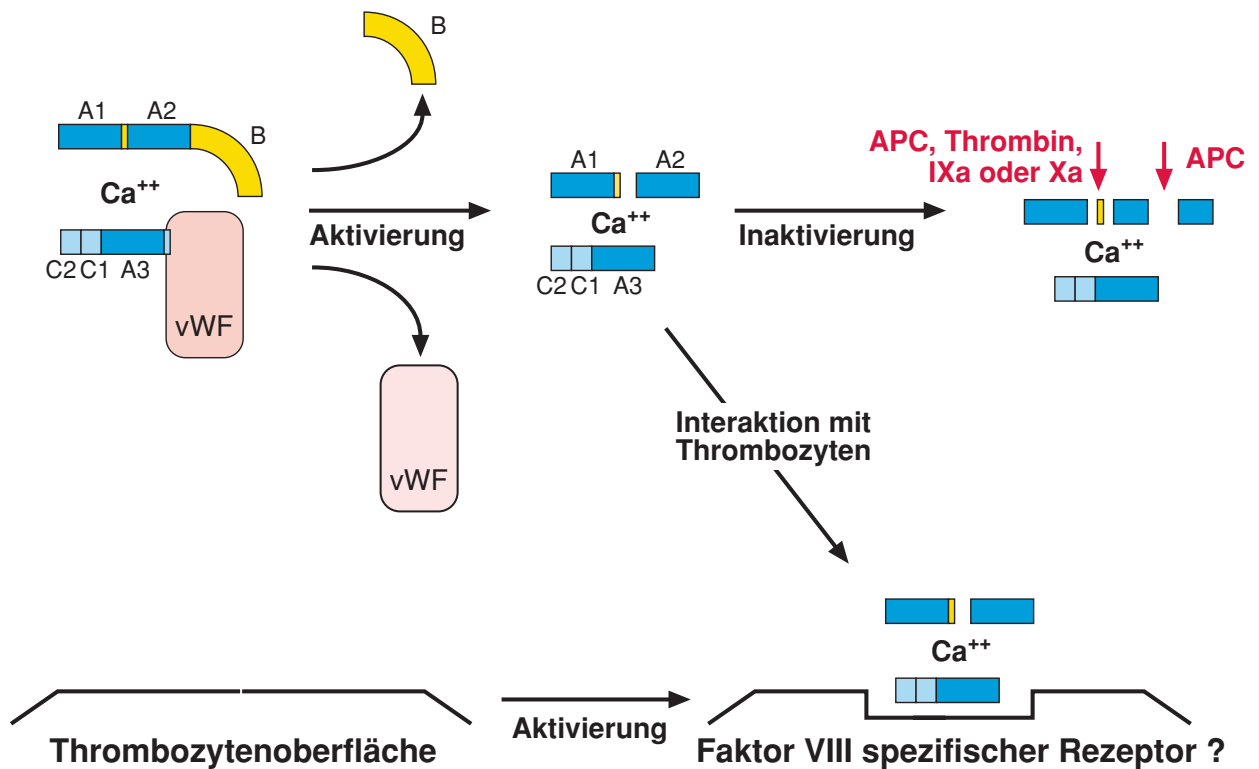


Abbildung 5: Faktor VIII Aktivierung und Inaktivierung

(vWF = von Willberand-Faktor, Ca^{++} = Calcium²⁺-Ionen)

Die Degradierung des aktivierten Faktor VIII wird über drei weitere Schnittstellen via proteolytischer Spaltung vermittelt. An der Aminosäure R336 inaktivieren sowohl das aktivierte Protein C (APC) als auch Thrombin, Faktor IX und Faktor X, an der Aminosäure 1719 nur Faktor IX. Die für die Inaktivierung bedeutendste Schnittstelle liegt an Position R562 für APC (Vehar et al. 1984, Walker et al. 1987, O'Brian et al. 1992). Die Vorgänge der Aktivierung und der Inaktivierung sind in Abbildung 5 schematisiert dargestellt.

Arbeitshypothese

Die Inaktivierung des Faktor VIII verläuft analog zu der des Faktor V über das Protein C-System. Wie soeben erläutert, führt als erwiesene Ursache familiär gehäuft auftretender Thrombosen eine Mutation im Faktor V an der APC-Schnittstelle zu einer Hyperkoagulabilität. Aufgrund der Analogien zwischen Faktor V und Faktor VIII liegt daher die Vermutung nahe, daß eine Mutation im *Faktor VIII*-Gen an den Interaktionsstellen des aktivierten Protein C zu einer APC-Resistenz und somit zu einer erhöhten Thromboembolieeigung führen könnte. Als Erklärung für dieses Phänomen ließe sich ein gestörter und somit verminderter Abbau des aktivierten Gerinnungsfaktor VIII heranziehen. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, daß Koster et al. (1995) aber auch Kamphuisen et al. (2000) einen Zusammenhang zwischen erhöhten Faktor VIII:C-Konzentrationen und einem erhöhten Thromboserisiko nachgewiesen haben, der nicht allein durch die „akute Phase-Situation“ erklärt werden kann. Wir untersuchten dazu einerseits die APC-Schnittstellen in Exon 8/9 und Exon 11 und andererseits als Bindungsstelle das Exon 19 auf DNA-Mutationen/Polymorphismen bei Patienten mit klinisch gesicherter Thrombophilie.

2 Patienten und Material

2.1 Patienten

2.1.1 Patienten

Es wurden 65 Patienten untersucht, die 1996 und 1997 zur Abklärung einer Thrombophilie in die Gerinnungsambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf kamen. Von diesen 65 Patienten waren 30 Männer und 35 Frauen im Alter zwischen 6 Monaten und 78 Jahren mit einem Median von 37 Jahren.

2.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe für die SSCP-Gel-Elektrophorese wurden 102 Probanden ohne Thrombophilie in der Vorgeschichte untersucht.

2.2 Materialien

2.2.1 Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Firma</i>
Dye-Terminator-Sequencing-Kit	PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Mbo I-Restriktionsenzym	BioLabs, Beverly, MA, USA
Taq-Gold-Polymerase	Amersham, Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Tfl-Polymerase	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

2.2.2 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Firma</i>
(NH ₄) SO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,2-Dichlormethane	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
100 bp-Ladder	Gibco Life Tech., Karlsruhe, Deutschland
1H Tetrazole	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Acetonitril	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Acrylamid	Bio Rad, Richmond, CA, USA
Agarose	Gibco Life Tech., Karlsruhe, Deutschland
Ammoniak	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Bio Rad, Richmond, CA, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Capping A	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Capping B1	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Centricon-100-Filter	Amicon, Beverly, MA, USA
Detritylation solution	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
dNTP`s	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entwickler-Lösung	Bio Rad, Richmond, CA, USA
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ficoll 400	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
halfTerm Sequencing Reagent	GENPAK Ltd., Brighton, Großbritannien
iBUdCβ-Cyanoethyl Phosphoramidite	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
iPr-PACdGβ-Cyanoethyl Phosphoramidite	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Methanol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland

<i>Chemikalie</i>	<i>Firma</i>
NAP 10-Säulen	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
NaPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat 0,3 M	Merck, Darmstadt, Deutschland
NE-Buffer 3	BioLabs, Beverly, MA, USA
NH ₂ -Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nusieve-GTG-Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Oxidationbuffer	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Oxydizer	Bio Rad, Richmond, CA, USA
PACdAß-Cyanoethyl Phosphoramidite	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Phenolchloroform	Applied Biosystems
Polyacrylamid-Stock 40 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Primer Support A, C, G, T	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Proteinase K-Stocklsg.	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Silberkonzentrat	Bio Rad, Richmond, CA, USA
Stop-Solution	USB, Braunschweig, Deutschland
Sucrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Taq-Gold-Puffer	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Taq-Puffer	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Temed	Bio Rad, Richmond, CA, USA
Tfl-Puffer	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Tris	ICN, Costa Mesa, CA, USA
Tris-Cl pH 7,5	ICN, Costa Mesa, CA, USA
Tris-Cl pH 8,8	ICN, Costa Mesa, CA, USA
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tß-Cyanoethyl Phosphoramidite	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol	Sigma, St. Louis, Missouri, USA

2.2.3 Geräte und Software

<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
Absaugpumpe	allgem. Laborbestand
Certomat MV	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Pipetten 5/10/25 ml	allgem. Laborbestand
Elektrophorese-Apparat	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Gel-Kammern für Agarose-Gele	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gel-Loader-Tips, 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Glasmaterialien	allgem. Laborbestand
Glasplatten	Biometra, Göttingen, Deutschland
Heizblock / Dri-Block DB1	Flow Lab., Meckenheim, Deutschland
Kamm 0,8 mm	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kamm für Agarose-Gele	Serva, Heidelberg, Deutschland
MacMolly [®] Tetra, Version 3.7	Soft Gene GmbH, Deutschland
Mikrowelle VIP 27	Whirlpool, Deutschland
Mini-Shaker	B. Braun, Melsungen, Deutschland
PCR-Cycler / Mini-Cycler	Biozym, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Beckmann, München, Deutschland
Pico Fuge	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polaroid MP 4+	Polaroid, Herfordshire, UK
Gene Assembler plus	Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Safe Lock 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safeseal-Tips 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spacer 0,8 mm	allgem. Laborbestand
Ultrazentrifuge L2 65B	Beckmann, München, Deutschland
UV-160 Spectrometer	Shimadzu, Japan
UV-Tisch 2035	Herolab, Deutschland

2.3 Puffer und Lösungen

<u>1. Lysepuffer:</u>	320 mM Sucrose 10 mM Tris-Cl pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 1% Triton X-100 mit H ₂ O auf 40 ml auffüllen
<u>2. K-Puffer:</u>	50 mM Tris-Cl pH 8,8 1,5 mM MgCl ₂ 15 mM (NH ₄) SO ₄ 0,5 % Tween 20
<u>3. Proteinase K:</u>	Stocklösung von 20 mg/ml (2 %) in H ₂ O auf 100 µg/ml verdünnt und bei -20 °C gelagert
<u>4. TAE-Puffer:</u>	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
<u>5. TBE-Puffer 10-fach:</u>	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA ad 500 ml mit H ₂ O auffüllen
<u>6. SSCP-Fixierungslösung:</u>	40 % Methanol 10 % Essigsäure ad 1000 ml mit H ₂ O auffüllen
<u>7. 10 mM Na PO₄-Primer-Puffer pH 6,8:</u>	10 µl 1 M Natrium-Phosphat (pH 6,8) 990 µl H ₂ O

8. DNA-Elektrophorese-Ladepuffer:

0,04 % (w/v) Bromphenolblau
0,04 % (w/v) Xylencyanol FF
2,5 % (w/v) Ficoll 400
in TAE-Puffer gelöst

9. SSCP-Stop-Solution:

95 % (w/v) Formamid
20 mM EDTA
0,05 % (w/v) Bromphenol Blau
0,05 % (w/v) Xylencyanol FF

3 Allgemeine Arbeitsmethoden

3.1 DNA-Präparation aus Vollblut

Die DNA wurde aus Vollblut der Patienten und zum Vergleich der Kontrollgruppe nach Higushi et al. (1990) präpariert.

