

**Untersuchungen zum Einfluß der Faktor-V^{R506Q}-
Konzentration auf die APC-Sensitivität und Nachweis einer
Faktor-V-unabhängigen den Gerinnungsfaktor X aktivie-
renden Protease in kultivierten hepatischen Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kerstin Bender, geb. Benner
aus Wetzlar

Gießen 2002

Aus dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung
Kerckhoff-Klinik GmbH, Bad Nauheim
Abteilung Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

Leiter: Prof. Dr. G. Müller-Berghaus

Gutachter: Prof. Dr. B. Pötzsch

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 11.02.2003

ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
APC	Aktiviertes Protein-C
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Arg	Arginin
AT	Antithrombin
Aqua bidest.	Zweifach deionisiertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ⁺⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Faktor
Fa	aktivierter Faktor
FCS	Fötales Kälberserum
G	Glutamin
Glu	Glutamin
HBS	Hepes-gepufferte Kochsalzlösung
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hepes	4-(2 Hydroxymethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MgCl	Magnesiumchlorid

Abkürzungen

Mw	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NHP	Normales Humanes Plasma
OPD	Orthophenyldiamin
P	Penicillin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	Protein-C
PCI	Protein-C-Inhibitor
PL	Phospholipide
PS	Protein-S
PT	Prothrombin
POD	Peroxidase
RhAPC	Rekombinantes humanes aktiviertes Protein-C
RhPC	Rekombinantes humanes Protein-C
RT	Raumtemperatur
S	Streptomycin
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SFM	Serumfreies Medium
SR	Sensitivitäts-Ratio
T	Thrombin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tween	Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurat
t-PA	tissue-type-Plasminogenaktivator
u-PA	urokinase-type-Plasminogenaktivator

Abkürzungen

ü. N.

über Nacht

vWF

von Willebrand Faktor

Maßeinheiten

MAßEINHEITEN

Da, kDa	Dalton, Kilodalton
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Picogramm
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, µM	Mol, Millimol, Mikromol
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	Unit
V	Volt

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Pathophysiologie des Hämostasesystems	1
1.2. Protein-C	4
1.3. Aktiviertes Protein-C	5
1.4. Faktor-V	6
1.5. Faktor-Va	7
1.6. APC-Resistenz	9
1.7. Zielsetzung	10
2. MATERIALIEN	13
2.1. Geräte	13
2.2. Reagenzien	15
2.3. Verbrauchsmaterialien	17
3. METHODEN	19
3.1. Isolierung und Reinigung von rekombinatem humanem Protein-C	19
3.1.1. Isolierung	19
3.1.2. Reinigung (nach Yan et al.; 1990)	19
3.1.3. Barium-Citrat-Fällung (nach Fujikawa et al.; 1976)	20
3.2. Lagerung von isoliertem rekombinatem humanem Protein-C	21

3.3. Aktivierung von isoliertem rekombinantem humanem Protein-C und dessen Reinigung	21
3.3.1. Aktivierung	21
3.3.2. Reinigung	21
3.4. Lagerung von rekombinantem humanem aktiviertem Protein-C	21
3.5. Proteinbestimmung nach Bradford	22
3.6. ELISA zum Nachweis von rekombinantem humanem Protein-C und rekombinantem humanem aktiviertem Protein-C	22
3.7. Protein-C-Aktivitätstest	24
3.8. SDS-PAGE (nach Laemmli; 1970)	24
3.9. Silberfärbung (nach Merril et al.; 1981)	26
3.10. Western-Blot-Analyse (nach Towbin et al.; 1975)	27
3.11. Gewinnung und Lagerung von Blutplasma	29
3.12. Bestimmung der APC-Resistenz mit dem APC-Resistenz Kit (Chromogenix; nach Dahlbäck et al.; 1993)	29
3.13. Amidolytischer Test zur Bestimmung der APC-Resistenz	30
3.13.1. Herstellung von Phospholipiden	30
3.13.2. Prinzip des amidolytischen Tests	30
3.14. ELISA zum Nachweis von Faktor-V	30
3.14.1. Biotinylierung von Kaninchen-Anti-Human-Faktor-V-Antikörper	31
3.14.2. Vorgehen bei der Entwicklung der ELISA's	32

3.15. Zellkultur	33
3.15.1. Auftauen der Zellen	34
3.15.2. Einfrieren der Zellen	34
3.15.3. Splitten der Zellen	34
3.16. Kultivierung von HepG₂-Zellen	35
3.17. Kultivierung von Endothelzellen	36
3.18. Kultivierung von SK-Hep-1-Zellen	36
3.19. Kultivierung von CL-48-Zellen (human embryo liver cells)	37
3.20. Kultivierung von CCL-13-Zellen (Chang liver)	37
4. ERGEBNISSE	38
4.1. Isolierung und Reinigung von rekombinantem humanem Protein-C	38
4.1.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	39
4.1.2. Nachweis von rekombinantem humanem Protein-C im ELISA	39
4.1.3. SDS-PAGE von rekombinantem humanem Protein-C	40
4.1.4. Western-Blot von rekombinantem humanem Protein-C	41
4.1.5. Aktivitätsmessung von rekombinantem humanem Protein-C	42
4.2. Aktivierung von rekombinantem humanem Protein-C	44
4.2.1. Western-Blot von rekombinantem humanem aktiviertem Protein-C	45
4.3. Veränderung von aPTT und APC/aPTT in sec bzw. der APC-SR bei abnehmender Faktor-V-Konzentration im APC-R-Coatest^R	47

4.4. Veränderung der Faktor-Va-Restaktivität bei abnehmender Faktor-V-Konzentration im amidolytischen Testverfahren	51
4.5. Verhalten von aPTT und APC/aPTT in sec bzw. der APC-SR bei Veränderung des Verhältnis von Faktor-V^{wt}/Faktor-V^{R506Q} im APC-R-Coatest^R	52
4.6. Verhalten der Faktor-Va-Restaktivität bei Veränderung des Verhältnis Faktor-V^{wt}/Faktor-V^{R506Q} im amidolytischen Testverfahren	54
4.7. Veränderung von aPTT und APC/aPTT in sec bzw. der APC-SR bei gleichzeitiger Veränderung von Quantität und Qualität von Faktor-V im APC-R-Coatest^R	55
4.8. HepG₂-Zellen in Kultur	59
4.9. Sensitivitätstestung	61
4.10. Intra- und Interassayvarianz des amidolytischen Tests	63
4.11. Zellversuche mit HepG₂-Zellen	64
4.12. Aufbau eines polyklonalen und eines monoklonalen ELISA's zum Nachweis von Faktor-V	74
4.12.1. Aufbau des polyklonalen ELISA's	74
4.12.2. Aufbau des monoklonalen ELISA's	77
4.13. Nachweis von Faktor-V im Zellversuch	79
4.14. Stimulierung der HepG₂-Zellen mit Zytokinen	82
4.15. Hemmung der Faktor-Va-Kofaktoraktivität durch einen polyklonalen Antikörper gegen Faktor-V	92

4.16. Nachweis einer Phospholipid-unabhängigen Faktor-X-Aktivierung durch HepG₂-Zelllysat	95
4.17. Zellversuche mit weiteren Leberzellen	97
5. DISKUSSION	98
6. ZUSAMMENFASSUNG	107
7. LITERATURVERZEICHNIS	109
8. ANHANG	124
9. DANKSAGUNG	128
10. LEBENSLAUF	129

1. Einleitung

1.1. Pathophysiologie des Hämostasesystems

Die regelrechte Funktion des Hämostasesystems wird unter physiologischen Bedingungen aufrechterhalten durch ein Zusammenwirken von Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatischem Gerinnungspotential, welches von koagulatorischen und fibrinolytischen Faktoren gebildet wird und einer strikten Kontrollinstanz unterworfen ist. Die Reaktion der Gefäßwand bei einer Verletzung besteht in einer lokalen Vasokonstriktion, die vorwiegend über Stimulation sympathischer Nervenendigungen ausgelöst wird. An die verletzte Gefäßwand lagern sich Blutplättchen an und bilden einen Thrombozytenpfropf, der zur Abdichtung der Läsion führt. Diese Vorgänge werden unter dem Begriff der primären Hämostase zusammengefaßt. Da der Thrombozytenpfropf die Gefäßwand über einen längeren Zeitraum nicht dicht halten kann, wird die sekundäre Hämostase in Form der plasmatischen Gerinnung aktiviert. Durch das Zusammenspiel von koagulatorischen und fibrinolytischen Komponenten wird bei einer Gefäßverletzung zum einen eine ausreichende Blutstillung erreicht und zum anderen eine überschießende Thrombosierung verhindert. Erkrankungen im hämostaseologischen System, die zu einem Verlust der regulierten Balance führen, können sich in verstärkter Blutungsneigung äußern oder zu erhöhter Gerinnungsaktivität führen. Das plasmatische Blutgerinnungssystem wird gebildet von verschiedenen Blutgerinnungsfaktoren, die über eine Kaskade miteinander verbunden sind. Das bedeutet, daß ein Faktor den Vorläufer (Zymogen) eines anderen durch limitierte Proteolyse in die enzymatisch aktive Form umwandelt (Mann et al.; 1988). Die gerinnungsfördernden Komponenten sind einkettige Glykoproteine und überwiegend Serinproteasen, bezeichnet nach ihrem katalytischen Zentrum. Die Faktoren II, VII, IX, X sowie PC und PS zählen zu den Vitamin-K-abhängigen Serinproteasen. Diese Vitamin-K-Abhängigkeit beruht auf einer Modifikation von Glutaminsäureresten zu γ -Carboxyglutaminsäure, welche durch

eine Vitamin-K-abhängige mikrosomale Carboxylase katalysiert wird. Unterschieden werden ein endogener und ein exogener Aktivierungsweg. Beide sind über funktionelle Querverbindungen miteinander verknüpft. Über eine gemeinsame Endstrecke beider Aktivierungsformen wird letztendlich ein stabiles, quervernetztes Fibringerinnsel gebildet.

Siehe Abbildungsverzeichnis im Anhang; Abbildung 1: Ablauf der sekundären Hämostase (Hiller und Riess; 1988/Gross, Schölmerich und Gerok; 1994)

Das endogene Gerinnungssystem startet durch Aktivierung des FXII bei Adsorption an eine benetzbare Oberfläche. Dieser Vorgang wird als Kontaktaktivierung bezeichnet. Die Aktivierung des exogenen Systems beginnt mit der Freisetzung von Thromboplastin aus Gewebszellen oder aktivierten Makrophagen. FXa und FVa bilden zusammen mit PL den sogenannten Prothrombinase-Komplex, der in Gegenwart von Kalziumionen zu einer Aktivierung von PT zu T führt. T ist verantwortlich für eine Thrombozytenaktivierung und spaltet FV und FVIII sowie FXI im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus zu aktiven Komponenten. Folge ist eine verstärkte Thrombingenerierung (Esmon; 1989). T spaltet aus Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B ab. Dadurch werden Polymerisationsseiten freigelegt, die eine Aggregation der Fibrinmonomere ermöglichen. Die Stabilität des Fibringerinnsels wird über Quervernetzung durch FXIIa, eine durch T aktivierte Transglutaminase, erreicht. Diesem Gerinnungsprozeß steht das Fibrinolyse-System gegenüber. Beide Systeme werden über positiv und negativ wirkende Feedback-Mechanismen reguliert. Zum Auflösen eines Fibringerinnsels dient die Bindung an Plasminogen und dessen Aktivierung durch t-PA oder u-PA zu Plasmin (Lijnen und Collen; 1982). Die Aktivierung von Plasminogen erfolgt durch Spaltung der Peptidbindung zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶². Die so entstandene Serinprotease Plasmin spaltet nun, als Endopeptidase wirkend, ihre Substrate an Lysin- oder Argininresten. Fibrin wird durch Plasmin in lösliche Spaltprodukte umgewandelt. Auch Fibrinogen, PT, FV und FVIII sind potentielle Substrate für Plasmin. Ein weiterer wichtiger Baustein im

antikoagulatorischen Schenkel der Hämostase ist die Bindung von T an den Endothelzellrezeptor TM. Esmon et al. beschrieben als erste 1982 die Isolierung eines Kofaktors zur Thrombin-katalysierten, kalziumabhängigen PC-Aktivierung aus der Lunge eines Kaninchens und gab ihm den Namen TM. Schon 1981 wurde die Anwesenheit eines Zell-Kofaktors in EC beschrieben, welcher die PC-Aktivierung durch T beschleunigt (Esmon und Owen; 1981). Gebunden in diesem Komplex verliert T, durch Konformationsänderung, seine ursprüngliche prokoagulatorische Funktion zugunsten einer antikoagulatorischen Aufgabe und konvertiert PC in der Gegenwart von Kalziumionen zu einer Serinprotease, indem es ein 12 Aminosäuren langes Peptid abspaltet. APC ist in der Lage FVa und FVIIIa zu spalten und somit zu inaktivieren und in deren Folge die Thrombinbildung zu vermindern (Stenflo; 1976/Kisiel et al.; 1979). Das bedeutet, T hat nicht nur prokoagulatorische, sondern auch antikoagulatorische Potenz. Die von EC synthetisierten sulfatierten Mukopolysaccharide sind in der Lage T zu inaktivieren (Buonassisi; 1973). Zusätzlich zirkulieren im Plasma Proteinaseinhibitoren, die man unter dem Begriff der Serpine (Serinproteaseinhibitor) zusammengefaßt hat. Dazu zählen AT, als potentester Inhibitor, Heparin-Cofaktor II (Tollefsen und Majerus; 1982), PAI-1 (Loskutoff et al.; 1983) und PAI-2 (Lecander und Astedt; 1986), PCI=PAI-3 (Stumps et al.; 1986), Protease Nexin I (Baker et al.; 1980) sowie α_1 -Antiplasmin (Messmore; 1982). α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin und α_1 -Proteinaseinhibitoren sind weitere bekannte Serpine. α_1 -Antiplasmin hemmt ausschließlich die fibrinolytische Aktivität von freiem Plasmin (Collen; 1980). Fibringebundenes Plasmin bleibt vor Inaktivierung geschützt, weil die notwendigen Lys-Bindungsstellen für α_1 -Antiplasmin nicht zugänglich sind. Die Fibrinolyse bleibt deshalb auf das Fibringerinnsel beschränkt.