Dazu wurden 0,5 ml Vollblut mit 0,5 ml Lysepuffer in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen auf Eis gemischt. In einer Zentrifuge wurde die Probe bei voller Drehzahl abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und nach Zugabe von 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Pellet farblos erschien. Darauf wurde der Überstand komplett entfernt und das Pellet in 0,5 ml K-Puffer und 100 µg/ml Proteinase K resuspendiert. Dieser Ansatz inkubierte bei 56 °C für 2 h im Heizblock.

3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der präparierten DNA zu bestimmen, wurden Absorptionsmessungen am Spektrophotometer mit einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm durchgeführt. Die Konzentration wurde nach Sambrook et al. (1989) über folgende Formel berechnet:

$$\text{gemessene OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}].$$

Eine Optische Dichte von 260 nm ($\text{OD}_{260\text{nm}}$) von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Die Reinheit der Präparation lässt sich anhand des vom Photometer automatisch ermittelten Quotienten aus $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$ beurteilen. Eine Erhöhung bzw. Verringerung des optimalen Quotienten von 1,8 weist auf eine Kontamination mit RNA oder auch Proteinen hin. Quotienten unter 1,6 und über 2,0 wurden nicht akzeptiert.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation der zwei Protein C-Schnittstellen des Faktor VIII und der Protein C-Bindungsstelle wurden zunächst die Primersequenzen mittels des Programms "Mac Molly Tetra" für die zu amplifizierenden Exons bestimmt und dann die Primer wie folgt erstellt.

3.3.1 Verwendete Primer

APC-Schnittstelle (Arginin³³⁶):

Fk VIII Exon 8/9 Upper Primer 5`-> 3`: GGA AGC TTA TGT CAA AGT AG

Fk VIII Exon 8/9 Lower Primer 5`-> 3`: CTG AGC GAA TTT GGA TAA AG

Es entsteht ein Oligonukleotid mit einer Länge von **161 bp**.

APC-Schnittstelle (Arginin⁵⁶²):

Fk VIII Exon 11 Upper Primer 5`-> 3`: CAT TTG AAG GAT TTT CCA AT

Fk VIII Exon 11 Lower Primer 5`-> 3`: AGG GGA CAT ACA CTG AGA AT

Es entsteht ein Oligonukleotid mit einer Länge von **259 bp**.

APC-Bindungsstelle:

Fk VIII Exon 19 Upper Primer 5`-> 3`: TCG CAT AAA CCA ATG TAT CTC AT

Fk VIII Exon 19 Lower Primer 5`-> 3`: TAT TTC CTG ACA CAA GCA ACC AT

Es entsteht ein Oligonukleotid mit einer Länge von **286 bp**.

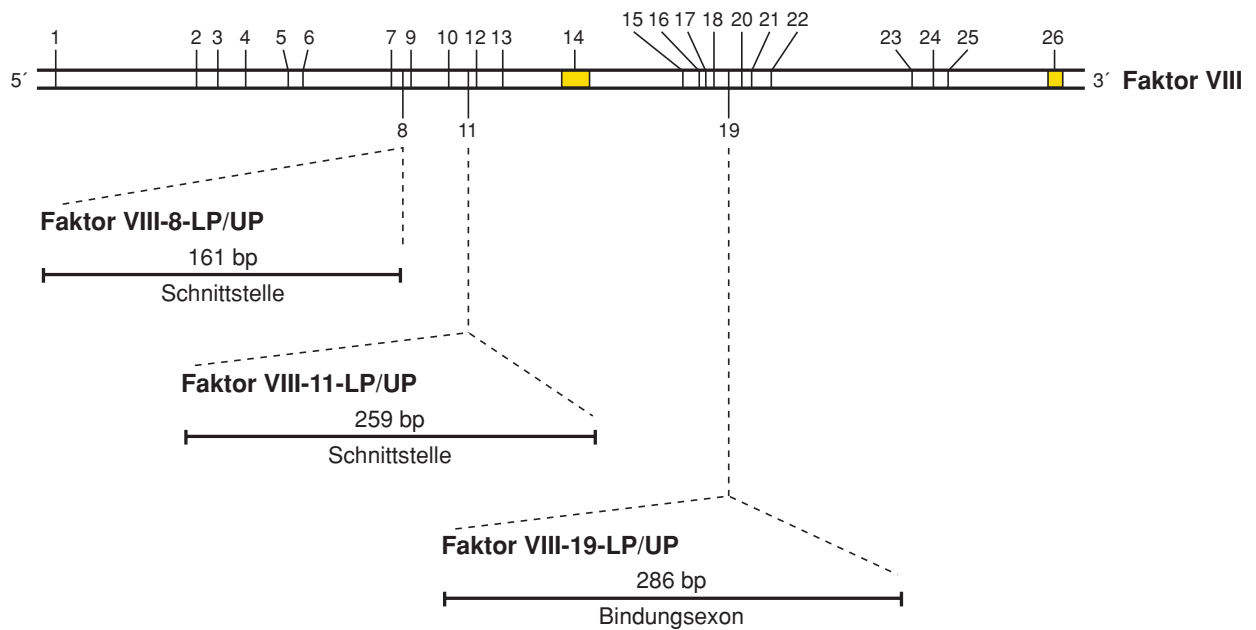


Abbildung 6: PCR Amplifikation (LP= lower primer, UP= upper primer)

3.3.2 Primersynthese

Die Primer wurden auf einem Gene Assembler Plus (Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) selbst synthetisiert. Die ausgewählten Oligonukleotide waren 20 bis 23 bp groß und wurden über ca. 24 h in konzentrierter Ammoniaklösung vom Primer Support (Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) abgekoppelt. Daraufhin wurden die Primer mit Hilfe einer NAP-10-Säule aufgereinigt. Dafür wurde die Säule dreimal mit je 5 ml 10 mM NaPO₄-Primer-Puffer pH 6,8 äquilibriert. Dann wurden die Primer Supports für 2 min auf der Ultrazentrifuge L2 65B auf 2000 rpm trocken zentrifugiert und das Zentrifugat zusammen mit dem restlichen Ammoniak über die Säule gegeben. Die Oligonukleotide wurden mit 1,5 ml 10 mM NaPO₄-Primer-Puffer eluiert und eine 1:50 Verdünnung mit 10 µl Primer und 490 µl 10 mM NaPO₄-Primer-Puffer zur Konzentrationsmessung hergestellt.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung der Primer

Um die Konzentration der einzelnen Oligonukleotide zu bestimmen, wurde ein 1:50 Verdünnungsansatz im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Nach der folgenden Formel wurde die Gesamt-Optische Dichte errechnet:

$$\text{Gesamt-OD}_{260\text{nm}} = \text{gemessene OD} \times \text{Verdünnung} \times \text{Volumen.}$$

Da die Oligonukleotidsequenzen bekannt waren, ließ sich nach folgender Formel die Primerkonzentration errechnen:

$$\text{Konzentration } C \text{ (}\mu\text{M)} = \text{Gesamt-OD}_{260\text{nm}} : \sum \epsilon.$$

Für die Summe der einzelnen Extinktionskoeffizienten wurde aus der Anzahl der einzelnen Nukleotide mit dem jeweiligen Extinktionskoeffizienten das Produkt gebildet.

Nukleotid	Extinktionskoeffizient ϵ
dATP	15,4 ml/ μmol
dCTP	7,4 ml/ μmol
dGTP	11,7 ml/ μmol
dTTP	8,8 ml/ μmol

3.3.4 PCR-Bedingungen

Die PCR wurde für jedes Exon gemäß der Richtlinien durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Für jedes Exon mußte ein eigener Assay entwickelt werden. Dafür wurde zunächst für jedes Exon eine $MgCl_2$ -Verdünnungsreihe angesetzt und in der Agarose-Gel-Elektrophorese ermittelt, welche $MgCl_2$ -Konzentration die besten Ergebnisse hervorbringt. Auch ergaben sich Primer-spezifische Annealingtemperaturen, die sowohl errechnet als auch probatorisch bestätigt werden mußten.

Wir verwendeten zunächst sowohl Tfl- als auch Taq-Gold-Polymerase. Da jedoch der Taq-Gold-Polymerase-Ansatz sowohl bei Normalproben als auch bei Patientenproben die stabileren und besseren Ergebnisse erbrachte, wurde im Folgenden der Taq-Gold-Polymerase-Ansatz verwendet.

Daraus ergaben sich folgende PCR-Assays:

- **Exon 8/9:**

Für die Amplifikation der im Exon 8/9 befindlichen APC-Schnittstelle wurde zunächst ein Mastermix aus Polymerase-Puffer, $MgCl_2$ in der experimentell ermittelten Konzentration, dNTP's, Upper und Lower Primer und Wasser zusammenpipettiert. Die beschrifteten PCR-Tubes wurden mit dem jeweiligen DNA-Template beschickt. Dann wurde dem Mastermix die im Eisbad aufbewahrte jeweilige Polymerase zugegeben, der Ansatz gut vermischt und auf die jeweiligen DNA-Proben gegeben. Diese Reaktionsansätze wurden nochmals gründlich vermischt, kurz herunterzentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl versiegelt, um einer Verdunstung vorzubeugen.

Exon 8/9:Tfl-Polymerase-Assay	Exon 8/9:Taq-Gold-Polymerase-Assay
5 µl Tfl-Polymerase-Puffer	10 µl TG-Puffer
7 µl MgCl ₂ (25 µM)	7 µl MgCl ₂ (25 µM)
2 µl dNTP`s (10 µM)	2 µl dNTP`s (10 µM)
2 µl Tfl-Polymerase	1 µl TG-Polymerase
1 µl Fk8-8/9-Up. Primer (25 µM)	1 µl Fk8-8/9-Up. Primer (25 µM)
1 µl Fk8-8/9-Low. Primer (25 µM)	1 µl Fk8-8/9-Lo. Primer (25 µM)
3 µl DNA-Template (200 ng)	3 µl DNA-Template (200 ng)
79 µl H ₂ O	75 µl H ₂ O

Für die Amplifikation im Exon 8/9 wurde nach einer Denaturierungszeit von 5 min in jedem Zyklus zunächst jeweils eine Denaturierung bei 95 °C für 1 min durchgeführt, um die Doppelstränge voneinander zu trennen. Danach wurde bei 49 °C eine dem Primer angepaßte Annealingphase angeschlossen, in der die Primer möglichst spezifisch an die passende Sequenz binden sollten. In der Amplifikationsphase, dem letzten Schritt des jeweiligen Zyklus, erfolgte die DNA-Synthese bei für das Enzym optimalen 72 °C.

Zusammenfassend wurde der Thermo-Cycler in 8 Schritten wie folgt programmiert:

Exon 8/9:Tfl-Polymerase-Assay	Exon 8/9:Taq-Gold-Polymerase-Assay
1. Schritt: 5 min bei 95 °C	1. Schritt: 12 min bei 95 °C
2. Schritt: 1 min bei 95 °C	2. Schritt: 1 min bei 95 °C
3. Schritt: 1 min bei 49 °C	3. Schritt: 1 min bei 49 °C
4. Schritt: 1 min bei 72 °C	4. Schritt: 1 min bei 72 °C
5. Schritt: 34 Zyklen	5. Schritt: 34 Zyklen
6. Schritt: 10 min bei 72 °C	6. Schritt: 10 min bei 72 °C
7. Schritt: 5 min bei 4 °C	7. Schritt: 5 min bei 4 °C
8. Schritt: End	8. Schritt: End

Nach Beendigung der Amplifikation wurde das PCR-Produkt in einer Agarose-Gel-Elektrophorese mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft.

- **Exon 11:**

Auch für die Amplifikation der im Exon 11 befindlichen APC-Schnittstelle wurde zunächst ein Mastermix aus Polymerase-Puffer, $MgCl_2$ in der experimentell ermittelten Konzentration, dNTP's, Upper und Lower Primer und Wasser zusammenpipettiert. Die beschrifteten PCR-Tubes wurden mit dem jeweiligen DNA-Template beschickt. Dann wurde dem Mastermix die im Eisbad aufbewahrte jeweilige Polymerase zugegeben, der Ansatz gut vermischt und auf die jeweiligen DNA-Proben gegeben. Diese Reaktionsansätze wurden nochmals gründlich vermischt, kurz herunterzentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl versiegelt, um einer Verdunstung vorzubeugen.

Exon 11:Tfl-Polymerase-Assay:	Exon 11:Taq-Gold-Polymerase-Assay:
5 µl Tfl-Polymerase-Puffer	10 µl TG-Puffer
8 µl MgCl ₂ (25 µM)	8 µl MgCl ₂ (25 µM)
2 µl dNTP`s (10 µM)	2 µl dNTP`s (10 µM)
2 µl Tfl-Polymerase	1 µl TG-Polymerase
1 µl Fk8-11-Up. Primer (25 µM)	1 µl Fk8-11-Up. Primer (25 µM)
1 µl Fk8-11-Low. Primer (25 µM)	1 µl Fk8-11-Low. Primer (25 µM)
3 µl DNA-Template (200 ng)	3 µl DNA-Template (200 ng)
78 µl H ₂ O	74 µl H ₂ O

Für die Amplifikation im Exon 11 wurde nach einer Denaturierungszeit von 5 min in jedem Zyklus zunächst jeweils eine Denaturierung bei 95 °C für 1 min durchgeführt, um die Doppelstränge voneinander zu trennen. Danach wurde bei 51 °C eine dem Primer angepaßte Annealingphase angeschlossen, in der die Primer möglichst spezifisch an die passende Sequenz binden sollten. In der Amplifikationsphase, dem letzten Schritt des jeweiligen Zyklus, erfolgte die DNA-Synthese bei für das Enzym optimalen 72 °C.

Zusammenfassend wurde der Thermo-Cycler in 8 Schritten wie folgt programmiert:

Exon 11:Tfl-Polymerase-Assay	Exon 11:Taq-Gold-Polymerase-Assay
1. Schritt: 5 min bei 95 °C	1. Schritt: 12 min bei 95 °C
2. Schritt: 1 min bei 95 °C	2. Schritt: 1 min bei 95 °C
3. Schritt: 1 min bei 51 °C	3. Schritt: 1 min bei 51 °C
4. Schritt: 1 min bei 72 °C	4. Schritt: 1 min bei 72 °C
5. Schritt: 34 Zyklen	5. Schritt: 34 Zyklen
6. Schritt: 10 min bei 72 °C	6. Schritt: 10 min bei 72 °C
7. Schritt: 5 min bei 4 °C	7. Schritt: 5 min bei 4 °C
8. Schritt: End	8. Schritt: End

Nach Beendigung der Amplifikation wurde das PCR-Produkt in einer Agarose-Gel-Elektrophorese mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft.

- **Exon 19:**

Ebenso wurde für die Amplifikation der im Exon 19 befindlichen APC-Bindungsstelle zunächst ein Mastermix aus Polymerase-Puffer, $MgCl_2$ in der experimentell ermittelten Konzentration, dNTP`s, Upper und Lower Primer und Wasser zusammenpipettiert. Die beschrifteten PCR-Tubes wurden mit dem jeweiligen DNA-Template beschickt. Dann wurde dem Mastermix die im Eisbad aufbewahrte jeweilige Polymerase zugegeben, der Ansatz gut vermischt und auf die jeweiligen DNA-Proben gegeben. Diese Reaktionsansätze wurden nochmals gründlich vermischt, kurz herunterzentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl versiegelt, um einer Verdunstung vorzubeugen.

Exon 19:Tfl-Polymerase-Assay:	Exon 19:Taq-Gold-Polymerase-Assay:
5 µl Tfl-Polymerase-Puffer	10 µl TG-Puffer
6 µl $MgCl_2$ (25 µM)	7 µl $MgCl_2$ (25 µM)
2 µl dNTP`s (10 µM)	2 µl dNTP`s (10 µM)
2 µl Tfl-Polymerase	1 µl TG-Polymerase
1 µl Fk8-19-Up. Primer (25 µM)	1 µl Fk8-19-Up. Primer (25 µM)
1 µl Fk8-19-Low. Primer (25 µM)	1 µl Fk8-19-Low. Primer (25 µM)
3 µl DNA-Template (200 ng)	3 µl DNA-Template (200 ng)
80 µl H_2O	75 µl H_2O

Für die Amplifikation im Exon 19 wurde nach einer Denaturierungszeit von 5 min in jedem Zyklus zunächst jeweils eine Denaturierung bei 95 °C für 1 min durchgeführt, um die Doppelstränge voneinander zu trennen. Danach wurde bei 53 °C eine dem Primer angepasste Annealingphase angeschlossen, in der die Primer möglichst spezifisch an die passende Sequenz binden sollten. In der Amplifikationsphase, dem letzten Schritt des jeweiligen Zyklus, erfolgte die DNA-Synthese bei für das Enzym optimalen 72 °C.

Zusammenfassend wurde der Thermo-Cycler in 8 Schritten wie folgt programmiert:

Exon 19:Tfl-Polymerase-Assay:	Exon 19:TaQ-Gold-Polymerase-Assay:
1. Schritt: 5 min bei 95 °C	1. Schritt: 12 min bei 95 °C
2. Schritt: 1 min bei 95 °C	2. Schritt: 1 min bei 95 °C
3. Schritt: 1 min bei 53 °C	3. Schritt: 1 min bei 53 °C
4. Schritt: 1min bei 72 °C	4. Schritt: 1 min bei 72 °C
5. Schritt: 34 Zyklen	5. Schritt: 34 Zyklen
6. Schritt: 10 min bei 72 °C	6. Schritt: 10 min bei 72 °C
7. Schritt: 5 min bei 4 °C	7. Schritt: 5 min bei 4 °C
8. Schritt: End	8. Schritt: End

Nach Beendigung der Amplifikation wurde das PCR-Produkt in einer Agarose-Gel-Elektrophorese mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft.

3.4 Agarose-Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Zunächst wurde der TAE-Puffer in 1-facher Verdünnung hergestellt. Für ein 2 %iges Gel wurden 2 g Agarose abgewogen, in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml 1-fach TAE-Puffer durchgemischt und in der Mikrowelle auf der höchsten Stufe für 1 min erhitzt. Dieser Ansatz wurde nochmals gemischt und eine weitere Minute erhitzt, um dann auf ca. 50-60 °C abzukühlen. Daraufhin wurden 4 µl Ethidiumbromid vorsichtig zugesetzt und vermischt. Die Gel-Kammer wurde mit dem Agarose-Ansatz beschickt, der Kamm eingesetzt und nach dem Aushärten mit TAE-Puffer bedeckt. Die nach dem Entfernen des Kammes zurückbleibenden Trays wurden mit jeweils 1 µl Laufpuffer und 10 µl DNA beschickt. Als Größenstandard wurde 1 µl 100 bp-Ladder mit 1 µl Laufpuffer und 10 µl TAE-Puffer verwendet. Dann wurde die Agarose-Gel-Elektrophorese bei 70 Volt für 30 min durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Polaroid-Kamera über einer UV-Lampe dokumentiert.

3.5 SSCP-Analyse

Auf der Suche nach einer effizienten Screening-Methode wurde zunächst die "Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Gel-Elektrophorese", kurz SSCP, für jedes Exon etabliert. Es wurden unterschiedliche Polyacrylamid(PA)-Konzentrationen, unterschiedliche Glycerinkonzentrationen, verschiedene Spannungen, Laufzeiten und Temperaturen mit den Proben jedes Exons gegeneinander getestet. Es ergaben sich jedoch daraus für alle Exons die gleichen Laufbedingungen.

3.5.1 Gel- und Laufbedingungen

Für die SSCP-Gel-Elektrophorese wurden zunächst die Glasplatten mit Methanol gereinigt und dann mit den 0,8 mm-Spacern zusammenmontiert. Dann wurde der Polyacrylamid-Gel-Ansatz wie folgt hergestellt: Für ein 5 %-PA-Gel wurden 12,5 ml PA-Stock 40 % mit 10 ml 10-fach TBE-Puffer versetzt und der Ansatz ad 100 ml mit H₂O aufgefüllt. Um die Polymerisation zu starten, wurden 27 µl Temed und 1 ml Ammoniumperoxid zugegeben und vorsichtig vermischt, so daß sich keine Luftblasen bildeten. Dieser Ansatz wurde mit einer Pipette zwischen die Glasplatten gefüllt und an einem Ende ein 0,8 mm-Kamm aufgesteckt. Nach ca. 10 min war das Gel durchgehärtet. Die Glasplatten wurden aufrecht in die Gel-Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Elektrophoresekammern mit 1-fach TBE-Pufferlösung gefüllt. Nun wurden in 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen 7 µl der jeweiligen PCR-Probe mit 3 µl Stop-Solution (enthält 95 % Formamid) gemischt und für 10 min im Cycler auf 95 °C erhitzt. Nach einer Zeit von 5 min im Eisbad wurde der Ansatz im Kühlraum kurz bei voller Drehzahl herunterzentrifugiert, um dann sofort in die Gel-Trays geimpft zu werden. Die SSCP wurde bei 3 Watt (10 Volt) und Raumtemperatur mit Ventilator Kühlung über 12 Stunden laufengelassen.

3.5.2 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung der PA-Gele wurde mit einer Silbernitratfärbung von BioRad (Richmond, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst

und in einer flachen Glasschale auf dem Schüttler mit 400 ml Methanol 100 %, 100 ml Essigsäure 100 % und 500 ml H₂O für ca. 20 min fixiert. Dann erfolgte eine 10 %ige Ethanol-Spülung für ca. 5 min. Die jeweiligen Flüssigkeiten wurden nach jedem Durchgang vorsichtig abgesaugt. Der Oxidierungsvorgang mit BioRad-Oxidizer (Richmond, CA, USA) dauerte 10 min, danach wurde das Gel mehrfach gespült, bis sich keine gelbliche Färbung mehr nachweisen ließ. Die eigentliche Silberfärbung erfolgte nun mit BioRad-Silverstain (Richmond, CA, USA) für 20 min. Nach einem weiteren Waschvorgang mit H₂O wurde das Gel mit BioRad-Developer (Richmond, CA, USA) inkubiert, bis die Banden deutlich sichtbar wurden. Dann wurde die Reaktion mit 10 % Essigsäure abgestoppt. Nach einer Spülung mit H₂O konnte das Gel zu Dokumentationszwecken in Folie eingeschweißt werden.