1.2. Protein-C

PC wurde 1960 von Mammen et al. erstmalig und 1976 von Seegers et al. unter dem Namen Autoprothrombin IIa beschrieben. Aufgereinigt wurde PC aus bovinem (Stenflo; 1976) und humanem Plasma (Kisiel; 1979) sowie als rekombinantes humanes PC aus drei verschiedenen Säugetier-Zelllinien (Yan et al.; 1990). PC ist eine Vitamin-K-abhängige Serinprotease, die von Hepatozyten synthetisiert wird und im Blut zunächst als inaktive Form vorliegt. Die Plasmakonzentration beträgt 3 bis 5 µg/ml. Das Molekulargewicht wird mit 62 kDa angegeben. Die Halbwertszeit im Plasma ist mit 8 h beschrieben (Human Protein Data; 1992). Synthetisiert wird zunächst ein einkettiges Vorläuferprotein, bei dem ein Lys-Arg-Dipeptid herausgeschnitten wird. Dadurch entsteht ein zweikettiges Molekül, welches über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden ist. Es wird eine leichte Kette mit 21 kDa von einer schweren Kette mit 41 kDa unterschieden. Beide Ketten sind sowohl strukturell als auch funktionell unterschiedlich. Die schwere Kette ist an mehreren Stellen im Molekül glykosyliert. Die Glykosylierung von humanem PC beeinflusst seine Sekretion, Proteolyseprozesse und die Aktivierung durch T. So konnte durch Elimination von Glykosylierungen im Bereich der schweren Kette eine zwei- bis dreifache Steigerung der antikoagulatorischen Aktivität beobachtet werden, unabhängig von der Kalziumkonzentration (Grinnell et al.; 1991). PC weist eine große Homologie zu anderen Vitamin-K-abhängigen Plasmaproteinen wie FII, FVII, FIX, FX und PS auf (Pattky; 1985). Am aminoterminalen Ende der leichten Kette befindet sich die sogenannte Gla-Domäne (Suttie et al.; 1987), die aus 9 Carboxyglutaminsäureresten besteht, eine geringe Affinität zu Kalziumionen hat und mit negativ geladenen Oberflächen in Kontakt tritt (Jackson und Nemerson; 1980/Nishioka et al.; 1996). Daneben sind in der leichten Kette noch zwei Domänen bekannt, die eine große Homologie zum EGF zeigen und die zusammen mit dem β -Hydroxyasparaginsäurerest in Position Asp⁷¹ der ersten Domäne eine relativ große Kalziumaffinität besitzen und für die Interaktion mit PS dienen (Öhlin et al.; 1988). Weiterhin ist beschrieben, daß Gla-Domäne und beide EGF-

ähnlichen Sequenzen im PC-Molekül in Kombination die höchste Bindungsenergie für den T/TM-Komplex aufweisen (Hogg et al; 1992). Die schwere Kette trägt das katalytische Zentrum der Serinprotease, welches sich zusammensetzt aus den Aminosäuren His⁵⁴, Asp¹⁰⁰ und Ser²⁰³ und dem Aktivierungspeptid, welches sich am aminoterminalen Ende der schweren Kette befindet und aus 12 Aminosäuren aufgebaut ist.

1.3. Aktiviertes Protein-C

PC muß aktiviert werden, um seine Funktion im Hämostasesystem erfüllen zu können. Die proteolytische Abspaltung des Aktivierungspeptids erfolgt in der Gegenwart von Kalziumionen durch an TM gebundenes T (Esmon et al.; 1982). Die Spaltstelle liegt zwischen den Aminosäuren Arg¹⁶⁹ und Leu¹⁷⁰ (Kisiel; 1979). Auch ohne die Anwesenheit des Endothelzellrezeptors TM ist eine Abspaltung des Peptids möglich, jedoch wesentlich ineffizienter als in der Gegenwart des membranständigen Cofaktors (Kisiel; 1976/Esmon und Owen; 1981). Zusätzlich wird die allein durch T katalysierte Spaltung durch Kalziumionen gehemmt. APC inaktiviert die Gerinnungsfaktoren Va und Vllla durch proteolytische Spaltung und kontrolliert die Umwandlung von FX zu FXa und von PT zu T (Bauer; 1994), was einen verminderten Fibrinogenumsatz zur Folge hat (Kisiel et al.; 1977). Dazu wird unter physiologischen Bedingungen ein Multienzymkomplex gebildet, der aus negativ geladenen Phospholipidmembranen, Kalziumionen, FVa, FVllla, PS und APC besteht (Müller-Berghaus und Preissner; 1987). APC wirkt nicht auf zirkulierenden FV und FVlll ein (Dahlbäck; 1994). PS ist ein Vitamin-K-abhängiger Cofaktor von APC. Es ist unter physiologischen Bedingungen nur zu 40 % frei im Plasma vorhanden und für APC zugänglich, 60 % sind an das C4b-Bindungsprotein gebunden (Bauer; 1994). APC bildet mit dem Serpin PAI-1 einen Komplex (Sakata et al.; 1985), der zur Folge hat, daß PAI-1 nicht mehr länger in der Lage ist Plasminogenaktivatoren zu inhibieren. Damit wird die Fibrinolyse erhöht. Diese Reaktion kann durch Heparin auf das 30-fache beschleunigt werden (Suzuki et al.; 1984). In vivo wird APC hepa-

rinunabhängig durch PCI (Suzuki et al.; 1987) und α_1 -Antitrypsin (Heeb und Griffin; 1988) reguliert. Ein PC-Mangel kann hereditär oder erworben sein und ist verbunden mit einem erhöhten Thromboserisiko, aufgrund der beeinträchtigten Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa. Bei Plasma-PC-Antigenkonzentrationen von weniger als 0,5 U/ml wird von einem erhöhten Thromboseisiko ausgegangen (Broekmans et al.; 1983). Beschrieben wurden zwei Familien mit thrombotischen Ereignissen und isoliertem PC-Mangel 1980 von Griffin et. al. und 1982 von Bertina et al.. Es handelt sich bei den erblichen Formen um einen autosomal dominanten Erbgang, der in homozygoter und heterozygoter Ausprägung vorkommen kann (Broekmans et al.; 1983). Homozygote Träger entwickeln schon postpartal eine neonatale Purpura fulminans (Marciniak et al.; 1985) und/oder massive Venenthrombosen. Heterozygote Träger werden durch rezidivierende thrombotische Ereignisse nach Abschluß der Pubertät auffällig (Horellou et al.; 1984).

Siehe Abbildungsverzeichnis im Anhang; Abbildung 2: PC/APC (Dahlbäck; 1994)

1.4. Faktor-V

FV wird als einkettiges Glykoprotein von Hepatozyten (Olson et al.; 1966) und Megakaryozyten (Chiu et al.; 1983) synthetisiert. Laut Cervený, Rodgers und Annamalai sind auch EC in der Lage FV zu synthetisieren, wobei Giddings die FV-Synthese von EC nicht bestätigen konnte. Auch HepG₂-Zellen sind nach Wilson et al. in der Lage FV zu produzieren. Tracy et al. konnten 1983 FV in Monozyten und Lymphozyten nachweisen. Die relative Molekularmasse von FV wird mit 330 kDa angegeben (Kalafatis et al.; 1994), zu der ein hoher Anteil an Sializylsäure und ein Gewichtsanteil von 13 % Carbohydrat beitragen (Kane und Majerus; 1981). Die Plasmakonzentration variiert zwischen 4 und 14 µg/ml. Die Halbwertszeit von Faktor V ist bislang unbekannt (Haeberli; 1992). Entdeckt wurde FV bereits 1947 von Owren. Er beschrieb einen Gerinnungsfaktor,

der in normalem Plasma nachweisbar war, nicht jedoch im Plasma einer 21-jährigen Patientin mit Blutungskomplikationen. Mit konventionellen Methoden wurden bisher boviner (Esmon; 1979/Nesheim; 1979) und humaner FV (Rosenberg et al.; 1975/Dahlbäck; 1980/Kane et al.; 1981) isoliert. Katzman et al. isolierte 1981 humanen FV mit Hilfe eines monoklonalen AK's und konnte damit eine höhere Aufreinigungsrate erzielen. Chiu et al. benutzten 1983 zur FV-Isolierung aus humanem Plasma einen monoklonalen AK gegen FV, der von Hurtubize et al. 1979 aus Patienten-Plasma gewonnen wurde und eine hohe FV-Spezifität aufweist. Die Aufreinigung von FV gestaltet sich schwierig, da er als sehr instabil beschrieben ist, eine große Empfindlichkeit gegenüber proteolytischen Enzymen zeigt und zur Bildung von Polymeren neigt (Chiu et al.; 1983).

1.5. Faktor-Va

Durch T wird FV an den drei Peptidbindungsstellen Arg⁷⁰⁹, Arg¹⁰¹⁸ und Arg¹⁵⁴⁵ zu FVa gespalten und damit eine Konformationsänderung bewirkt. Marquette et al. konnten 1995 zeigen, daß die Spaltung an Position 1018 die Spaltung an Position 1545 fördert bzw. erleichtert und die Aminosäurenregion zwischen 1476 und 1545 genauso wichtig für eine Aktivierung ist. FVa hat selbst keine Enzymfunktion, sondern wirkt in Gegenwart von Kalziumionen und PL in der FXa-katalysierten Prothrombinaktivierung als Kofaktor (Colman; 1976/Kane und Majerus; 1981/Nesheim et al.; 1981). Durch die Aktivierung von PT durch FXa werden die PT-Fragmente₁₊₂ gebildet, die als Marker hyperkoagulatorischer Zustände dienen können (Zöller und Dahlbäck; 1996). Desweiteren fungiert FVa als Kofaktor zur Aktivierung von PC durch T (Salem und Majerus; 1983/Salem und Majerus; 1983). Nach Shen und Dahlbäck arbeiten FV und PS synergistisch als PL-gebundene Kofaktoren für die APC-katalysierte-FVIIIa-Inaktivierung, wobei das Maximum der FV-Kofaktoraktivität mit equimolaren Anteilen der Komponenten erreicht wird.