3.6 DNA- Sequenzanalyse

Um die genaue Basenpaarzusammensetzung der Patienten-DNA-Templates zu analysieren, mußte eine Sequenzanalyse nach vorheriger Aufreinigung der PCR-Produkte durchgeführt werden.

3.6.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mittels Centricon 100-Filter nach den Angaben des Herstellers Amicon (Beverly, MA, USA) durchgeführt. Dazu wurden 40 µl PCR-Produkt auf die Membran pipettiert, 2 ml H₂O dazugegeben, der Ansatz für 10 min auf der Ultrazentrifuge L2 65B (Beckmann, München, Deutschland) bei 3500 rpm herunterzentrifugiert und der untere Zylinder entleert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dann wurde der Filter umgedreht und das aufgereinigte PCR-Produkt auf der Ultrazentrifuge L2 65B (Beckmann, München, Deutschland) bei 4000 rpm über 5 min in ein dafür vorgesehenes Tube überführt. Eine Kontrolle dieses Vorganges wurden 10 µl des gereinigten PCR-Produktes auf einem Agarose-Gel analysiert. Aufgrund der Bandenstärke setzten wir 10 µl PCR-Produkt in der Sequenzierungs-PCR ein.

3.6.2 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit Big-Dye-Terminator nach den Angaben des Herstellers ABI-Prism (PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) durchgeführt. Zur Optimierung der Ergebnisse wurde zusätzlich halfTerm Sequencing Reagent (GENPAK Ltd., Brighton, Großbritannien) angewendet. Das Pipettierschema blieb bei allen drei Exons gleich:

je 10 µl PCR-Produkt
 2,5 µl Big-Dye-Terminator
 5,5 µl halfTerm Sequencing Reagent
 1 µl H₂O
und 1 µl Primer (zunächst nur der Upper-Primer, nur zu Kontrollzwecken wurde der Anti-Sense-Strang amplifiziert).

Das Cyclex-Programm wurde wie folgt programmiert:

1. 30 sec bei 96 °C
2. 15 sec bei 50 °C
3. 4 min bei 60 °C
4. 25 Zyklen
5. 5 min bei 4 °C
6. End

Um Kondensationsvorgänge zu unterbinden, wurde jedem Reaktionsansatz ein Tropfen Mineralöl zugesetzt.

3.6.3 Alkoholische DNA-Fällung

Zur Optimierung der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte einer alkoholischen Fällungsreaktion unterzogen. Dazu wurden 20 µl PCR-Produkt mit 80 µl H₂O und 100 µl Phenolchloroform durch vortexen gemischt und für 10 min auf der Ultrazentrifuge L2

65B (Beckmann, München, Deutschland) bei 13 000 rpm herunterzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurde die wässrige Phase mit 250 µl 100 %igem Ethanol und 3 µl Na-Acetat 0,3 M versetzt. Nach einem weiteren Misch- und Zentrifugiervorgang schloß sich ein Waschvorgang des Pellets mit 70 %igem Ethanol an. Anschließend wurde die Probe an der Luft getrocknet.

3.7 Restriktionsverdau von PCR-Produkten

Um im Exon 11 in der Sequenzierung aufgefallenen Basenaustausch bei drei Patientenproben näher zu untersuchen, wurde im Programm "Analyse and Complign" im Programmpaket "Mac Molly Tetra" ein Restriktionsenzym gefunden, das "mutationssensibel" an genau der fraglichen Stelle schneiden würde. Wir verwendeten das Enzym "Mbo I", das die Sequenz "AGATC" erkennt. Der Restriktionsverdau wurde wie folgt pipettiert:

8 µl PCR-Produkt
1 µl Mbo I
1 µl NE Buffer Nr. 3.

Dieser Ansatz wurde für 2 h im Heizblock bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle erfolgte auf einem 3,5 % Nusieve-Agarose-Gel (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Als Standard wurden 10 bp- und 100 bp-Ladder verwendet, als Gegenkontrolle wurden unverdaute Patientenproben aufgetragen.

4 Ergebnisse

Wir untersuchten 65 Patienten, die an einer Thrombophilie leiden. Unter den untersuchten Patienten waren 35 Frauen und 30 Männer im Alter zwischen 6 Monaten und 78 Jahren mit einem Median von 37 Jahren. Die labordiagnostische Abklärung ergab, daß die Faktor V-Leiden-Mutation als Ursache einer Thrombophilie in homozygoter Form bei 6 Patienten und in heterozygoter Form 16 Patienten vorlag. Die Werte für die APC-Resistenz lagen zwischen 1,4 und 3,7 mit einem Median von 2,1, die Faktor VIII-Aktivität ergab Werte zwischen 63 % und 350 % mit einem Median von 165 %, und die aPTT lag bei den untersuchten Patienten zwischen 24 Sekunden und 50 Sekunden mit einem Median von 32 Sekunden (siehe Abbildung 7).

	Gesamt (65 Patienten)	♂ = 30	♀ = 35
Alter (Jahre) Median	0,5 - 78 37	0,5 - 78 36	0,5 - 75 37
Faktor V Leiden			
keine	43	17	26
homozygot	6	4	2
heterozygot	16	9	7
APC-Resistenz Median	1,4 - 3,7 2,1	1,6 - 3,6 2,1	1,4 - 3,0 2,2
Faktor VIII Aktivität Median	63% - 350% 165%	63% - 350% 174%	95% - 300% 140%
aPTT (sec.) Median	24 - 50 32	28 - 42 33	24 - 50 32

Abbildung 7: Patienten-Charakteristika

Einige Patienten zeigten subnormale bis niedrige Protein C- und Protein S-Konzentrationen, vereinzelt ergab sich eine Dysfibrinogenämie und einmal ein AT III-Mangel als mögliche Ursache. Bei einem Großteil der Patienten ließ sich keine Ursache und bei einigen eine pathologische APC-Resistenz ohne Faktor V-Leiden-Mutation nachweisen. Dieses sehr gemischte Kollektiv wurde neben den üblichen Thrombophilie-Routine-Untersuchungen auch auf das Vorliegen einer Faktor VIII-Mutation untersucht.

Um sich ein Bild über mögliche Normvarianten oder Polymorphismen zu machen, haben wir aus 102 Normalproben die jeweiligen Exons amplifiziert und mittels SSCP-Gel-Elektrophorese auf ihr Laufverhalten überprüft. Es zeigte sich, daß bei 102 Normalpersonen in der SSCP in allen drei untersuchten Exons keine Unterschiede im Laufverhalten nachzuweisen waren.

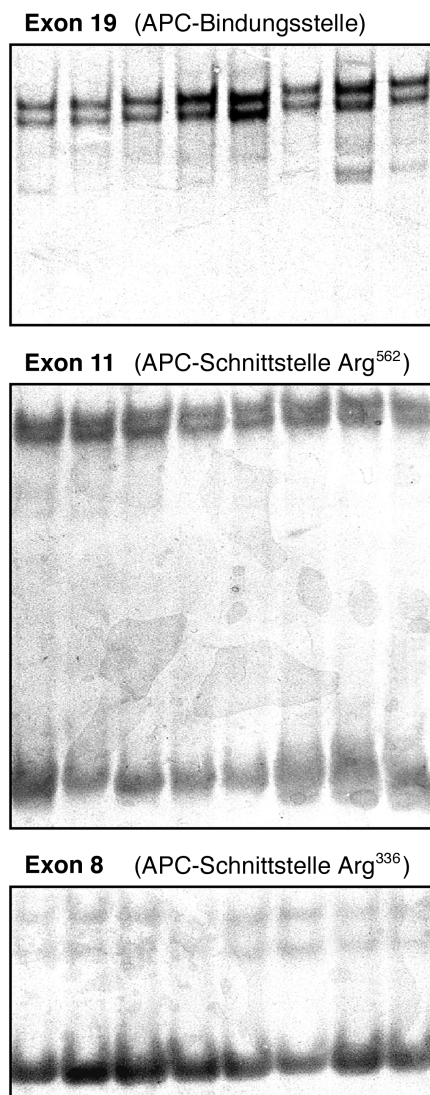


Abbildung 8: SSCP-Gel-Elektrophorese der Normalproben

In der anschließend durchgeführten SSCP-Gel-Elektrophorese mit den Proben der Patienten zeigte sich nur in einem Falle (Exon 19 Patient Nr.9) eine Unregelmäßigkeit im Laufverhalten, die bei der Sequenzierung kein Korrelat aufwies.

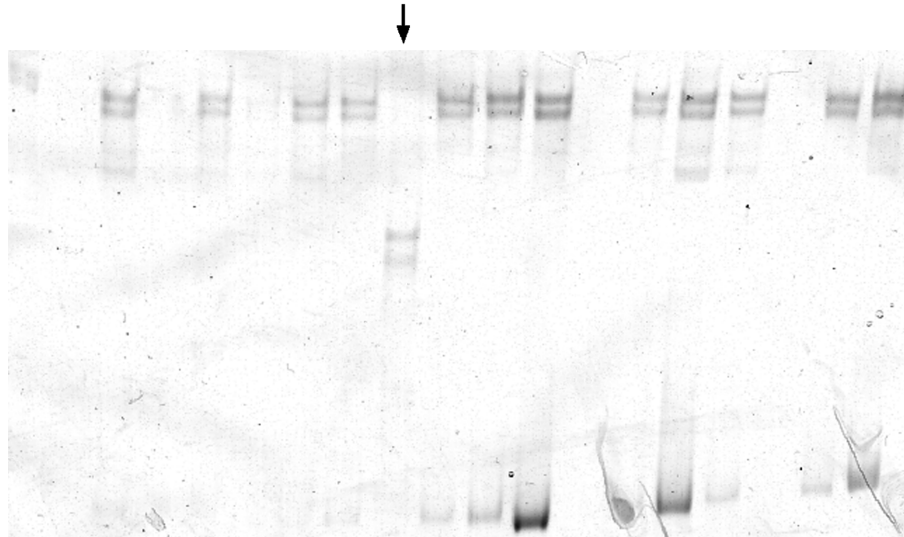


Abbildung 9: SSCP-Gel-Elektrophorese der APC-Bindungsstelle im Exon 19
(Der Pfeil markiert Patientenprobe Nr. 9)

Bei allen anderen Patienten ließ sich in allen drei Exons mittels SSCP-Gel-Elektrophorese keine Änderung im Laufverhalten im Vergleich zu den Kontrollproben aufzeigen.

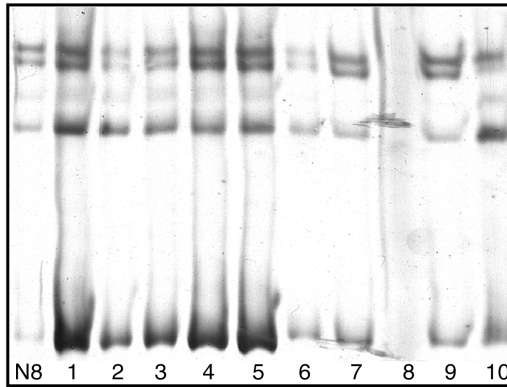


Abbildung 10: Patienten-SSCP-Gel-Elektrophorese der APC-Bindungsstelle im Exon 19
(N8 zeigt die Kontrolle)

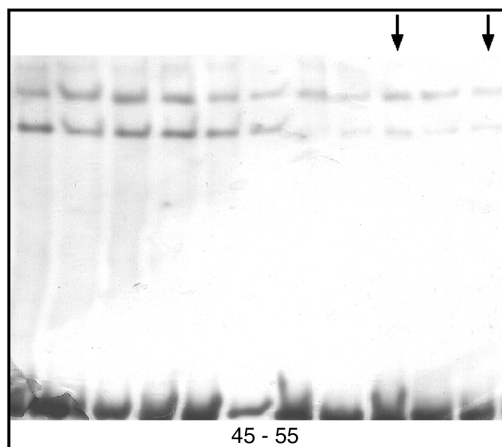


Abbildung 11: Patienten-SSCP-Gel-Elektrophorese der APC-Bindungsstelle Arg⁵⁶² im Exon 11
(Die beiden Pfeile markieren in Exon 11 Patientenproben Nr. 53 und 55, die sich in der anschließenden Sequenzanalyse nicht einheitlich darstellten.)

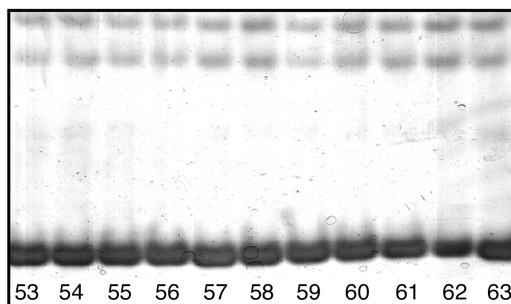


Abbildung 11: Patienten-SSCP-Gel-Elektrophorese der APC-Bindungsstelle Arg³³⁶ im Exon 8/9

Da die Sensitivität der SSCP-Gel-Elektrophorese bei Fragmenten < 200 bp zwischen 80 % und 90 % liegen, bei größeren Fragmenten jedoch geringer ist (Dianzani et al. 1993), führten wir als definitiven Ausschluß einer Mutation eine Sequenzanalyse mittels Dye-Terminator-Sequencing-Kit der Patienten-DNA durch.

In der Sequenzanalyse zeigte sich in 3 Fällen im APC-Schnittstellen-Exon 11 ein Basenaustausch im Vergleich zur Normalsequenz (Exon 11 Patient Nr. 25, 33 und 55), die in der vorangegangenen SSCP-Gel-Elektrophorese keine Unterschiede im Laufverhalten aufwiesen (siehe Abbildung 11).

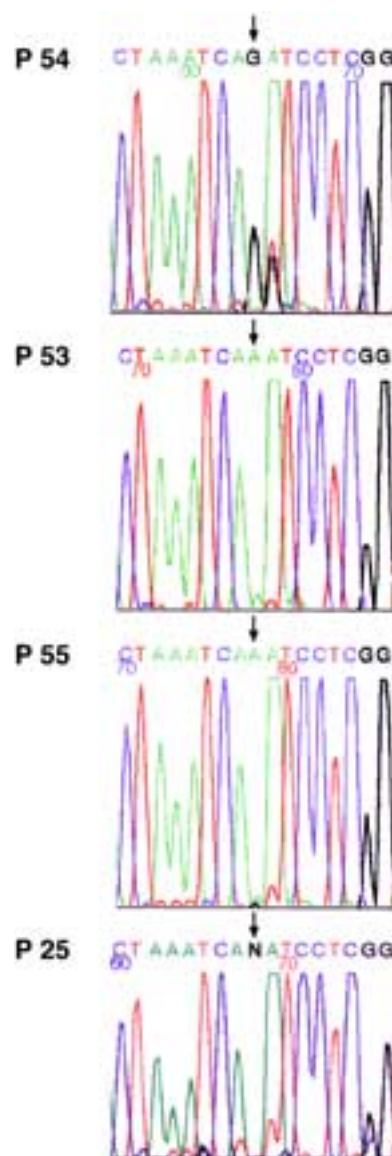


Abbildung 13: Auffällige Sequenzergebnisse im Exon 11 (Patient 54 ist ein Beispiel für die Normalsequenz, Patient 25, 53 und 55 zeigen mit Pfeilen markierte Auffälligkeiten).

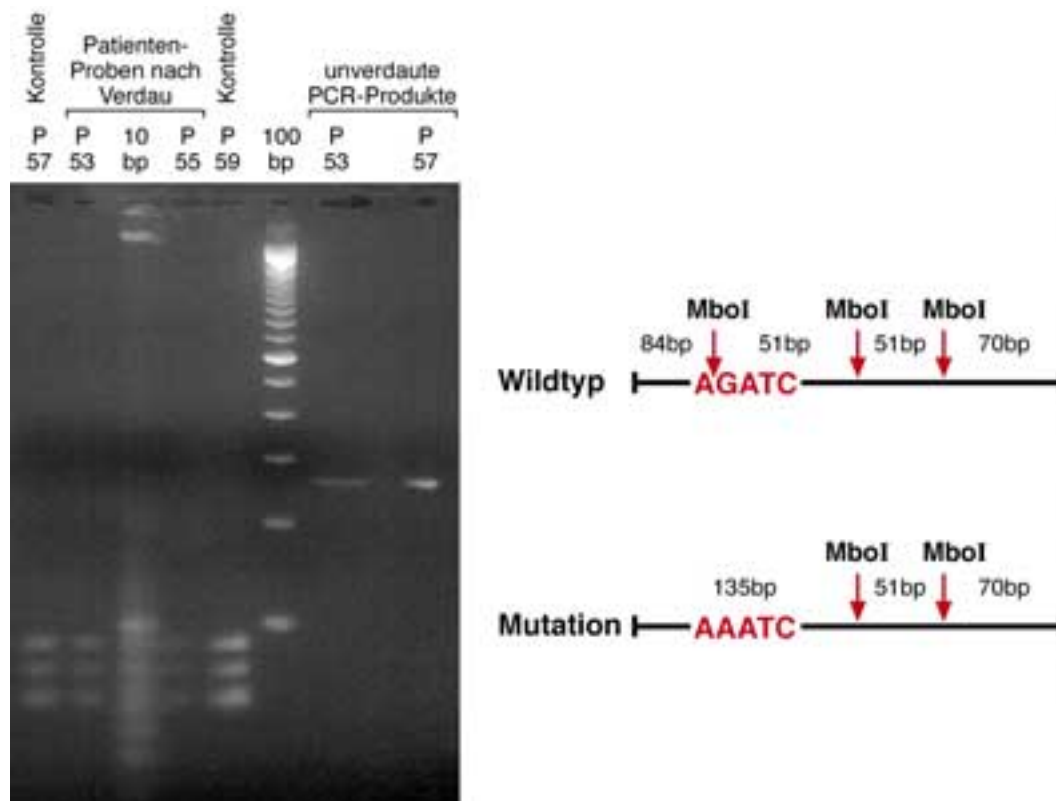


Abbildung 14: Restriktionsverdau mit Mbo I in der APC-Schnittstelle im Exon 11

Wir führten zur Verifizierung einen mutationssensiblen Restriktionsverdau mit Mbo I durch und kontrollierten das Ergebnis mit einer 3,5 %-Nusieve-Gel-Elektrophorese. Jedoch weder im Restriktionsverdau noch in der Kontroll-Antisense-Strang-Sequenzierung ließ sich das Ergebnis reproduzieren.

Ansonsten konnten wir sowohl in den beiden APC-Schnittstellen in Exon 8/9 und Exon 11 als auch an der APC-Bindungsstelle in Exon 19 in den 65 Patientenproben keine Mutation nachweisen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 15, 16 und 17 zusammengestellt.

5 Diskussion

Seit der ersten Publikation durch Dahlbäck et al. (1993) wurde der Zusammenhang zwischen einer pathologischen Resistenz gegen das aktivierte Protein C (APC-Resistenz) und einer erhöhten Thromboseneigung in vielen Publikationen bestätigt. In diesen Untersuchungen zeigte sich, daß annähernd 20 % der Patienten mit einer ersten Episode thromboembolischer Erkrankungen eine pathologisch erhöhte APC-Resistenz aufwiesen. Diese Zahl war weitaus höher, wenn besonders schwere Verläufe oder familiäre Häufungen vorlagen.

In den meisten Fällen wurde über die Faktor V Q⁵⁰⁶-Mutation als erbliche Ursache dieser APC-Resistenz berichtet (Dahlbäck 1995). Die Arbeitsgruppe um Bertina et al. identifizierte den Basenaustausch G > A an der Position 1691, der zu einem Aminosäureaustausch Glutamin statt Arginin führt (Bertina 1994). Mit dieser Mutation geht der Verlust einer APC-Schnittstelle einher. Daraus ergibt sich eine mangelhafte Inaktivierung des Gerinnungsfaktor V (Dahlbäck 1994). Die meisten der Patienten mit einer Thrombose neigung weisen die Faktor V Q⁵⁰⁶-Mutation auf und haben eine pathologische APC-Resistenz. Jedoch schätzungsweise 5-10 % der Patienten mit einer pathologischen APC-Resistenz weisen diese Mutation nicht auf (Hooper et al. 1997).

Auch andere Faktoren prädisponieren für eine Thrombose. So wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter Faktor VIII-Konzentration und Thromboseneigung hergestellt (Koster et al. 1995, Kamphuisen et al. 2000). Eine mögliche Ursache dafür wäre zum einen die vermehrte Produktion im Sinne einer "akuten Phase", zum anderen der verminderte Abbau durch das aktivierte Protein C durch eine Mutation an einer der beiden Schnittstellen oder der APC-Bindungsstelle. Diese Vermutung liegt nahe, da genau dieser Mechanismus für den mangelhaften Abbau des aktivierten Gerinnungsfaktor V im Falle einer Faktor V-Leiden-Mutation nachgewiesen wurde (Dahlbäck 1995).

Zwischen dem Gerinnungsfaktor V und dem Gerinnungsfaktor VIII gibt es Analogien. Neben dem ähnlichen Aufbau seitens der Domänenstruktur (Vehar et al. 1984) fungieren beide in der Koagulation als Cofaktoren der Aktivierung von Faktor X bzw. Prothrombin. Beide werden durch das aktivierte Protein C, einer Vitamin K-abhängigen Serinprotease, inaktiviert. Das aktivierte Protein C inaktiviert den aktivierten Faktor VIII durch proteolytische Spaltung an den Aminosäuren Arginin³³⁶ und Arginin⁵⁶²

(Fay et al. 1991). Die primäre Inaktivierung durch APC wird durch die Spaltung an Aminosäure Arginin⁵⁶² erreicht, während die Spaltung am Arginin³³⁶ nicht nur dem APC vorbehalten ist, sondern auch Faktor IXa, Faktor Xa und Thrombin (Eaton et al. 1986). Analog zu der Faktor V Q⁵⁰⁶-Mutation, die durch Basenaustausch die APC-Schnittstelle derart verändert, so daß die Inaktivierung durch Protein C und Protein S unterbunden wird, ist der Ansatz unserer Arbeitshypothese, daß an den APC-Schnittstellen des Gerinnungsfaktor VIII eine Mutation zum Verlust derselben und somit zu einer APC-Resistenz führen könnte.