Siehe Abbildungsverzeichnis im Anhang; Abbildung 3: Mechanismus der Blutgerinnung (Tuddenham; 1994)

FVa setzt sich zusammen aus einer leichten (74 kDa) und einer schweren Kette (94 kDa), die in der Gegenwart von Kalziumionen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden (Esmon; 1979/Suzuki et al.; 1982). Inaktiviert wird FVa durch Spaltung der schweren Kette mit Hilfe von APC, wobei die Rate der Inaktivierung in der Gegenwart von Kalziumionen und PL stark erhöht ist (Suzuki et al.; 1983). Die Spaltstellen im FVa-Molekül befinden sich an den Stellen Arg³⁰⁶, Arg⁵⁰⁶, Arg⁶⁷⁹ und Lys⁹⁹⁴, wobei der Spaltstelle Arg³⁰⁶ eine Schlüsselrolle zur kompletten Inaktivierung von bovinem FVa zukommt (Kalafatis und Mann; 1993). Kalafatis et al. untersuchten 1994 und 1995 den Mechanismus der Inaktivierung von humanem FV und humanem FVa. Sie konnten zeigen, daß im FV-Molekül zunächst an der Stelle Arg³⁰⁶ (membranabhängig) und anschließend an der Aminosäure Arg⁵⁰⁶ gespalten wird. Im FVa-Molekül wird zunächst an Stelle Arg⁵⁰⁶ gespalten, wodurch die zweite Spaltstelle Arg³⁰⁶ durch eine bessere Exposition für APC zugänglicher wird. Wenn FXa, nicht so FX (Suzuki et al.; 1982) an FVa gebunden ist, kann die schwere Kette nicht gespalten werden und FV verbleibt aktiv. In der Gegenwart von FXa und PS werden die Unterschiede im Abbau von FVa^{wt} und FVa^{R506Q} verschwindend gering. Das erklärt, warum Patienten mit APC-Resistenz in der Abwesenheit anderer Risikofaktoren eine nur geringe thromboembolische Disposition zeigen. PS beschleunigt jedoch die FVa-Inaktivierung durch eine bis zu 20-fache Verstärkung der langsameren Spaltstelle Arg³⁰⁶ (Rosing et al.; 1995). Walker et al. identifizierten 1990 auch in der leichten Kette von FVa sowie in der leichten Kette von FVIII Bindungsstellen für APC. FVIII weist eine große Homologie zu FV auf und wirkt als Kofaktor für die FIXa-katalysierte-FX-Aktivierung. Eine FV-Mangelerkrankung ist unter dem Synonym der Parahämophilie beschrieben (Owren und Cooper; 1955). Die Erkrankung kann auch als kombinierter FV/FVIII-Mangel auftreten. Die Krankheit wird autosomal rezessiv vererbt und kann in homozygoter oder heterozygoter Ausprägung auftreten. Homozygote

Träger zeigen eine FV-Aktivität, die im Bereich zwischen 1-5 % liegt und zeichnen sich durch eine milde Blutungsneigung aus. Heterozygote Träger zeigen eine FV-Aktivität, die zwischen 20 und 60 % liegt sowie normales Blutungsverhalten.

Siehe Abbildungsverzeichnis im Anhang; Abbildung 4: FV/FVa (Kalafatis und Mann; 1994)

1.6. APC-Resistenz

Die APC-Resistenz wurde erstmals 1993 von Dahlbäck et al. beschrieben. Es handelt sich um ein Krankheitsbild aus dem Formenkreis der Thrombophilien, welches durch eine verminderte antikoagulatorische Wirkung von APC gekennzeichnet ist. Dahlbäck und Hildebrand konnten 1994 nachweisen, daß es sich hierbei um eine antikoagulatorische Funktionsstörung im FV-Molekül handelt, dessen prokoagulatorische Funktion jedoch voll erhalten ist. Sie isolierten aus normalem humanem Plasma einen Faktor, der den Defekt in betroffenen Patientenplasmen korrigierte. Ursache der Funktionsstörung ist in der Mehrzahl der Fälle eine Punktmutation im FV-Gen in der Position 1691, wobei Arg⁵⁰⁶ gegen Glu ausgetauscht ist (Bertina et al.; 1994). Man spricht von der R506Q-Mutation. Durch diesen Austausch wird eine wichtige Spaltstelle für APC zerstört. FVa^{R506Q} wird an der langsameren Spaltstelle Arg³⁰⁶ inaktiviert, mit der Folge eines dauerhaften hyperkoagulatorischen Zustandes und erhöhtem Risiko zur Entwicklung einer Thrombose (Aparicio und Dahlbäck; 1996). Das Krankheitsbild tritt unabhängig von einem PC- oder PS-Mangel auf (Griffin et al.; 1993). 1995 konnte erstmals ein junger Patient mit APC-Resistenz beschrieben werden, der gleichzeitig einen PS-Mangel Typ I zeigte (Zöller et al.; 1995). Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt und stellt nach heutigen Untersuchungen mit 30-40 % die häufigste Ursache von thromboembolischen Komplikationen dar (Svenson und Dahlbäck; 1994). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden viele verschiedene Patientenstudien durchgeführt, die zu dem

Ergebnis kamen, daß es noch weitere Ursachen für eine verminderte antikoagulatorische Wirkung von APC geben muß (Halbmeyer et al.; 1993/Zöller et al.; 1995). Untersucht wurde in diesem Zusammenhang eine Verknüpfung zwischen APC-Resistenz und Anticardiolipin-Antikörpern. Tsakirirs et al. konnten 1995 keinen Zusammenhang erkennen. Griffin et al. dagegen zeigten 1995, daß AK gegen den Cardiolipin/APC-Komplex oder gegen den Cardiolipin/PS-Komplex selektiv die PL-abhängige antikoagulatorische Aktivität des PC-Wegs vermindern (erworbene APC-Resistenz). Die verminderte antikoagulatorische Wirkung von APC kann in einer modifizierten aPTT-Messung (APC-R-Coatest^R) bewiesen werden. Plasma von gesunden Probanden reagiert durch die Inhibierung des Thrombins mit einer Verlängerung der aPTT nach Zugabe von APC. Plasmen von APC-resistenten Spendern reagieren im Vergleich dazu mit einer verkürzten aPTT. Das Ergebnis des Testverfahrens wird als sogenannte Sensitivitäts-Ratio angegeben. Dazu wird der Quotient aus einem Ansatz der aPTT-Messung in sec mit Zugabe von APC und einem Ansatz ohne APC gebildet. Die Sensitivitäts-Ratio sollte im Normalfall über dem Wert 2 liegen. Da die APC-SR von verschiedenen Faktoren wie Citrat-, Kalziumchlorid-, APC-, PS-Konzentration und Lagerungsbedingungen (Trossaert et al.; 1995) beeinflusst wird, erschien es zweckmäßig für vergleichbare Ergebnisse von Test zu Test eine gepoolte normale Plasmaprobe mitlaufen zu lassen und die sogenannte normalisierte APC-SR aus dem Quotienten APC-SR-Patient/APC-SR-Poolplasma zu bilden. Dabei wird ein Wert unter 0,84 als pathologisch bezeichnet (Ronde und Bertina; 1994). Weitere hereditäre Ursachen für Thromboembolien können, mit einem Anteil von jeweils 5 %, AT-Mangel, PS-Mangel und PC-Mangel sein (Bauer; 1994). Das bedeutet, daß noch immer ca. 30 % aller Ursachen von hereditären Thrombophilien unbekannt sind.

1.7. Zielsetzung

Die APC-Resistenz ist mit 30-40 % die bisher häufigste bekannte Ursache für thromboembolische Komplikationen (Svenson und Dahlbäck; 1994). Sie beruht

auf einer inadäquaten Inaktivierung von FVa durch APC. Ursache ist eine Punktmutation im FV-Genom. Bei symptomatischen homozygoten Merkmalsträgern sowie bei mehrfach symptomatischen heterozygoten Merkmalsträgern wird heute als Therapie eine lebenslange Antikoagulation durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen der Einfluß der FV^{R506Q}-Konzentration auf die APC-Sensitivität näher untersucht und darauf aufbauend kausale Therapieansätze aufgezeigt werden. Denkbar wären eine Verringerung des Gesamt-FV-Plasmaspiegels oder eine selektive Verminderung der FV^{R506Q}-Konzentration oder eine Kombination beider Ansätze. Weitere Möglichkeiten wären eine alternative Inaktivierung von FVa oder die Inhibierung der Aktivierung von FV schon im Vorfeld.

Um die FV-Funktion nachweisen zu können, sollen zunächst zwei Testverfahren Anwendung finden. Zum einen der konventionell im Handel erhältliche APC-Coatest^R der Firma Chromogenix, der auf einer modifizierten aPTT-Messung basiert. Hierbei werden die aPTT in sec in der Gegenwart von APC und ohne APC verglichen und aus dem Quotienten beider Werte die sogenannte APC-Sensitivitäts-Ratio gebildet, deren Wert über 2 liegen sollte. Zum anderen steht ein, im hiesigen Labor von Pötzsch et al. entwickelter, amidolytischer Test zur Verfügung, der auf der Messung der Kofaktoraktivität von FVa basiert. Über das chromogene Substrat S 2238 wird die Generierung von T gemessen. Das Ergebnis des Testverfahrens wird als FVa-Restaktivität angegeben und sollte 40 % nicht überschreiten. Zu beurteilen ist im Verlauf der Arbeit, wie sich aPTT und APC/aPTT in sec und die FV-Restaktivität in % verhalten, wenn die Quantität von FV verringert und/oder die Qualität von FV (Verhältnis zwischen FV^{wt}/FV^{R506Q}) verändert wird. Um nicht nur FV-Aktivität, sondern auch FV-Antigen nachweisen zu können, soll im Verlauf dieser Doktorarbeit ein ELISA entwickelt werden, der diesen Nachweis führt. Dieser Test muß reproduzierbar und standardisierbar sein. Weiterführend soll die FV-Regulation auf Proteinebene untersucht werden, was den Übergang auf Zellkulturtechniken erforderlich macht. In einem weiteren Schritt sollen Regulationsmechanismen der FV-Produktion anhand von Stimulationsversuchen mit Zytokinen beobachtet wer-

den. Durch diese Untersuchungen soll es möglich werden, eine Aussage darüber treffen zu können, welche Substanzen in der Lage sind, die FV-Produktion auf Proteinebene zu modifizieren. Ziel der Versuche ist eine phänotypische Besserung des Krankheitszustandes der APC-Resistenz.

2. Materialien

2.1. Geräte

Amelung, Lemgo:

Koagulometer KC 10 A micro

Amicon GmbH, Witten:

Ultrafiltrationseinheit

Beckman Instruments, Somerset (USA):

Zentrifuge J2-MC

Bio-Rad, München:

Gelelektrophorese- und Western-Blot-System Mini Protean II und Zubehör,
Spannungsgeber (Modell 200)

Branson (USA):

Ultrabeschallungsgerät mit Mikrospitze

Bühler, über Kühn & Bayer, Gießen:

Schüttler KS 10

Damm, Fredensborg (Dänemark):

Sterile Arbeitsbank ClanLAF VFR 1806

Eppendorf, Hamburg:

Pipetten, Tischzentrifuge

Heidolph Elektro KG, Kelheim:

Magnetrührer mit Heizvorrichtung Heidolph MR 2002

Heraeus Christ GmbH, Osterode:

Begasungsbrutschrank, Digifuge GL

Julabo, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf:

Wasserbad Julabo R5

Kühn & Bayer, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf:

Roller

Mettler-Toledo, Gießen:

Analysenwaage Mettler AE 163

Millipore, Eschborn:

Wasseraufbereitungsanlage Milli-RO-15

Olympus, Hamburg:

Kamera OM 2n

Schärfer System GmbH, Reutlingen:

Zellzählgerät Casy 1

Schott, Hofheim:

PH-Meter Typ WTW 523

SLT-Labinstruments, Crailsheim:

ELISA-Meßeinrichtung mit Inkubator

Tecnomara, Fernwald:

Begasungsbrutschrank Inkubator 1100

Zeiss, Oberkochen:

Mikroskop

2.2. Reagenzien

Agfa, Leverkusen:

Acidofix, Rodinal

American Diagnostica, Greenwich (USA):

Protac # 245

Behringwerke, Marburg:

Faktor-V-Mangelplasma, Faktor-Xa-Reagenz, Kalziumchlorid-Lösung 0,025 mol/l, Kaninchen-Anti-Human-Faktor-V

Biochrom, Berlin:

Ultra-Pure-Water (steril)

BIOMOL, Hamburg:

Recombinant-Human-Interleukin-8, Recombinant-Human-Tumor-Necrosis-Factor-alpha

Bio-Rad, München:

Biorad-Reagenz, Prestained High Marker für Gelelektrophorese und Western-Blot, Silver Reagent Concentrate, Silver Stain Developer, Silver Stain Oxidizer, TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine)

Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim:
Recombinant-Human-Interleukin-4, Recombinant-Human-Interleukin-6

Chromogenix AB, Mölndal (Schweden):
Chromogenes Substrat S 2238 und S 2366, APC-R-Coatest^R

Dako GmbH, Hamburg:
Kaninchen-Anti-Human-Protein-C, Ziege-Anti-Kaninchen-Peroxidase-
konjugiert, Ziege-Anti-Maus-Peroxidase-konjugiert

Gibco, Karlsruhe:
Dulbecco's modified Eagle Medium, Fötale Kälberserum Myoclone Plus, Glu-
tamin, Penicillin/Streptomycin (je 10000 U/ml), Trypsin-EDTA 10x
(0,05 % / 0,02 %), Waymouth Medium, RPMI 1640 Medium, Minimal essential
Medium (Eagle), Basal Medium (Eagle)

Haematologic Technologies Inc., über Cell Systems Biotechnologie Vertrieb
GmbH, Remagen:
Maus-Anti-Human-Faktor-V

Jackson Immuno Research Laboratories Inc., über Dianova, Hamburg:
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Lilly Laboratories, Indianapolis (USA):
Hygromycin B

Merck, Darmstadt:
Ammoniumpersulfat, Citronensäure, Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat,
Kaliumchlorid, Kalziumchlorid, Natriumacetat, Wasserstoffperoxid