Den Zusammenhang zwischen einer erniedrigten APC-Sensitivity Ratio (APC-SR) und erhöhtem Faktor VIII stellte C. Henkens (1995) heraus. Dabei wurden Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, auf ihre APC-Sensitivity Ratio, Faktor V:C in %, Faktor VIII:C in % und die Protein S-Konzentration in % untersucht und die Ergebnisse mit denen von Frauen ohne orale Kontrazeption und denen von Männern verglichen. Dabei zeigte sich, daß unter der Einnahme von oralen Kontrazeptiva die APC-Sensitivity Ratio, die Faktor V:C-Aktivität und die Protein S-Konzentration sank, während die Faktor VIII:C-Aktivität stieg. Nach statistischen Auswertungen der Ergebnisse zeigte sich, daß das Absinken der APC-Sensitivity Ratio unter oraler Kontrazeption nur partiell durch den Anstieg der Faktor VIII:C-Aktivität erklärt werden kann. Der Effekt von Faktor VIII auf die APC-SR wurde durch ein in-vitro Experiment bestätigt, bei dem die APC-SR bei vier gesunden Kontrollproben und einem Plasmapool vor und nach Zugabe von gereinigtem Faktor VIII-Konzentrat gemessen wurde. Die APC-SR erreichten weit niedrigere Werte, als vorher im Labor berechnet wurde. Ebenso sank die aPPT bei diesem Experiment in den unteren Normbereich. Welcher genaue Mechanismus zwischen Faktor VIII:C-Aktivität und APC-SR wirksam ist, ist zur Zeit noch nicht restlos geklärt. Es wird jedoch eine gestörte Balance zwischen dem Faktor VIII und seinem Inhibitor Protein C vermutet, da bei diesem Test eine begrenzte Menge an APC eingesetzt wurde. Die Resultate legen eine Vorsichtnahme bei der Interpretation der APC-SR mittels Coatest® APC-resistance kit (Chromogenix) bei erhöhter Faktor VIII:C-Aktivität nahe. In der Arbeit von M. Laffan et al. (1996) wurden von 266 Patienten mit Thrombosen 44 Patienten mit pathologischer APC-SR identifiziert, von denen 17 Patienten keine Faktor V Q⁵⁰⁶-Mutation in homo- oder heterozygoter Form aufwiesen. Bei 7 von 17 Patienten war das Vorliegen von Lupusantikoagulantien als mögliche Ursache der pathologischen APC-SR heranzuziehen. Bei den verbleibenden 10 Patienten lagen in 9 Fällen erhöhte

Faktor VIII-Konzentrationen vor. Die Arbeitsgruppe wies in Normalplasmaproben und bei Patienten mit Venookklusion nach, daß erhöhte Faktor VIII-Konzentrationen zum Teil mit einer pathologisch erniedrigten APC-SR und einer verkürzten aPTT einhergehen. Laffan und Manning legen die Vermutung nahe, daß eine pathologisch veränderte APC-SR aus verschiedenen Gründen resultiert und als solche als möglicher Risikofaktor für eine erhöhte Thromboseneigung gelten kann.

Vorstellbar wäre, daß eine mangelhafte APC-Inaktivierung zu einer erhöhten Faktor VIII-Konzentration führt. Jedoch zählt der Faktor VIII auch zu den sogenannten "akute Phase-Proteinen", die bei Entzündungen, Trauma, postoperativ, bei Lebererkrankungen, Gefäßerkrankungen, Tumoren, nach Einnahme von Ovulationshemmern, in der zweiten Hälfte der Gravidität und nach körperlichem und psychischem Streß um ein Vielfaches der Norm unspezifisch erhöht sein können (Barthels et al. 1993). Auf der anderen Seite scheint die Erhöhung des Faktor VIII für sich schon ein Thromboserisiko darzustellen (Koster et al. 1995). Auch ließen sich in vitro in einem Fall bei erhöhten Faktor VIII-Werten pathologische APC-Resistenz-Testungen reproduzieren (Laffan et al. 1996). Zöller et al. (1994) haben herausgefunden, daß 3 von 50 Familien mit APC-Resistenz keine Faktor V-Leiden-Mutation aufwiesen und nur in zwei Fällen Anticardiolipinantikörper als mögliche Ursache der APC-Resistenz in Frage kommen. Neben der Annahme, daß Thrombophilie ein multifaktorielles Geschehen ist, könnte dies ein Hinweis auf das Vorliegen einer Faktor VIII-Mutation als eine der Ursachen dieses Phänomens sein.

Es ist bereits bekannt, daß Mutationen im *Faktor VIII*-Gen vorliegen können. Jedoch ist bislang das Vorliegen von Mutationen im Gerinnungsfaktor VIII mit einer verminderten Funktion als Blutungsneigung im Sinne einer Hämophilie verknüpft gewesen. Eine Form der schweren Hämophilie A beruht auf einer "Nonsense-Mutation" an der Aminosäure Arginin³³⁶. Diese Tatsache beweist, daß an dieser Stelle Mutationen vorliegen können (Tuddenham et al. 1994).

Um diesen Nachweis zu erbringen, haben wir 65 Thrombophilie-Patienten in unsere Untersuchung eingeschlossen, die wir mit einer Screening-Methode auf das mögliche Vorliegen einer Mutation an den zwei APC-Schnittstellen und der APC-Bindungsstelle untersuchten.

Die gängigen Methoden der Mutationsanalytik lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. Die erste Kategorie umfaßt Screening-Methoden, mit denen eine große Anzahl von

Proben auf das Vorliegen einer oder mehrerer Mutationen untersucht werden können, während die zweite Kategorie den exakteren Nachweis einer bekannten Mutation erbringt. Auf der Suche nach unbekanntem Mutationen sind die unter der ersten Kategorie genannten die Methoden der Wahl, wobei entscheidend ist, welcher Arbeitsaufwand für welche Sensitivität in Kauf genommen werden sollte. Als Beispiele der ersten Kategorie sind zum Beispiel die denaturierende Gradient Gel-Elektrophorese (DGGE) bzw. Temperatur Gradient Gel-Elektrophorese (TGGE), Heteroduplex Methode (HET), Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) und Chemical cleavage of mismatch (CCM) zu diskutieren.

Bei der DGGE bzw. TGGE wird doppelsträngige DNA mittels Gel-Elektrophorese über einen ansteigenden Gradienten an denaturierendem Agens (z.B. Urea oder Formamid) oder einen ansteigenden Temperaturgradienten je nach spezifischer Schmelztemperatur aufgetrennt, wobei der Schmelztemperaturunterschied zwischen Homoduplexen und Heteroduplexen, also einem Gemisch aus Wildtype- und Mutanten-DNA, von 1 °C auf bis zu 6 °C ansteigen kann und somit annähernd 100 % der Mutationen nachgewiesen werden können (Übersicht bei Wagener et al. 1997). Die spezifischen Schmelztemperaturen hängen von der Basensequenz ab. Bei der Heteroduplex-Methode wird dieses Gemisch von Wildtype- und Mutanten-DNA auf ein nicht-denaturierendes Gel aufgebracht. Im Falle einer Mutation passen Wildtyp- und Mutantenstrang nicht exakt zusammen und können aufgrund unterschiedlicher Laufbedingungen mit einer Sensitivität von 80 % detektiert werden.

Die SSCP macht sich ein ähnliches Prinzip zu eigen. Einzelstrang-DNA-Templates werden auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Diese Einzelstränge lagern sich im Gel je nach Basensequenz in ihrer spezifischen Sekundärstruktur zusammen und ergeben Unterschiede im Laufverhalten. Die besten Ergebnisse werden bei Fragmentgrößen um die 150 bis 200 Basenpaaren erzielt und somit lassen sich 80 bis 90 % der Mutationen nachweisen (Sheffield et al. 1993).

Die Chemical Cleavage Methode vermag falsch gepaarte Heteroduplexe zu spalten und zu markieren. So detektiert Hydroxylamin fehlgepaarte Cytosinreste und Osmium-Tetroxid fehlgepaarte Thyminreste. Die Heteroduplexe werden mit Piperidin an den markierten Stellen gespalten und das Ergebnis auch hier mit Gel-Elektrophorese dokumentiert. Die Sensitivität liegt in etwa bei 80% (Dianzani et al. 1993). Für die genauere Analytik der gefundenen Auffälligkeiten sollte sich bei jeder der oben genannten Me-

thoden eine Sequenzierung anschließen, um falsche Interpretationen zu vermeiden, da alle Methoden rein subjektiv und durch visuelle Beurteilung der Gel-Elektrophorese ohne die Möglichkeit der Standardisierung ausgewertet werden.

Für die Untersuchung des *Faktor VIII*-Gens bei Thrombophilie-Patientinnen und -Patienten in drei verschiedenen Exons entschieden wir uns für die Durchführung der SSCP als Screening-Methode, weil diese Methode eine Sensitivität von 80 bis 90 % vorweist, unsere zu untersuchenden Fragmente zwischen 150 und 300 Basenpaaren groß sind und die SSCP eine relativ leicht durchzuführende Methode ist (Übersicht bei Wagner et al. 1997, Cotton et al. 1993, Sheffield et al. 1993). Wir entwickelten für jedes Exon, die zwei APC-Schnittstellen und das Bindungsexon ein PCR-Assay und definierten für jedes Exon unter verschiedenen Variablen die besten Gel- und Laufbedingungen. Dabei variierten wir mit der Polyacrylamidkonzentration, mit oder ohne Glycerinzusatz, der Laufzeit und -geschwindigkeit, Raumtemperatur oder 4 °C und wählten so die jeweilig optimalen Gel- und Laufbedingungen. Zur Kontrolle von Wildtyp und Mutation wurden zunächst 102 Normalproben gesunder Probanden untersucht, die sich homogen als unauffällig in ihrem Laufverhalten darstellten und ließen auf jedem Gel eine Normalprobe mitlaufen. Um die Ergebnisse der SSCP zu interpretieren und zu dokumentieren, führten wir bei auffälligen Proben (Exon 19-Patient Nr. 9) eine Sequenzanalyse durch. Da die Sensitivität der SSCP jedoch nur bei 80 bis 90 % liegt und wir in der SSCP nur in einem Fall ein auffälliges Laufverhalten dokumentieren konnten, entschieden wir uns, bei allen 65 Patienten in allen drei Exons eine Sequenzanalyse durchzuführen. Für die in der Sequenzierung auffällig gewordenen Patientenproben (Exon 11-Patient Nr. 53, Exon 11-Patient Nr. 55) schlossen wir einen "mutationssensiblen" Restriktionsverdau und eine Gegenstrangsequenzierung als zusätzliche Untersuchungen an. Doch ließ sich in den angeschlossenen Untersuchungen in keinem der Fälle eine Mutation nachweisen.

Zu dem Zeitpunkt als wir die Analyse der Patienten-DNA-Proben durchführten, gab es in der Literatur noch keine Angaben zu weiteren Untersuchungen am *Faktor VIII*-Gen im Sinne einer APC-Resistenz an den APC-Schnittstellen in Exon 8/ 9 und Exon 11 und der APC-Bindungsstelle in Exon 19. Im Laufe der Zeit wurden mehrere Untersuchungen zu diesem Thema publiziert. So untersuchte die Arbeitsgruppe J. Roelse et al. (1995) die APC-Schnittstellen am Arginin³³⁶ und am Arginin⁵⁶² des *Faktor VIII*-Gen an 125 Patienten mit einmaligen oder wiederholten thromboembolischen Ereignissen. Die Arbeitsgruppe erarbeitete für jede der beide Schnittstellen einen Assay, in dem jeweils ein Ziel

für ein spezifisches Restriktionsenzym generiert wurde. Für das Arginin³³⁶ wurde eine Zielsequenz für Taq I und Rsa I sowie für das Arginin⁵⁶² eine Zielsequenz für Mbo II geschaffen. Das Einfügen von Schnittstellen ermöglicht einen mutationssensiblen Verdau der beiden APC-Schnittstellen, um so ein Screening der 125 Patienten auf eine mögliche Mutation an diesen Stellen zu ermöglichen. Der nachfolgende Verdau der Patienten-DNA ergab jedoch keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Mutation an diesen Stellen.

Die Arbeitsgruppe Bokarewa et al. (1997) veröffentlichte eine Studie, in der 74 Frauen mit thromboembolischem Geschehen in der Vorgeschichte mit einem aPTT- und einem Faktor IXa-Faktor X- basierenden Assay auf eine APC-Resistenz untersucht wurden. Davon waren 40 Patientinnen in dem aPTT-Assay und 35 in dem Faktor IXa-Faktor X-Assay positiv, 23 davon in beiden Assays. 22 Patientinnen hatten eine normale APC-SR. Alle 74 Patientinnen wurden nach PCR-Amplifizierung am Arginin³⁰⁶ und Arginin⁵⁰⁶ des Faktor V und am Arginin⁷⁴⁰ des Faktor VIII mittels Restriktionsenzymverdau untersucht. 29 Patientinnen wurden nach PCR-Amplifikation am Arginin³⁰⁶ und Arginin⁶⁷⁹ des Faktor V und am Arginin³³⁶ und Arginin⁵⁶² des Faktor VIII mittels Sequenzanalyse untersucht. 43 Patientinnen trugen die Faktor V Q⁵⁰⁶-Mutation. Sonst ließ sich in keinem Fall eine Mutation oder ein Polymorphismus nachweisen.

Hooper et al. (1998) veröffentlichte seine Ergebnisse zu einer Studie über die Abwesenheit von Mutationen an den APC-Schnittstellen Arginin⁵⁰⁶ des Faktor V und Arginin³³⁶ und Arginin⁵⁶² des Faktor VIII bei Afro-Amerikanern und den beiden APC-Bindungsstellen für Faktor V (Codon 1865 bis Codon 1873) und für Faktor VIII (Codon 2007 bis Codon 2015 = Exon 19) durch direkte Sequenzanalyse. Das Resultat ist, daß unter 32 Afro-Amerikanern mit Thrombose und 18 Afro-Amerikanern ohne Thrombose in der Vorgeschichte keine Mutationen in den APC-Bindungsstellen und APC-Schnittstellen des Gerinnungsfaktor V und des Gerinnungsfaktor VIII zu finden war.

Eine weitere Arbeit zu der Mutationsanalytik im *Faktor VIII*-Gen in den APC-Schnittstellenexons im Sinne einer APC-Resistenz veröffentlichte die Arbeitsgruppe Amano et al. (1998). Diese Arbeitsgruppe generierte drei Faktor VIII-Mutationsvarianten in COS 1 Affenzellen. Eine Mutation befand sich am Arginin³³⁶ (R336I), eine weitere am Arginin⁵⁶² (R562K) des Faktor VIII und eine Doppelmutation am Arginin³³⁶ und Arginin⁵⁶² (R336I/R562K) des Faktor VIII. Die nachfolgende APC-Resistenztestung ergab, daß die R336I-Mutante am Arginin³³⁶ resistent war für eine APC-vermittelte

Spaltung, jedoch am Arginin⁵⁶² sensibel für die APC-vermittelte Spaltung. Die R562K-Mutante war am Arginin³³⁶ sensibel, jedoch am Arginin⁵⁶² resistent für die APC-vermittelte Spaltung. Die Doppelmutante zeigte sich relativ resistent am Arginin³³⁶ und vollständig resistent am Arginin⁵⁶² für die APC-vermittelte Spaltung. Es wurde festgestellt, daß es keine spezielle Reihenfolge gibt, nach der der Faktor VIII gespalten wird. Die Funktionstestung ergab, daß die beiden Einzelmutanten langsamer als normal aber vollständig inaktiviert wurden. Nur die Doppelmutante zeigte sich komplett resistent gegen die APC-vermittelte Spaltung und wies eine erniedrigte APC-SR auf. Dies legt die Vermutung nahe, daß die APC-SR nicht geeignet ist, um eine einzelne Mutation im *Faktor VIII*-Gen zu detektieren. Ebenso ließe sich daraus schließen, daß die APC-vermittelte Spaltung an jeweils einer der beiden Schnittstellen den Faktor VIII nur partiell inaktiviert.

Eine aktuelle Untersuchung zu diesem Thema wurde von der Arbeitsgruppe Kamphuisen et al. (2000) veröffentlicht. Dort wurde festgestellt, daß eine Faktor VIII-Aktivität/ bzw. -Antigen > 150 IU/dl ein 5- bis 6-fach erhöhtes Thromboserisiko birgt und daß diese hohen Konzentrationen bei 25 % der Patienten mit einem ersten thromboembolischen Ereignis zu finden ist im Vergleich zu 11 % in der Kontrollgruppe. Eine Korrelation ergab, daß sowohl der von-Willebrand-Faktor als auch die Blutgruppe wichtige Determinanten dafür sind. In der vorliegenden Studie wurden 12 große Familien mit Thrombophilie und erhöhtem Faktor VIII-Antigen untersucht. 58 Verwandte hatten Faktor VIII-Konzentrationen > 150 IU/dl (32 %) und 50 Verwandte hatte nicht die Blutgruppe 0. Bei der Korrelation zeigte sich, daß die erhöhten Faktor VIII-Konzentrationen unter Schwestern (P= 0,003), unter Brüdern (P= 0,003), unter Schwestern und Brüdern (P< 0,001) und unter Müttern und Söhnen (P= 0,02) assoziiert sind. Unter Vätern und Töchtern und unter Vätern und Söhnen ergab sich jedoch keine signifikante Korrelation. Die Interpretation der Testergebnisse legt den Schluß nahe, daß hohe Faktor VIII-Antigen-Konzentrationen ein Risikofaktor für Thrombosen und ein familiär gehäuft auftretendes Phänomen darstellen, das anders als die Blutgruppe vererbt wird.

In der aktuellsten Arbeit von R. Bertina aus Leiden (2001) finden wir eine tabellarische Zusammenstellung von 34 Einzelnukleotidpolymorphismen, die im Rahmen der Thrombophilieforschung in den Proteinen der Gerinnungskaskade gefunden wurden. Sie betreffen insgesamt 23 Proteine des Gerinnungsmechanismus, jedoch befindet sich im Gerinnungsfaktor VIII in diesem Zusammenhang kein solcher Polymorphismus.

Dabei ist seit langem bekannt, daß Mutationen im Gerinnungsfaktor VIII vorhanden sind, die dann zu einer Hämophilie führen können.

Erstmalig wurden in der vorliegenden Arbeit molekularbiologische Untersuchungen der APC-Bindungsstelle im *Faktor VIII*-Gen bei Kaukasiern mit Thrombophilie durchgeführt. Auch diese Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Mutation oder eines Polymorphismus an diesen Stellen als mögliche Ursachen einer APC-Resistenz mit konsekutiver Thromboseneigung bei den von uns untersuchten 65 Patienten. Für die beschriebenen Faktor-VIII-Erhöhungen bei Trombophilie-Patienten scheint somit ein anderer Mechanismus verantwortlich zu sein, der zur Zeit noch nicht geklärt ist.

6 Zusammenfassung

Die Resistenz gegen das aktivierte Protein C (APC) ist eine weitverbreitete Ursache einer hereditären Thrombophilie. Diese Mutation im aktivierten Gerinnungsfaktor V verhindert eine durch das aktivierte Protein C vermittelte Inaktivierung und erhöht somit das Thromboserisiko. Jedoch gibt es einige Fälle einer Resistenz gegen das aktivierte Protein C, bei denen keine Faktor V Q⁵⁰⁶-Mutation vorliegt. Da sowohl Faktor V als auch Faktor VIII via APC inaktiviert werden, könnte in diesen Fällen eine Mutation im *Faktor VIII*-Gen vorliegen. Auch sind in der Literatur erhöhte Faktor VIII-Konzentrationen und Faktor VIII-Antigen-Werte mit einer erhöhten Thromboseneigung verknüpft. Wir untersuchten von 65 Patienten, die sich zur Abklärung einer Thromboseneigung in der Gerinnungsambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg vorstellten, neben den Routineuntersuchungen auf das mögliche Vorliegen einer Mutation in den beiden APC-Schnittstellen, Arginin³³⁶ und Arginin⁵⁶². Zusätzlich untersuchten wir erstmalig bei allen 65 Patienten mit Thrombophilie das APC-Bindungsexon 19 auf das mögliche Vorliegen einer Mutation. Wir führten zunächst nach einer PCR-Amplifikation der entsprechenden Exons eine SSCP-Gelelektrophorese als Screening-Methode durch, in der jedoch keine Laufunterschiede im Vergleich zu 102 Kontrollproben zu verzeichnen waren. Daraufhin führten wir an allen Patientenproben eine Sequenzanalyse durch, die jedoch auch keine Mutationen oder Polymorphismen detektierte. Es läßt sich auf Grundlage dieser Untersuchung nicht ausschließen, daß eine Mutation im *Faktor VIII*-Gen für eine APC-Resistenz verantwortlich sein könnte, jedoch konnten wir bei den 65 Patienten in den drei untersuchten Exons keine Mutationen nachweisen.

7 Literatur

- * Amano, K., Michnick, D., Moussalli, M., Kaufman, R. (1998). Mutation at either Arg336 or Arg562 in Factor VIII Is Insufficient for Complete Resistance to Activated Protein C (APC)-mediated Inactivation: Implications for the APC-Resistance Test. *Thrombosis and Haemostasis* 79, 557-563.

- * Barthels, M., Poliwoda, H. (1993). *Gerinnungsanalysen*, Thieme Verlag, 4. Auflage.

- * Bertina, R., Koeleman, B., Reitsma, P. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369, 64-67.

- * Bertina, R., Reitsma, P., Rosendaal, F.R., Vandenbroucke, J. (1995). Resistance to Activated Protein C and factor V Leiden as Risk Factors for Venous Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 74, 449-453.

- * Bertina, R. (2001). Genetic Approach to Thrombophilia. *Thrombosis and Haemostasis* 86, 92-103.

- * Bokarewa, M., Blombäck, M. (1994). Heterogeneity of the APC-Resistance Phenomenon. *Thrombosis Research* 75, 395-400.

- * Bokarewa, M., Falk, G., Bremme, K., Blombäck, M., Wiman, B. (1997). Search for Mutations in the genes for coagulation factors V and VIII with a possible predisposition to activated protein C resistance. *European Journal of Clinical Investigation* 27, 340-345.