Pharmacia, Uppsala (Schweden):

Q-Sepharose Fast Flow

Roth, Karlsruhe:

Aceton, Albumin Fraktion V, Essigsäure, Ethanol, Methanol, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Rotiphorese Gel 30, Rotisol, Schwefelsäure, Tris (Tris-Hydroxymethyl-Amino-Ethan)

Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Deisenhofen:

Bariumchlorid, Benzamidin, 4-Chloro-1-Naphtol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylene Tetraacetic Acid Disodiumsalt (EDTA), Hepes, β -Mercaptoethanol, Natriumcitrat, Ortho-Phenylendiamine Dihydrochloride (OPD), Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine, Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20), Thimerosal

2.3. Verbrauchsmaterialien

Amelung, Lemgo:

Einsatzküvetten für KC 10, Stahlkugeln (1mm Durchmesser)

Bio-Rad, München:

Econo Chromatographie column

Eppendorf, Hamburg:

Reagenziengefäße

Falcon, Becton Dickinson Labware, New Jersey (USA):

sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml

Greiner, Frickenhausen:

Zellkultur Petrischalen (60 mm und 100 mm im Durchmesser)

Merck, Darmstadt:

Universalindikator pH 0-14

Nunc GmbH, Wiesbaden:

Maxisorp- und Polysorp-Microwell Plates

Sarstedt:

Einmal-Pipettenspitzen

Schleicher & Schuell, Einbeck:

Einmal-Filter (0,2 μm), Filterpapier, Nitrozellulose

Serva, Heidelberg:

Spectra/Por Dialyseschlauch (Mw cutoff 12-14 kD)

3. Methoden

3.1. Isolierung und Reinigung von rekombinantem humanem Protein-C

3.1.1. Isolierung

Die rhPC-produzierende Zelllinie HU 293 wurde mit serumfreien Selektionsmedium gefüttert, nachdem in Rollflaschen ein konfluentes Stadium erreicht war. Das Medium wurde nach 48 h erneuert und der abgenommene Zellüberstand 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert, anschließend weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Die Isolierung von rhPC erfolgte über eine Ionenaustauschchromatographie. Die Elution des über negativ geladene Aminosäuren gebundenen PC wurde durch im Elutionspuffer enthaltene Kalziumionen bewirkt.

3.1.2. Reinigung (nach Yan et al.; 1990)

Puffer 1:	150 mM NaCl
	20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	5 mM Benzamidin
	4 mM EDTA
Puffer 2:	150 mM NaCl
	20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	5 mM Benzamidin
	2 mM EDTA
Puffer 3:	150 mM NaCl
	20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	5 mM Benzamidin
Puffer 4:	150 mM NaCl
	20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	5 mM Benzamidin

10 mM CaCl_2
Puffer 5: 500 mM NaCl
20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
5 mM Benzamidin

1050 ml Zellüberstand wurde mit Stocklösungen auf eine Endkonzentration von 4 mM EDTA und 5 mM Benzamidin eingestellt (pH 7,4). Vor dem Gebrauch wurde das Säulenmaterial 3 x mit Puffer 1 (mit je 1 Säulenvolumen = 70 ml) zur Equilibrierung gewaschen. Die Q-Sepharose wurde im Verhältnis 1:15 hinzugefügt und auf einem Roller über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Chromatographiesäule mit dem Zellüberstand/Q-Sepharose-Gemisch beladen und 3 x mit 35 ml Puffer 2 und 3 x mit 35 ml Puffer 3 gewaschen. Eluiert wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer 4. Danach wurde nochmals mit 1 Säulenvolumen Puffer 5 gewaschen, um die noch am Säulenmaterial verbliebenen Proteine durch die hohe Salzkonzentration abzulösen. Die Q-Sepharose wurde nach Anleitung regeneriert und in Dialysepuffer/0,01 % Azid aufbewahrt.

3.1.3. Barium-Citrat-Fällung (nach Fujikawa et al.; 1976)

Dialysepuffer: 150 mM NaCl
20 mM Tris/HCl (pH 7,4)

Zu den 40 ml PC-Elutionsmaterial wurden 4 ml einer 250 mM Natriumcitrat-Lösung hinzupipettiert und 8,8 ml einer 450 mM Bariumchlorid-Lösung langsam zugetropft. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT auf dem Roller wurde das Elutionsmaterial mit 6800 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 5 ml 150 mM Natriumcitrat resuspendiert. Danach erfolgte eine Dialyse gegen den oben genannten Puffer.

3.2. Lagerung von isoliertem rekombinantem humanem Protein-C

Nach der Dialyse wurde das erhaltene rhPC bis zur weiteren Verwendung in 100 µl Portionen aliquotiert, bei -20°C gelagert und vor Gebrauch bei 37°C aufgetaut.

3.3. Aktivierung von isoliertem rekombinantem humanem Protein-C und dessen Reinigung

3.3.1. Aktivierung

Für die Aktivierung von PC wurde zunächst das Lyophilisat des Schlangengiftaktivators Protac nach Anweisung in Aqua bidest. gelöst. Anschließend wurde jeweils 1 mg PC mit 1,5 Units Protac 5 min bei 37°C aktiviert.

3.3.2. Reinigung

Puffer: Es wurden die gleichen Puffer benutzt, die auch bei der PC-Isolierung Anwendung fanden.

Nach der Aktivierung mit Protac wurde das Gemisch sofort mit 15 ml der bereits vorbereiteten Q-Sepharose sowie mit 7,5 ml Dialysepuffer zusammengebracht und 2 h bei RT auf dem Roller inkubiert. Anschließend wurde die Chromatographiesäule mit dem Gemisch beladen und mit 3 Säulenvolumen Dialysepuffer gespült. Danach wurde mit 25 ml Puffer 4 eluiert, woraus drei Fraktionen hervorgingen.

3.4. Lagerung von rekombinantem humanem aktiviertem Protein-C

Das gewonnene APC wurde mit 0,1 % BSA versetzt, zu einer Hälfte bei 4°C gelagert und zur anderen Hälfte in 100 µl-Portionen bei -20°C eingefroren.

3.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Bei dieser Methode kommt es zu einer Anlagerung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an eine freie Aminogruppe des Proteins und damit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Diese Veränderung lässt sich photometrisch messen. Mit Hilfe eines BSA-Standards kann eine lineare Eichkurve erstellt und damit der Proteingehalt einer unbekanntem Lösung ermittelt werden.

BSA-Standard:	1mg/ml BSA in 0,9 % NaCl
Farbstoff-Reagenz (Bio-Rad, München):	Konzentrat 1:5 in Aqua bidest.
TBS 10x :	154 mM Tris/HCl 20 mM NaCl pH7,4
TBS 1x :	TBS 10x 1:10 mit Aqua bidest.

Folgende BSA-Standardkonzentrationen wurden für die Eichkurve hergestellt: 50, 100, 200, 300, 400 und 500 ng/ml. Verdünnt wurde in TBS 1x. Eingesetzt wurden davon genau wie von der unbekanntem Probe jeweils 10 µl pro well der Polysorb-Microtiterplatte. Hinzugefügt wurden anschließend 200 µl des Farbstoff-Reagenz. Nach einer Inkubationszeit von 10 min (bis maximal 1 h) konnte die Extinktion bei 620 nm gemessen werden.

3.6. ELISA zum Nachweis von rekombinantem humanem Protein-C und rekombinantem humanem aktiviertem Protein-C

Beschichtungspuffer:	0,2 M NaHCO ₃ 0,2 M Na ₂ CO ₃	gegenseitig auf pH 9,0 austitrieren
Waschpuffer:	PBS 1x 0,1 % Tween 20	
Blockpuffer:	3 % BSA in Waschpuffer	

Verdünnungspuffer:	0,1 % BSA in Waschpuffer
Substratpuffer:	1 Teil 0,5 M Citronensäure 9 Teile 0,11 M Na ₂ HPO ₄
Substratlösung:	10 ml Substratpuffer 4 mg OPD-Tablette 10 µl H ₂ O ₂
Stopplösung:	3 M H ₂ SO ₄
Antikörper:	Kaninchen-Anti-Human-Protein-C Kaninchen-Anti-Human-Protein-C-Peroxidase- kon- jugiert

Zur Bestimmung der PC-Konzentration wurde ein indirekter ELISA eingesetzt. Bei einem indirekten ELISA wird zunächst ein Fänger-Antikörper an die ELISA-Platte gekoppelt, der das zu bestimmende Antigen im zweiten Schritt bindet. Durch einen Zweit-Antikörper, der mit einem Enzym (wie der Peroxidase) gekoppelt ist und durch das ein hinzugegebener Farbstoff gespalten wird und das entstehende Spaltprodukt photometrisch gemessen werden kann, wird das Antigen spezifisch nachgewiesen. Anhand einer mitlaufenden Eichkurve kann die Konzentration an PC einer unbekannt Probe ermittelt werden. Hierzu wurden jeweils 100 µl pro well des polyklonalen Kaninchen-Anti-Human-Protein-C-Antikörpers ü. N. bei 4°C auf einer Maxisorp-Mikrotiterplatte immobilisiert. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Lösung entfernt und die Platte 3 x mit jeweils 200 µl Waschpuffer gespült. Anschließend erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Blockpuffer 1 h bei RT. Nach Entfernen des Blockpuffers und erneutem dreimaligen Waschen wurden unterschiedliche Verdünnungen des rhPC bzw. rhAPC mit jeweils 100 µl pro well in Doppelbestimmung aufgetragen. Für die Eichkurve, erstellt mit gepooltem Normalplasma von gesunden Spendern, wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 1:100, 1:200, 1:400, 1:1000, 1:2000, 1:4000 und 1:10000. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei RT. Danach wurde gewaschen und der Peroxidase-konjugierte Zweit-Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 jeweils 100 µl pro well 2 h bei RT und

wegen der Lichtempfindlichkeit der Peroxidase abgedunkelt inkubiert. Anschließend Entfernung der überschüssigen Lösung und dreimaliges Waschen der Platte. Danach wurden 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung gefüllt und die sich anschließende Enzymreaktion nach etwa 20 min mit der Stopplösung beendet. Die Mikrotiterplatte konnte nun bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch gemessen werden.

3.7. Protein-C-Aktivitätstest

Verdünnungspuffer: TBS 1x
0,1 % BSA

In diesem Aktivitätstest wird PC durch Protac aktiviert. Durch Spaltung des chromogenen Substrats S 2366 durch APC entsteht das gelb gefärbte Nitroanilid. Die dadurch bedingte Absorptionsänderung kann photometrisch bei 405 nm gemessen werden. Für die Eichkurve, erhalten von gepooltem Normalplasma gesunder Spender, wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100. Es wurden jeweils 50 µl Probe pro well, verdünnt in TBS 1x/0,1 % BSA, in die Polysorp-Mikrotiterplatte gefüllt, danach Zugabe von jeweils 25 µl 1:5 in TBS 1x/0,1 % BSA vorverdünntes Protac sowie von jeweils 50 µl S 2366 (2 mM). Die Reaktion wurde 1 h lang jeweils im Abstand von 3 min bei 405 nm bei einer Temperatur von 37°C im Photometer gemessen.

3.8. SDS-PAGE (nach Laemmli; 1970)

Lower Buffer:	1,5 M	Trizma base	
	3,8 mM	SDS	pH 8,8
Upper Buffer:	0,5 M	Trizma base	
	3,8 mM	SDS	pH 6,8
PAGE-Laufpuffer 5x:	1,9 M	Glycin	
	0,25 M	Trizma base	

	35 mM	SDS	pH 8,3
PAGE-Laufpuffer 1x:	1 Teil	Laufpuffer 5x	
	4 Teile	Aqua bidest.	
Probenpuffer 5x, nicht reduzierend:	3,3 g	Trizma base	
	10 g	SDS	
	40 g	Glycerol	
	0,05 g	Bromphenolblau	
Probenpuffer, reduzierend:	435 µl	nicht-reduzierender Proben-Puffer 5x	
	65 µl	β-Mercaptoethanol	
Ammoniumpersulfat- lösung:	2,5 g	Ammoniumpersulfat	
	25 ml	Aqua bidest.	
Sammelgelpuffer 5 %:	2,5 ml	Upper buffer	
	1,65 ml	Acrylamid	
	5,7 ml	Aqua bidest.	
	100 µl	Ammoniumpersulfat- lösung	
	10 µl	TEMED	
Trenngelpuffer 10 %:	7,5 ml	Lower buffer	
	10,05 ml	Acrylamid	
	12,45 ml	Aqua bidest.	
	200 µl	Ammoniumpersulfat	
	30 µl	TEMED	

Durch die SDS-Gelelektrophorese kann man Proteine nach ihrer Molekülgröße auftrennen. Das geschieht, indem man die Proteine mit SDS-haltigem Probenpuffer zusammenbringt und für 1-2 min auf 95°C erhitzt. Dabei wird durch die

Anlagerung des SDS an die Aminosäurekette eine negative Ladung eingebracht, welche die Eigenladung des Proteins überlagert. Dadurch wird die Wanderung nur durch die Molekülgröße des Eiweiß bestimmt. Desweiteren werden die Proteine denaturiert und aufgefaltet. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol kann man zusätzlich inter- und intrazelluläre Disulfidbrücken spalten und so später Untereinheiten des untersuchten Moleküls sichtbar machen. Durch unterschiedliche Zugabe von Acrylamid wird die Porengröße des Gels reguliert. Die Porengröße wird um so kleiner, je mehr Acrylamid dem Gelgemisch zugefügt wird. Für die Auftrennung wurden 1,5 mm dicke Gele zwischen zwei 8 x 10 cm großen Glasplatten gegossen, wobei zunächst das 10-%ige Trenngel und nach Auspolymerisation desselben das 5-%ige Sammelgel hergestellt wurden. Nach dem Vorbereiten und Auftragen der Proben lief die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V ca. 1,5 h. Mitgeführt wurden in der äußersten Tasche 10 μ l eines vorgefärbten Proteinstandards (Prestained High Marker), der sich aus den folgenden Proteinen zusammensetzt:

Myosin	Molekulargewicht:	205,0 kDa
β -Galaktosidase	Molekulargewicht:	116,5 kDa
Bovine Serum Albumin	Molekulargewicht:	80,0 kDa
Ovalbumin	Molekulargewicht:	49,5 kDa

3.9. Silberfärbung (nach Merril et al.; 1981)

Für die Silberfärbung wurde ein fertiger Kit der Firma Bio-Rad verwendet.

Fixierlösung 1:	40% Methanol 10% Essigsäure
Fixierlösung 2:	10% Ethanol 5% Essigsäure
Oxidationslösung 10x:	war im Kit vorhanden und mußte 1:10 verdünnt werden
Silberreagenz 10x:	war im Kit vorhanden und mußte 1:10 verdünnt werden

Entwicklerlösung: 32 g Entwicklerreagenz
1 l Aqua bidest

Stopplösung: 5 % Essigsäure

Eine Silberfärbung wird durchgeführt bei erwarteten Proteinkonzentrationen, die im Nanogrammbereich liegen und für deren Nachweis die Coomassie-Färbung nicht sensitiv genug ist. Unter optimalen Bedingungen können Proteinkonzentrationen zwischen 0,05 und 50 ng nachgewiesen werden. Das SDS-Gel wurde zunächst 1 h lang in oben genannter Fixierlösung 1 inkubiert, anschließend nochmals 2 x in oben genannter Fixierlösung 2 jeweils 30 min gelagert. Es wurde dann, nachdem die Oxidationslösung 10 min eingewirkt hatte, 5-6 x mit Aqua bidest. gespült, bis die gelbe Farbe ausgewaschen war. Nachdem das Silberreagenz 30 min eingewirkt hatte, wurde nochmals ca. 2 min mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend solange mit Entwicklerlösung inkubiert, bis eine Bandenfärbung erkennbar war. Diese wurde noch zweimal erneuert und schließlich mit 5 % Essigsäure gestoppt. Die Zeit für die Entwicklung betrug insgesamt etwa 15 min.

3.10. Western-Blot-Analyse (nach Towbin et al.; 1975)

Blotpuffer: 9,7g Trizma base
45 g Glycin
800 ml Methanol pro 4 l Aqua bidest.

PBS 10x: 80 g NaCl
11,5 g Na₂HPO₄
2 g KH₂PO₄
2 g KCl
1 g MgCl₂ x 6 H₂O

PBS 1x: PBS 10x 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt

TBS 10x: 20 mM Tris/HCl
150 mM NaCl pH 7,4

TBS 1x:	TBS 10x 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt	
Blockpuffer:	3 % BSA	in PBS 1x
Waschpuffer:	0,1 % Tween 20	in PBS 1x
Verdünnungspuffer:	0,1 % BSA	
	0,1 % Tween 20	in PBS 1x
Substratlösung:	0,09 g	4-Chloro-1-Naphtol
	30 ml	Methanol
	70 ml	TBS 1x
	100 µl	H ₂ O ₂

In der Western-Blot-Analyse werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem SDS-Gel auf Nitrozellulose transferiert. Mit Hilfe von Antikörpern können Proteine in einer folgenden Immunreaktion detektiert werden. Der Erfolg des Transfers ist kontrollierbar durch eine Anfärbung mit Ponceau S. Der Western-Blot lief bei 100 V 1,5 h und wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

- Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 3 % BSA (1 h bei RT)
- Waschen mit PBS/Tween (3 x 5 min)
- Inkubation mit Kaninchen-Anti-Human-PC-AK in einer Verdünnung von 1:1000 (2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C)
- Waschen mit PBS/Tween (3 x 5 min)
- Inkubation mit Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper-Peroxidase-konjugiert in einer Verdünnung von 1:5000 (1 h bei RT)
- Waschen mit PBS/Tween (3 x 5 min)
- Waschen mit TBS 1x (1 x 5 min)
- Entwickeln mit Substratlösung bis eine deutliche Bandenfärbung erkennbar
- Stoppen der Reaktion durch Überführen des Blots in TBS 1x

Abschließend wurde der Blot fotografiert, zwischen Filterpapier getrocknet und unter Lichtverschluß aufbewahrt.

3.11. Gewinnung und Lagerung von Blutplasma

Für die Versuche wurde Citratplasma in einem Verhältnis von 9 Teilen Blut zu 1 Teil 0,03 mM Citrat gewonnen und 20 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Plasmas erfolgte die weitere Lagerung bei -80°C. Vor Gebrauch wurde es zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut.

3.12. Bestimmung der APC-Resistenz mit dem APC-Resistenz Kit (Chromogenix; nach Dahlbäck et al.; 1993)

aPTT-Reagenz	(16 ml gereinigte PL mit kolloidalen Silika als Kontaktaktivator)
Kalziumchlorid-Lösung	(8 ml 0,025 M/l in Trispuffer mit 0,5 % Rinderserumalbumin)
APC/Kalziumchlorid-Lösung	(Lyophilisat für 2 ml steriles Aqua bidest.)
Normales Kontrollplasma	(Lyophilisat für 1 ml steriles Aqua bidest.)
Pathologisches Kontrollplasma	(Lyophilisat für 0,5 ml steriles Aqua bidest.)

Vor Gebrauch sollten die angesetzten Reagenzien 20 min bei RT stehen. Der APC-Resistenz-Test ist ein, auf dem Grundprinzip der aPTT-Messung aufbauender, Test zur semiquantitativen Bestimmung der Reaktion auf humanes APC. Im Versuch wurden 50 µl Plasma mit gleichem Volumen aPTT-Reagenz 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl auf 37°C vorgewärmtes Kalziumchlorid hinzupipettiert und die Zeit bis zur Fibrinbildung gemessen. In einem zweiten Ansatz wurden wiederum 50 µl Plasma mit 50 µl aPTT-Reagenz 5 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µl APC/Kalziumchlorid, vorgewärmt auf 37°C, zugefügt und wiederum die Zeit bis zur Fibrinentstehung bestimmt. Aus diesen beiden Werten konnte nun die APC-Ratio bestimmt werden, indem der Quotient aus aPTT in sec mit APC/Kalziumchlorid und aPTT in sec mit Kalziumchlorid gebildet wurde. Die Ratio liegt bei gesunden Probanden über dem Wert 2.

3.13. Amidolytischer Test zur Bestimmung der APC-Resistenz

3.13.1. Herstellung von Phospholipiden

Vorgelegt wurden 7 ml TBS 1x in einem 50 ml Falconröhrchen. Dann wurden 40 µl Phosphadidylethanolamine (10 mg/ml in Chloroform), 40 µl Phosphadidylcholine (10 mg/ml in Chloroform/Methanol 1:1) und 20 µl Phosphadidylserine (10 mg/ml in Chloroform) hinzupipettiert, die Lösung gut gemischt und sonifiziert. Es wurden dann verschiedene Verdünnungen hergestellt und im amidolytischen Assay ausgetestet. Die Verdünnung mit der besten Kinetik wurde übernommen und in 2 ml Aliquots bei 4°C gelagert. Wichtig war es, schnell zu arbeiten und die Weiterverdünnung zügig herzustellen, um ein Ausfallen von Aggregaten und Beschlagen des Röhrchens zu vermeiden.

3.13.2. Prinzip des amidolytischen Tests

Das Prinzip des kinetischen Tests basiert auf der Messung der Kofaktoraktivität von FVa durch Bestimmung der Generierung von Thrombin, welches über ein chromogenes Substrat gemessen werden kann. Für den Versuch wurden Microtiterplatten verwendet. Testdurchführung: Vorlegen von 50 µl Plasma 1:300 in TBS/0,1 % BSA, Zugabe von 25 µl PT (1:15) + PL (1:1) im Verhältnis 1,5:1, hinzupipettieren von 50 µl S 2238 (2 mM), starten der Kinetik durch Zugabe von 75 µl FXa (1:22,5)/ CaCl₂ (0,025 M/l)/ Puffer oder APC in Puffer im Verhältnis 1:1:1. Die Laufzeit der Kinetik betrug 1 h, dabei wurde alle 6 min ein Meßwert aufgezeichnet.

3.14. ELISA zum Nachweis von Faktor-V

Für den Aufbau eines ELISA's zum Nachweis von FV standen zwei verschiedene AK zur Verfügung. Zum einen ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Human-FV- und zum anderen ein monoklonaler Maus-Anti-Human-FV-AK. Damit wurden

zwei ELISA's entwickelt, einer mit Detektion von FV durch den polyklonalen AK und einer mit Detektion von FV durch den monoklonalen AK.

3.14.1. Biotinylierung von Kaninchen-Anti-Human-Faktor-V-Antikörper

1 ml des Antikörpers mit einer Konzentration von 1,59 mg/ml wurde 12 h bei 4°C gegen PBS 1x dialysiert. Der Dialysepuffer wurde 4 x gewechselt. Am nächsten Morgen wurde das Volumen des Dialysats bestimmt und mit PBS 1x auf insgesamt 2 ml Volumen mit PBS 1x aufgefüllt. 1 mg N-Hydroxy-succinimido-Biotin wurde in 250 µl Dimethylformamid gelöst und mit PBS 1x auf 1 ml aufgefüllt und zu den 2 ml Antikörperlösung hinzupipettiert. Inkubiert wurde nun 2 h bei RT auf einem Drehrad. Anschließend mußte das nicht gebundene Biotin bei 4°C gegen PBS 1x wieder herausdialysiert werden. Abschließend wurde eine Proteinbestimmung und ein Test-ELISA durchgeführt. Der biotinierte Antikörper wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Beschichtungspuffer und Waschpuffer entsprachen den Lösungen, die auch für den PC/APC-ELISA benutzt wurden.

Blockpuffer für

polyklonalen ELISA:	10 % Milchpulver	
	0,1 % Tween 20	in PBS 1x

Blockpuffer für mo-	3	
noklonalen ELISA:	% BSA	
	0,1 % Tween 20	in PBS 1x

Verdünnungspuffer

für polyklonalen	1	
ELISA:	% Milchpulver	
	0,1 % Tween 20	in PBS 1x

Verdünnungspuffer

für monoklonalen	0,1 % BSA	
------------------	-----------	--

ELISA:

	0,1 % Tween 20	in PBS 1x
ABTS-Puffer:	4,1 g Natriumacetat	
	3,9 g Natriumdihydrogenphosphat	
	ad 500 ml Aqua bidest.	
	pH 5,5	
ABTS-Substrat:	219 mg	ad 10 ml Aqua bidest.
Entwicklungslösung:	15 ml	ABTS-Puffer
	750 µl	ABTS-Substrat
	10 µl	H ₂ O ₂
Antikörper:	Kaninchen-Anti-Human-FV	
	Maus-Anti-Human-FV	
	Ziege-Anti-Maus-AK-Peroxidase konjugiert	
	Streptavidin-Peroxidase-konjugiert	

3.14.2. Vorgehen bei der Entwicklung der ELISA's

Die Entwicklung wurde bei beiden Ansätzen gleich durchgeführt. Zunächst wurde zur Bestimmung einer für den Test geeigneten Konzentration des AK's eine Schachbrett titration durchgeführt. Dazu wurde der Kaninchen-Anti-Human-FV-AK in Konzentrationen von 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 µg/ml für den polyklonalen Ansatz und 0,5, 1, 2, 5 und 10 µg/ml für den monoklonalen Ansatz ü. N. bei 4°C mit jeweils 50 µl pro well auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Am nächsten Morgen wurde mit dem jeweiligen Blockpuffer 1 h bei RT mit 200 µl pro well abgeseigt, danach 3 x mit 200 µl Waschpuffer gespült und eine Plasmaprobe von 50 µl mit einer absoluten FV-Konzentration von 50 ng aufgebracht. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei RT. Dann wurde im polyklonalen Ansatz der biotinylierte Kaninchen-Anti-Human-FV-AK in Konzentrationen von 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 µg/ml und im monoklonalen Ansatz der Maus-Anti-Human-FV-AK in Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 5 und 10 µg/ml mit jeweils 50 µl auf die Platte pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurde

dann jeweils 50 μ l Streptavidin-POD 1:1000 oder Ziege-Anti-Maus-POD 1:5000 aufgetragen und 1 h bei RT unter Lichtverschuß inkubiert. Abschließend wurde noch 3 x mit Waschpuffer gespült und die Entwicklungslösung mit 150 μ l pro well aufgetragen. Die Farbentwicklung wurde beobachtet und die Platte bei genügender Färbung bei 405 nm im Photometer gemessen. Die Antikörperverdünnung mit der höchsten Extinktion bei gleichzeitig niedrigster Kontrollextinktion wurde weiter verwendet, um zum einen die Nachweisgrenze des ELISA's zu bestimmen und zum anderen die Intraassay- und Interassayvarianz zu verifizieren. Die Nachweisgrenze für den polyklonalen Ansatz lag bei 0,005 ng und für den monoklonalen Ansatz bei 5 ng FV. Um die Intraassayvarianz zu bestimmen wurde mit den zuvor ermittelten AK-Konzentrationen Plasma-FV nachgewiesen. Für den polyklonalen Ansatz betrug die Plasmaverdünnung 1:1000, 1:10000 und 1:100000 und für den monoklonalen Ansatz 1:2, 1:10 und 1:50. Jede Plasma-Verdünnung wurde 21 x pipettiert und aus diesen 21 Extinktionen die Varianz berechnet. Für die Bestimmung der Interassayvarianz wurde der gleiche Ansatz an 3 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt und aus diesen Ergebnissen wiederum die Varianz berechnet.