- * Bontempo, F. A., Lewis, J. H., Gorenc, T. J., Spero, J. A., Ragni, M. V., Scott, J. P., Starzl, T. E. (1987). Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* 69, 1721-1724.

- * Dahlbäck, B. (1995). Inherited Thrombophilia: Resistance to Activated Protein C as a Pathogenetic Factor of Venous Thromboembolism. *Blood* 85, 607-614.

-
- * Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *The Lancet* 355, 1627-1632.

 - * Dianzani, I., Camaschella, C., Ponzzone, A., Cotton, R. (1993). Dilemmas and Progress in mutation detection. *TIG* 9, 403-406.

 - * Eaton, D., Rodriguez, H., Vehar, G. H. (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 25, 505-512.

 - * Fay, P. J., Haidaris, P. J., Huggins, C. F. (1993). Role of the COOH-terminal acidic region of A1 subunit in A2 subunit retention in human factor VIIIa. *Journal of Biological Chemistry* 268, 17861-17866.

 - * Freije, D., Schlessinger, D. (1992). A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *American Journal of Human Genetics* 51, 66-80.

 - * Gitschier J, Wood W. I., Goralka T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Vehar, G. H., Capon D. J., Lawn R. M. (1984). Characterisation of the human factor VIII gene. *Nature* 312, 326-330.

 - * Gitschier, J., Kogan, S., Levinson, B. Tuddenham, E. G. D. (1988). Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. *Blood* 72, 1022-1028.

 - * Griffin, J., Heeb, M., Kojima, Y., Fernandez, J. A., Kojima, K., Hackeng, T. M., Green-gard, J. (1995). Activated Protein C Resistance: Molecular Mechanisms. *Thrombosis and Haemostasis* 74, 444-448.

-
- * Henkens, C., Bom, V. J., van der Meer, J. (1995). Lowered APC-Sensitivity Ratio Related to Increased Factor VIII-Clotting Activity. *Thrombosis and Haemostasis* 74, 1197-1207.

 - * Higushi, M., Wong, C., Kochan, L., Olek, K., Aronis, S., Kasper, C. K., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E. (1990). Characterisation of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics* 6, 65-71.

 - * Hildebrand, B., Dahlbäck, B. (1994). Inherited resistance to activated Protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of Factor V. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 91, 1396-1400.

 - * Hill-Eubanks, D. C., Parker, C. G., Lollar, P. (1989). Differential proteolytic activation of factor VIII-von-Willebrand factor complex by thrombin. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 86, 6508-6512.

 - * Hooper, C., Dilley, A., Austin, H., Wenger, N. K., Benson, J., Evatt, B. L., Silva, V., Rawlins, P. (1998). Absence of Mutations at APC Cleavage Sites Arg306 in Factor V and Arg336, Arg562 in Factor VIII in African-Americans. *Thrombosis and Haemostasis* 79, 236.

 - * Johnson, J. D., Edman, J. C., Rutter, W. J. (1993). A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 90, 5677-5681.

 - * Juhan-Vague, I. (1995). Resistance to Activated Protein C- Diagnostic Strategy in a Laboratory of Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 74, 1197-1207.

 - * Kamphuisen, P., Lensen, R., Rosendaal, F., Houwing-Duistermaat, J. J., Eikenboom, J. C., Harvey, M., Bertina, R. M. (2000). Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia. *British Journal of Haematology* 109, 519-522.

-
- * Kane, W. H., Davie, W. E. (1986). Cloning of cDNA for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 83, 6800-6804.

 - * Koschinsky, M. L., Funk, W. D., van Oost, B. A., MacGillivray, R. T. (1986). Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 83, 5086-5090.

 - * Koster, K., Blann, A. D., Rosendaal, F. R. (1995). Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *The Lancet* 345, 152-155.

 - * Laprise, L., Mak, E., Killoran, K. A., Layman, J. C., Gray, M. (1998). Use of Denaturing Gradient Gel Blots to Screen for Point Mutations in the Factor VIII Gene. *Human Mutation* 12, 393-402.

 - * Levinson, B., Kenwrick, S., Lakich, D., Hammonnds, G., Gitschier, J. (1990). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 7, 1-11.

 - * Levinson, B., Kenwrick, S., Gamel, P., Fisher, K., Gitschier, J. (1992). Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics* 14, 585-589.

 - * Leyte, A., van Schijndel, H. B., Niehrs, C., Huttner, W. B., Verbeet, M. P., Mertens, K., van Mourik, J. A. (1991). Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII and von-Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* 266, 740-746.

 - * Nollau, P., Wagener, C. (1997). Methods for Detection of point mutations: Performance and quality assessment. *Clinical Chemistry* 43:7, 1114-1128.

 - * Osterud, B., Robertsen, R., Asvang, G. B., Thijssen, F. (1994). Resistance to activated protein C is reduced in women using oral contraceptives. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 5, 853-854.

-
- * O'Brien, D.P., Johnson, D., Byfield, T., Tuddenham, E.G. (1992). Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry* 31, 2805-2812.

 - * Pittman, D. D., Kaufman, R. J. (1988). Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 85, 2429-2433.

 - * Pittman, D. D., Wang, J. H., Kaufman, R. J. (1992). Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* 31, 3315-3325.

 - * Poustka, A., Dietrich, A., Langenstein, G., Toniolo, D., Warren, S. T., Lehrach, H. (1991). Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 88, 8302-8306.

 - * Roelse, J. C., Koopman, M. M., Büller, H.R., Ten Cate, J. W., Montaruli, B., Van Mourik, J. A., Voorberg, J. (1996). Absence of mutations at the activated protein C cleavage sites of factor VIII in 125 patients with venous thrombosis. *British Journal of Haematology* 92, 740-743.

 - * Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

 - * Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, second edition.

 - * Sheffield, V., Beck, J., Kwitek, A. E., Sandstrom, D. W., Stone, E. (1993). The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16, 325-332.

-
- * Shen, L., Dahlbäck, B. (1994). Factor V and Protein S as Synergistic Cofactors to Activated Protein C in Degradation of Factor VIIIa. *Journal of Biological Chemistry* 269, 18735-18738.

 - * Strengers, P., van Aken, W. (1996). *Blut: Von der Magie zur Wissenschaft*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

 - * Svensson, P., Dahlbäck, B. (1994). Resistance to Activated Protein C as a Basis for Venous Thrombosis. *New England Journal of Medicine* 330, 517-522.

 - * Tuddenham, E. G. D., Schwaab, R., Cooper, D. N. (1994). Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Research* 22, 3511-5333.

 - * Vasse, M., Gaucher, C., Beufe, S., Van Dreden, P., Monconduit, M., Mazurier, C., Borg, J. Y., Soria, C. (1995). Analysis of Factor VIII in a Family with Inherited Resistance to Protein C without Factor V-Leyden. *Thrombosis and Haemostasis* 73, 1369.

 - * Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M., Cappon, D. J. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature* 312, 337-342.

 - * Voorberg, J., Roelse, J., Koopman, R., Büller, H., Berends, F., ten Cate, J. W., Mertens, K., van Mourik, J. (1994). Association of Idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of Factor V. *The Lancet* 343, 1535-1536.

 - * Walker, F. J., Chavin, S. I., Fay, P. J. (1987). Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 252, 322-328.

 - * Wion, K. L., Kelly, D., Summerfield, J. A., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M. (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 317, 726-729.

- * Zelechowska, M. G., van Mourik, J. A., Brodniewicz-Proba, T. (1985). Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature* 317, 729-731.

- * Zöller, B., Dahlbäck, B. (1994). Linkage between inherited resistance to activated Protein C and factor V gene mutation in veous thrombosis. *The Lancet* 343, 1536-1538.

- * Zöller, B., Svensson, P., He, X., Dahlbäck, B. (1994). Identification of the Same Factor V Gene Mutation in 47 out of 50 Thrombosis-prone Families with Inherited Resistance to Activated Protein C. *Journal of Clinical Investigation* 94, 2521-2524.

- * Zöller, B., Berntsdotter, A., Garcia, P., Dahlbäck, B. (1995). Resistance to Activated Protein C as an Additional Genetic Risk Factor in Hereditary Deficiency of Protein S. *Blood* 85, 3518-3523.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ich danke Karsten, Jona, Lelio, Dörthe, Torsten, Christoph, Ingo und Andrea für viel Unterstützung und Geduld zu Hause.

Ich danke Tania, Lexi, Ingevild, Ines und insbesondere Do und Sam, für die Betreuung meiner Söhne während des Schreibens.

Ich danke Marcus, Kersten, Florian, Thomas, Christian, Ebi, Raid, Julica, Nicole, Phillip, Conny, Hans-Holger, Kerstin, Birgit und Andrea für die nicht immer wissenschaftliche Betreuung im Labor.

Ich danke Ala und Feli für die Hilfe beim Formatieren.

Ich danke meinen Freunden für Geduld, Trost und Unterstützung.

Ich danke Jens und Roman für die wissenschaftliche Betreuung, die Geduld und Hilfestellung, die sie mir gaben.

Ich danke Professor Wagener für das Vertrauen.

Ich danke Sabine Wuttke für die graphische Bearbeitung der Arbeit und des Vortrages.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Hormonlabors für eine schöne Zeit und für die besondere Unterstützung in Notsituationen, die nicht selbstverständlich war.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für viel Liebe, Vertrauen, Unterstützung und so vieles mehr, daß man es gar nicht aufzählen kann.

8.2 Curriculum Vitae

Vor- und Zuname: Janneke Ohlhoff, geb. Groth
 Geburtsdatum: 17. April 1971
 Geburtsort: Oldenburg in Oldenburg
 Nationalität: Deutsch
 Familienstand: verheiratet
 Kinder: Jona Norwin Ohlhoff,
 geb. am 02. Juni 2000
 Lelio Bengt Ohlhoff,
 geb. am 30. Oktober 2001
 Konfession: Evangelisch-lutherisch
 Adresse: An der Verbindungsbahn 10,
 20146 Hamburg

Ausbildung:

Schulische Ausbildung:

- Besuch der Grundschule Mentzhausen, Wesermarsch: 1977-1981
- Besuch der Orientierungsstufe Jaderberg, Wesermarsch: 1981-1983
- Besuch des Jade-Gymnasiums, Wesermarsch: 1983-1990
- Abitur im Sommer 1990

Universitäre Ausbildung:

- Beginn des Studiums der Humanmedizin in Hamburg im WS 1991/ 1992
- Physikum und Eintritt in die klinischen Semester im Frühjahr 1994
- 1. Staatsexamen im Frühjahr 1995
- 2. Staatsexamen im Frühjahr 1999
- Praktisches Jahr vom April 1999 bis zum März 2000
- 3. Staatsexamen im April 2000

Tätigkeiten:

- Freiwilliges soziales Jahr im St. Hildegard Krankenhaus in Berlin vom Oktober 1990 bis zum September 1991
- studentische Sitzwachtätigkeit im Krankenhaus Bethanien in Hamburg von Frühjahr 1992 bis Frühjahr 1996
- studentische Sitzwachtätigkeit auf der internistischen Intensivstation des UKE von Frühjahr 1996 bis Mitte 1998
- Teilnahme am Kursus für Tropenmedizin am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg vom 02. April 2001 bis zum 29. Juni 2001 mit Erlangung des Diploms für Tropenmedizin

8.3 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.