3.15. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Arbeit benötigte Plastikgegenstände wurden 45 min bei 123°C und 1 bar, Glaswaren 5 h bei 250°C autoklaviert. Verwendete Kulturmedien und Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert und bei 4°C gelagert. Zur Verwendung wurden sie in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.15.1. Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig in einem auf 37°C temperierten Wasserbad solange aufgetaut, bis noch ein kleiner Eiskern erkennbar war. Danach wurde das Zellmaterial in ein mit 10 ml kaltem Kulturmedium vorbereiteten Falconröhrchen überführt, resuspendiert und 5 min mit 1200 rpm bei RT zentrifugieren. Der DMSO-haltige Mediumüberstand wurde anschließend entfernt und die Zellen in 10 ml warmen Medium auf der Platte ausgesät.

3.15.2. Einfrieren der Zellen

Um eine Zellschädigung durch Bildung von Eiskristallen zu verhindern, werden Zellen grundsätzlich unter Zugabe von DMSO eingefroren. Die Zellkulturschale wurde hierzu zunächst 1 x mit HBS 1x gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie zum Splitten mit Trypsin-EDTA abgelöst, in ein mit 1 ml FCS befülltes Falconröhrchen pipettiert und 5 min mit 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Resuspendiert wurde das Pellet in 500 µl Medium + 20 mM Hepes und ca. 30 min bei 4°C gekühlt. Danach Zugabe von 500 µl Medium mit 20 mM Hepes und 20 % DMSO. Dann erfolgte eine Lagerung von 24 h bei - 80°C und abschließend die Aufbewahrung im Stickstofftank.

3.15.3. Splitten der Zellen

HBS 1x:	137 mM NaCl
	4 mM KCl
	11 mM Glucose
	10 mM Hepes
	pH 7,4
Trypsin-EDTA:	20 mM Hepes
	5mM EDTA

0,75 % NaCl
0,005 % Trypsin

Zum Splitten wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Platte 1 x mit HBS 1x gewaschen, um überschüssiges FCS zu entfernen. Abgelöst wurden die Zellen durch 3- bis 5-minütiges Inkubieren mit 6 ml pro 100er Schale Trypsin-EDTA 1x bei 37°C im Brutschrank. Dieses Gemisch wurde anschließend in ein Falcon-Röhrchen überführt, in dem bereits 1 ml FCS vorgelegt war, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde dann bei 1200 rpm 5 min bei RT zentrifugiert, das gewonnene Pellet in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale mit 9 ml vorgelegtem warmen Medium überführt.

3.16. Kultivierung von HepG₂-Zellen

Kulturmedium:	Dulbecco's modified Eagle medium
Zusätze:	10 % FCS
	2 mM L-Glutamin
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin

Bei den HepG₂-Zellen handelt es sich um eine humane Leberkarzinomzelllinie. Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7 % auf Zellkulturschalen. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium erneuert. Wenn ein konfluenter Monolayer erreicht war, wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung gesplittet.

3.17. Kultivierung von Endothelzellen

Kulturmedium:	Waymouth Medium
Zusätze:	10 % FCS
	2 mM L-Glutamin
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin

Die EC sind humanen Ursprungs und wurden aus Nabelschnurvenen präpariert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7 % auf Zellkulturschalen.

3.18. Kultivierung von SK-Hep-1-Zellen

Kulturmedium zum Anwachsen:	RPMI 1640 Medium
Zusätze:	40 % FCS
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium zur weiteren Kultivierung:	RPMI 1640 Medium
Zusätze:	20 % FCS

Die SK-Hep-1 ist eine humane Leberkarzinomzelllinie aus einem Adenokarzinom und wurde aus Braunschweig bezogen. Die Kultivierung erfolgte auf Zellkulturschalen bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7 %.

3.19. Kultivierung von CL-48-Zellen (human embryo liver cells)

Kulturmedium: Minimal essential Medium (Eagle) with L-Glutamin,
Earle's BSS, 0,1 mM nonessential aminoacids
Zusätze: 10 % FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Bei den CL-48-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus humanen embryonalen Leberzellen, die von American Type Culture Collection (ATTC) geordert wurden und bisher nicht charakterisiert sind.

3.20. Kultivierung von CCL-13-Zellen (Chang liver)

Kulturmedium: Basal medium (Eagle) with 25 mM HEPES, Earle's salts
Zusätze: 10 % FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Bei den CCL-13-Zellen handelt es sich um eine Leberzelllinie. Bezogen wurde die Zelllinie von American Culture Type Collection (ATTC). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C auf Zellkulturschalen, mit einem CO₂-Gehalt von 7 %.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung und Reinigung von rekombinantem humanem Protein-C

Für die Aufarbeitung von PC wurden 1050 ml Zellüberstand aus der Zelllinie HU 293 benutzt. Nach dem Auftauen wurden 8,4 ml einer 500 mM Stocklösung EDTA und 10,5 ml einer 500 mM Stocklösung Benzamidin zugesetzt, welches einer Endkonzentration von 4 mM EDTA und 5 mM Benzamidin entsprach. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,4. Vor Beginn der Aufreinigung wurde das Säulenmaterial (70 ml) 3 x mit Puffer 1, mit jeweils 1 Säulenvolumen, zur Equilibrierung gewaschen und mit dem Zellüberstand ü. N. bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Chromatographiesäule wurde anschließend mit diesem Gemisch beladen und mit 3 x 35 ml Puffer 2 und 3 x 35 ml Puffer 3 gewaschen. Eluiert wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer 4. Der Durchlauf wurde im Verlauf der Reinigung auf Proteingehalt getestet (200 µl Biorad-Reagenz + 10 µl Probe). Es wurden abhängig von der Proteinkonzentration zwei verschiedene Pools gesammelt. Das Volumen beider Elutionen lag jeweils bei 40 ml. Vor jedem Schritt wurde zur Kontrolle 1 ml Probenvolumen abgenommen. Nach der Bariumcitrat-Fällung mit 4 ml einer 250 mM Natriumcitrat-Stocklösung und 8,8 ml einer 450 mM Bariumchlorid-Stocklösung wurden die insgesamt 52,8 ml 1 h lang unter kontinuierlicher Bewegung bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C mit 6800 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme einer Kontrollprobe von 1 ml wurde der Überstand verworfen und das Pellet jeweils mit 5 ml einer 150 mM Natriumcitrat-Lösung resuspendiert. Die Proben wurden anschließend einer Dialyse (gegen Dialysepuffer) bei 4°C unterzogen. Nach der Dialyse betrug das Volumen der Elutionen I und II jeweils 9 ml.

4.1.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe einer Proteinbestimmung nach Bradford festgestellt. Hierbei wurde anhand einer BSA-Eichkurve mit den Proteinkonzentrationen 50, 100, 200, 300, 400 und 500 ng/ml der Proteingehalt beider Elutionen bestimmt. Für die PC-Elution I wurde ein Proteingehalt von 0,568 mg/ml ermittelt, was bei 9 ml Probe einer absoluten Proteinmenge von 5,11 mg entspricht. Die Proteinkonzentration der PC-Elution II betrug 0,121 mg/ml, welches bei 9 ml Probe einer absoluten Proteinmenge von 1,09 mg entspricht.

4.1.2. Nachweis von rekombinantem humanem Protein-C im ELISA

Für den PC-ELISA wurden jeweils 100 µl eines polyklonalen Kaninchen-Anti-Human-PC-Antikörpers von Dako in einer Verdünnung von 1:1000 ü. N. bei 4°C auf einer Maxisorb-Microtiterplatte inkubiert. Nach dem einstündigen Blocken mit 3 % BSA in PBS 1x, mit jeweils 200 µl pro Vertiefung, wurde zum einen eine NHP-Eichkurve mit Verdünnungen von 1:100 bis 1:10000 erstellt, sowie eine Konzentrationsreihe der beiden PC-Pools. Der erste Pool wurde in den Verdünnungen 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000 und 1:640000 eingesetzt, der zweite Pool in den Verdünnungen 1: 1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 und 1:64000. Es wurden jeweils 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS 1x/0,1 % Tween 20 konnte der Peroxidase-markierte Zweitantikörper, Ziege-Anti-Human-PC, 1:250 mit jeweils 100 µl pro Vertiefung pipettiert werden. Inkubiert wurde wiederum 2 h bei RT, anschließend mit OPD entwickelt und die Extinktion bei 492 nm gemessen. Kontrollen wurden jeweils ohne Beschichtung sowie ohne Probenmaterial durchgeführt und wurden von den Extinktionen subtrahiert. Die PC-Ausbeute betrug 67 %.

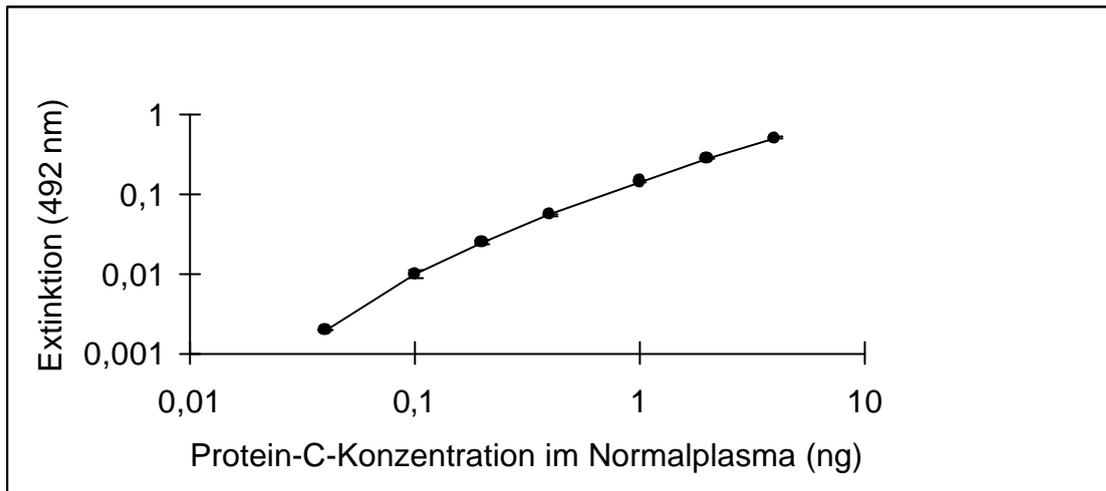


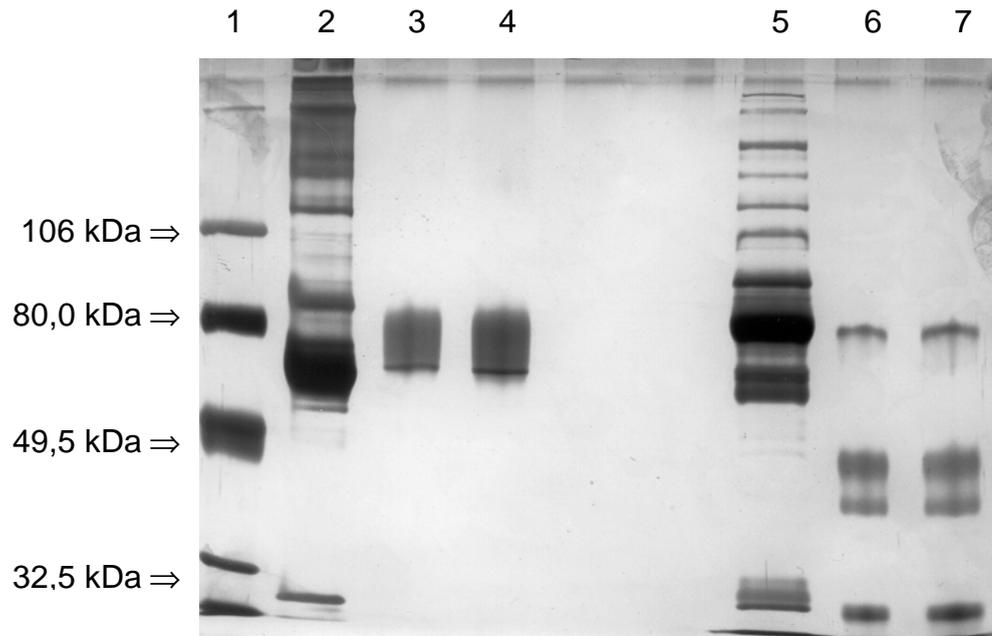
Abbildung 5: PC- ELISA

Proben	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (mg)	PC-Antigen (mg)
Zellüberstand	1050		11
PC # I	9	5,11	6,9
PC # II	9	1,09	0,423
PC gesamt	18	6,2	7,323 = 67%

Tabelle 1: PC-Ausbeute

4.1.3. SDS-PAGE von rekombinantem humanem Protein-C

Vom gewonnenen PC wurde ein SDS-Gel angefertigt. Das Trenngel hatte hierbei eine Acrylamidkonzentration von 10 % und das Sammelgel von 5 %. Aufgetragen wurden PC-Konzentrationen von 1,5 und 2 µg. Parallel dazu wurde NHP in einer Konzentration von 0,04 µg PC aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 1 h lang mit und ohne Zusatz von β-Mercaptoethanol. Anschließend wurde das SDS-Gel mit dem Silberfärbe-Kit der Firma Biorad behandelt.



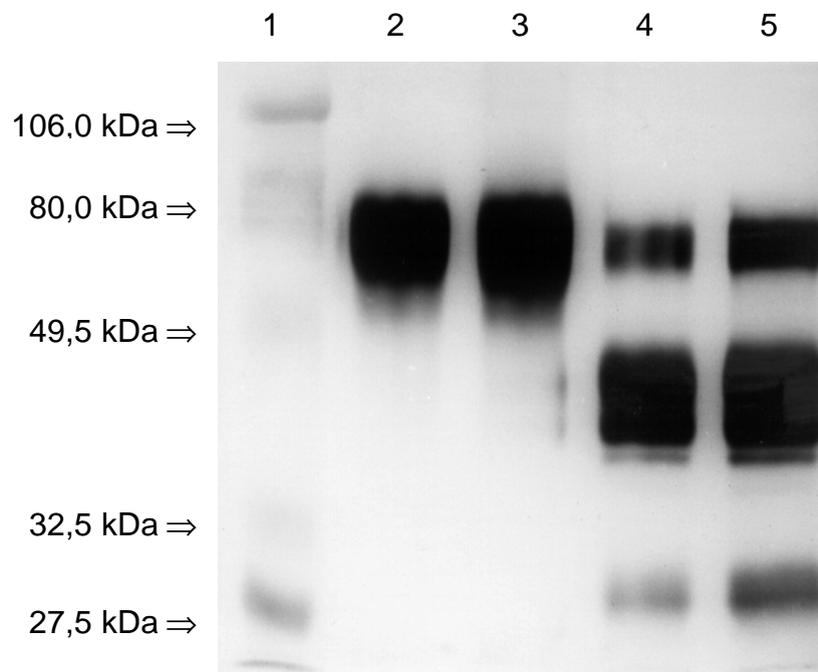
- 1 Low Range Marker
- 2 Normalplasma 1: 100 in nicht-red. Probenpuffer
- 3 1,5 μg rhPC in nicht-red. Probenpuffer
- 4 2,0 μg rhPC in nicht-red. Probenpuffer
- 5 Normalplasma 1: 100 in red. Probenpuffer
- 6 1,5 μg rhPC in red. Probenpuffer
- 7 2,0 μg rhPC in red. Probenpuffer

Abbildung 6: Silbergel PC

4.1.4. Western-Blot von rekombinatem humanem Protein-C

Für den Western-Blot wurde das isolierte PC zunächst in einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Trenngel hatte eine Acrylamidkonzentration von 10 %, das Sammelgel von 5 %. Die Auftrennung erfolgte 1 h lang bei 100 V. Danach wurden die aufgetrennten Proteine 1 h mit 120 V auf eine Nitroellulose transferiert und mit 5 % Milchpulver 1 h bei RT abgesättigt. Als Erstantikörper wurde ein Kaninchen-Anti-Human-PC-Antikörper verwendet, der in einer Verdünnung von 1:1000 2 h bei RT inkubierte. Nach dem Waschen konnte nun der POD-

markierte Detektionsantikörper, Ziege-Anti-Kaninchen-AK, 1:500 1 h lang bei RT aufgetragen werden. Die jeweiligen Inkubationsschritte erfolgten unter kontinuierlicher Bewegung. Entwickelt wurde der Blot mit 4-Chloro-1-Naphtol.



- 1 Low Range Marker
- 2 0,5 µg rhPC in nicht-red. Probenpuffer
- 3 1,0 µg rhPC in nicht-red. Probenpuffer
- 4 0,75 µg rhPC in red. Probenpuffer
- 5 1,5 µg rhPC in red. Probenpuffer

Abbildung 7: Western-Blot PC

4.1.5. Aktivitätsmessung von rekombinantem humanem Protein-C

Die Aktivitätsbestimmung des PC erlaubt eine Aussage über Qualität und Aktivierungsfähigkeit sowie über bereits vorhandenes APC. Der Probenansatz setzte sich zusammen aus 25 µl Probe und 25 µl Verdünnungspuffer (0,1 % BSA in TBS 1x). Die Aktivierung erfolgte mit 0,015 Units Protac. Nach Zugabe

von S 2366 (2 mM) wurde die kinetische Messung bei 37 °C gestartet. Die Reaktion wurde 30 min lang jeweils im Abstand von 6 min bei 405 nm im Photometer gemessen. Als Negativkontrolle diente der Verdünnungspuffer. Die Eichkurve wurde aus NHP in den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 angefertigt. PC # I wurde in den Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 und PC # II 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 eingesetzt. Die Ausbeute an PC-Aktivität betrug 38 %.

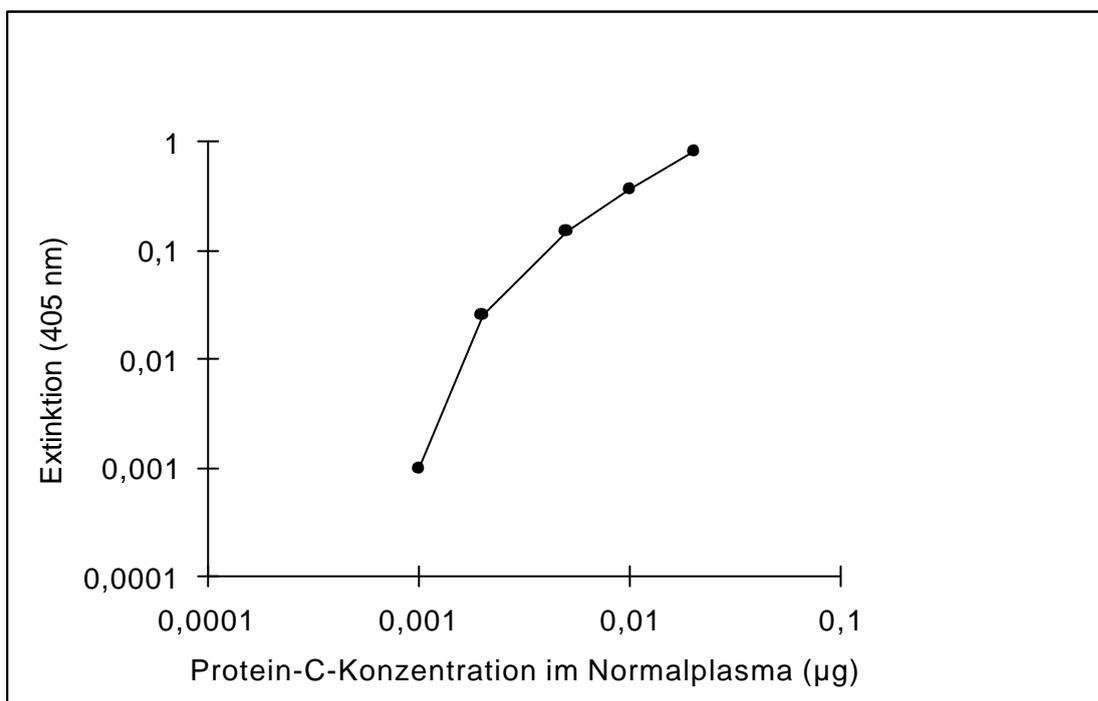


Abbildung 8: PC-Aktivität in NHP

Proben	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (mg)	PC-Antigen (mg)	PC-Aktivität (µg)
Zellüberstand	1050		11	4200
PC # I	9	5,11	6,9	1494
PC # II	9	1,09	0,423	111
PC gesamt	18	6,2	7,323	1605 = 38 %

Tabelle 2: Ausbeute PC-Aktivität

4.2. Aktivierung von rekombinantem humanem Protein-C

2 mg PC der Elution I wurden 5 min bei 37°C im Wasserbad mit 3 Units Protac inkubiert. Das entsprach einem PC-Volumen von 3521 µl und 1000 µl Protac. Das Gesamtvolumen betrug demnach 4521 µl. Nach dieser Zeit wurde der Versuchsansatz sofort mit 15 ml bereits equilibrierter Q-Sepharose und 7,5 ml Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) zusammengegeben und 2 h bei RT auf einem Roller inkubiert. Abschließend wurde das Säulenmaterial in eine Chromatographiesäule überführt und 3 x mit 1 Säulenvolumen gespült. Eluiert wurde mit Elutionspuffer nach Proteinkontrolle. Dazu wurden 200 µl Biorad-Reagenz in einer Microtiterplatte vorgelegt und mit 10 µl Probe gemischt. Gestaffelt nach abnehmendem Proteingehalt wurden 3 Elutionen gewonnen. Das Volumen von Elution I betrug 12 ml, von Elution II 4 ml und von Elution III 10 ml. Der anschließende Aktivitätstest war nötig, um die Qualität und Funktion des APC zu bestimmen sowie den Nachweis der kompletten Umsetzung des PC zu aktiviertem PC zu erbringen. Dazu wurden zwei parallele Ansätze gleichzeitig gefahren. 50 µl APC wurden mit 50 µl S 2366 (3mM) vermischt. Ohne und in der Gegenwart von 25 µl Protac (0,015 Units) wurde beobachtet, ob es zu einem Extinktionsanstieg kommt. Ein Anstieg der Extinktion nach Protac-Zugabe spräche für eine mangelhafte Aktivierung des PC. Festgestellt wurde dies bei Elution I. Für weitere Versuche wurde die Elution II verwendet. Um die Qualität und amidolytische Aktivität von APC zu überprüfen wurde ein PC-ELISA sowie

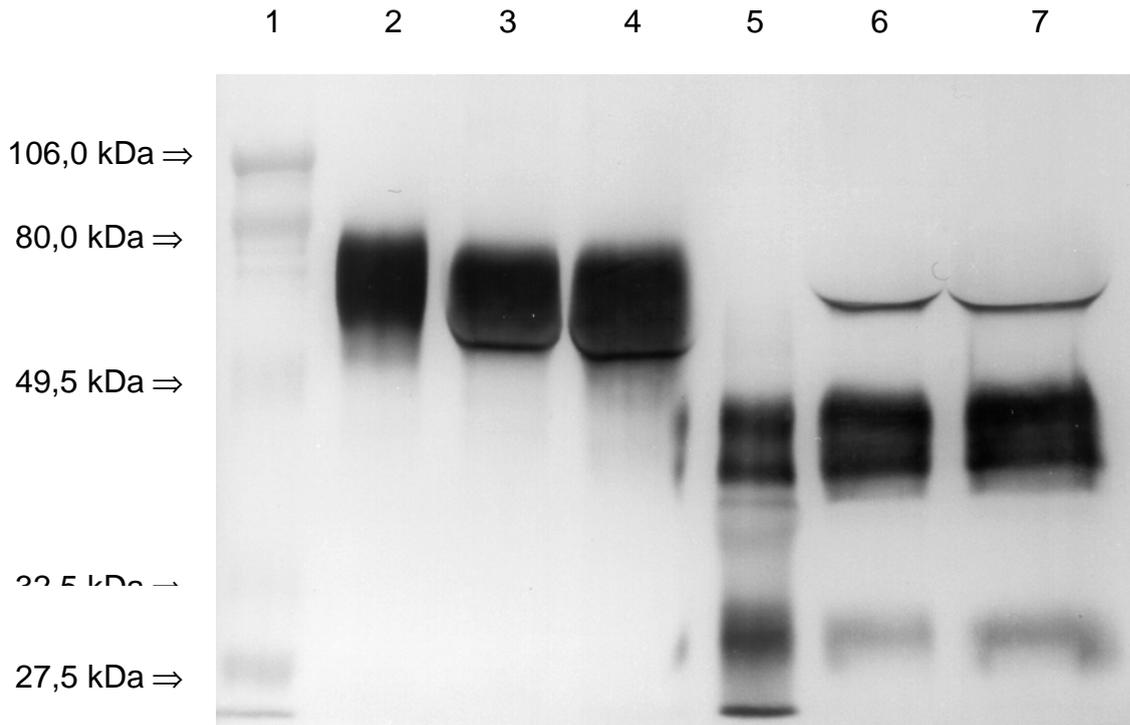
ein PC-Aktivitätstest unter den gleichen Bedingungen wie mit PC durchgeführt. Die Ausbeute an APC-Aktivität betrug 12 %.

Proben	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (µg)	PC-Antigen (µg)	PC-Aktivität (µg)
Zellüberstand	1050		11	4200
Protein C	3,521	2000	2700	1605
APC # I	12		144	16,8
APC # II	4		188	24
APC # III	10		173	27
APC gesamt	26		505	67,8
Durchlauf APC	50		77,5	1,7
Gesamt	76		582,5	69,5 = 12 %

Tabelle 3: APC-Ausbeute, APC-Aktivität

4.2.1. Western-Blot von rekombinantem humanem aktiviertem Protein-C

Die SDS-PAGE und der Western-Blot wurden hierbei unter den gleichen Bedingungen wie in den zuvor genannten Versuchen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente PC, welches in einer Konzentration von 1 µg aufgetragen war. APC wurde nicht reduziert und reduziert in den Konzentrationen 0,5 und 1 µg aufgetragen. Die weiteren Vorgänge entsprachen dem Vorgehen wie bei PC.



- 1 Low Range Marker
- 2 1,0 μg rhPC in nicht-red. Probenpuffer
- 3 0,5 μg rhAPC in nicht-red. Probenpuffer
- 4 1,0 μg rhAPC in nicht-red. Probenpuffer
- 5 1,5 μg rhPC in red. Probenpuffer
- 6 0,75 μg rhAPC in red. Probenpuffer
- 7 1,5 μg rhAPC in red. Probenpuffer

Abbildung 9: Western-Blot APC

Für die weiteren Versuchsansätze wurden alle Reagenzien standardisiert. Das Plasma eines Probanden mit FV^{wt} diente für die weiteren Versuchsansätze als Normalkontrolle. Es wurde ein einzelner Spender benutzt, um Störmöglichkeiten mit anderen Gerinnungsfaktoren weitestgehend zu eliminieren. Als Testmethoden standen zum einen der APC-Resistenz-Kit der Firma Chromogenix sowie ein amidolytischer Ansatz zur Verfügung.

4.3. Veränderung von aPTT und APC/aPTT in sec bzw. der APC-SR bei abnehmender Faktor-V-Konzentration im APC-R-Coatest^R

Beobachtet wurde im nachfolgenden Versuch, wie sich die aPTT und die APC/aPTT in sec im APC-R-Coatest^R verändern, wenn die FV-Konzentration abgesenkt wird. Im Vergleich stehen Plasma eines gesunden Spenders sowie Plasma eines Probanden, der für die Erkrankung APC-Resistenz homozygot eingestuft ist. Ziel des Versuchs war es herauszufinden, ob eine Normalisierung der APC-Ratio bei alleiniger Verringerung der Plasma-FV-Konzentration verwirklichtbar ist. Für den Versuchsansatz wurden das gesunde sowie das pathologische Plasma mit FV-Mangelplasma auf Konzentrationen von 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 % und 0 % FV eingestellt. Die aPTT wurde nun ohne und in der Gegenwart von APC gemessen. Zur Überwachung wurden zwei handelsübliche Plasma-Kontrollen (normal und pathologisch) mitgeführt, deren Ergebnisse im Kontrollbereich lagen. Auf der Abbildung 10 ist die aPTT in sec in Abhängigkeit der FV-Konzentration für FV^{wt} und FV^{R506Q-homozygot} aufgezeichnet. Es ist kein wesentlicher Unterschied zwischen der aPTT in sec von FV^{wt} und FV^{R506Q-homozygot} zu erkennen. Ein geringer Unterschied ist im Konzentrationsbereich unter 20 % sichtbar. Einen deutlichen Unterschied erkennt man jedoch zwischen beiden Proben, wenn die APC/aPTT, wie sie in Abbildung 11 dargestellt ist, betrachtet wird. Sichtbar wird, daß eine Verminderung der FV-Konzentration auf 10-20 % eine aPTT in sec zeigt, die der aPTT einer Normalprobe entspricht. Betrachtet man nun die Abbildung 12, auf der nach Berechnung der APC-Ratio diese in Abhängigkeit von der FV-Konzentration aufgezeichnet wurde, so wird erkennbar, daß die berechnete Ratio auch bei einem FV-Gehalt von weniger als 20 % pathologisch bleibt.

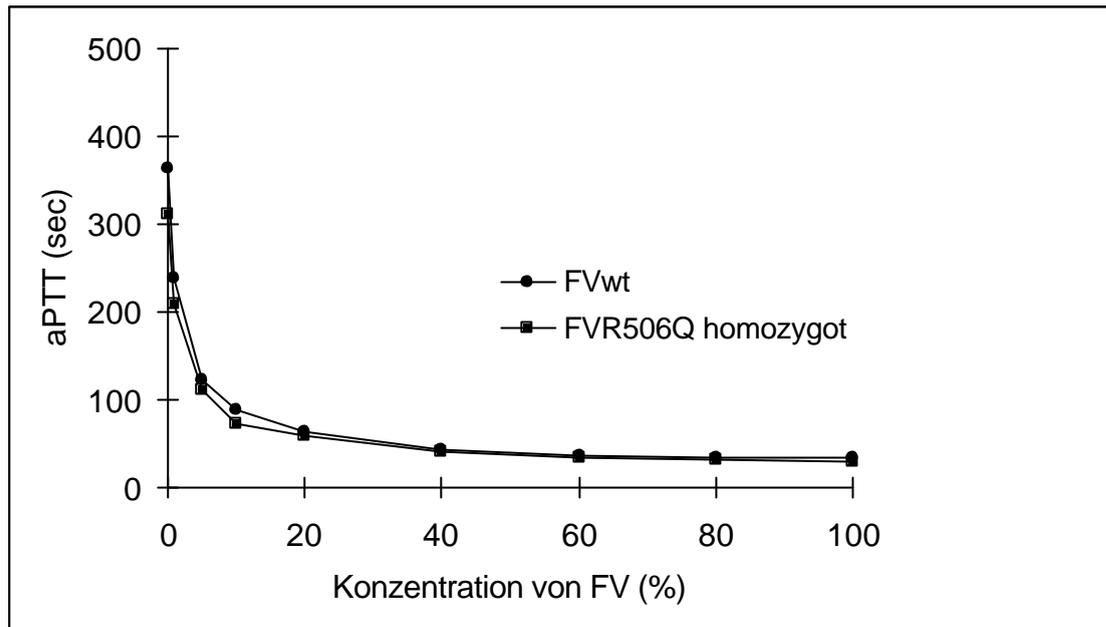


Abbildung 10: aPTT-Messung bei abnehmender Konzentration von FV^{wt} bzw. FV^{R506Q}

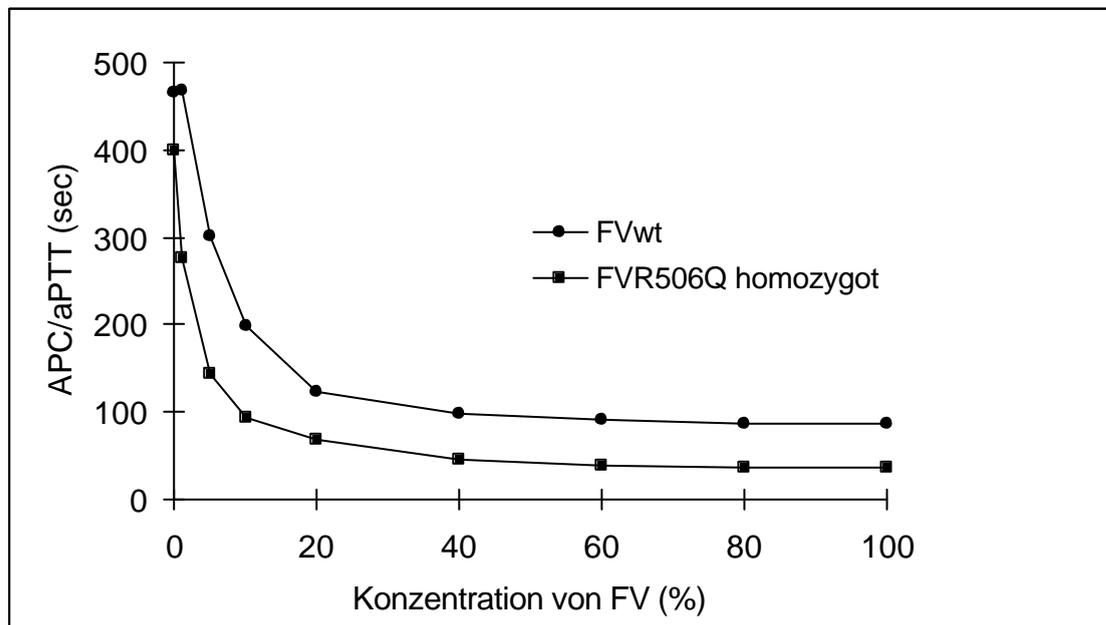


Abbildung 11: APC/aPTT-Messung bei abnehmender Konzentration von FV^{wt} bzw. FV^{R506Q}

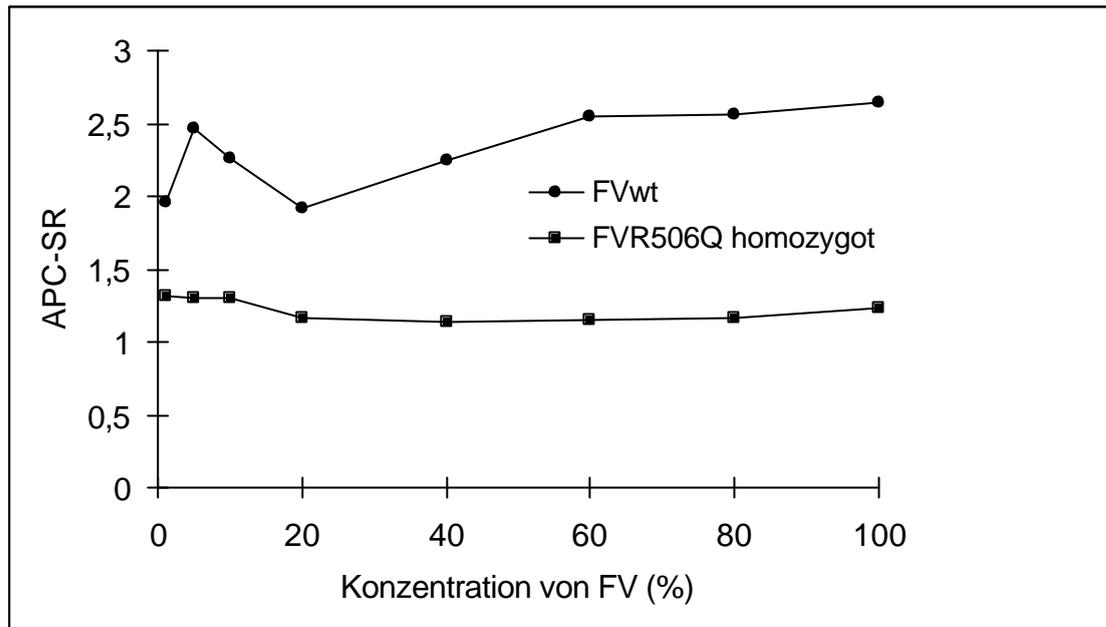


Abbildung 12: APC-SR bei abnehmender Konzentration von FV^{wt} bzw. FV^{R506Q}

In den Abbildungen 13 und 14 wurden gleichsam APC-SR und aPTT in sec abhängig von der FV-Konzentration aufgetragen.

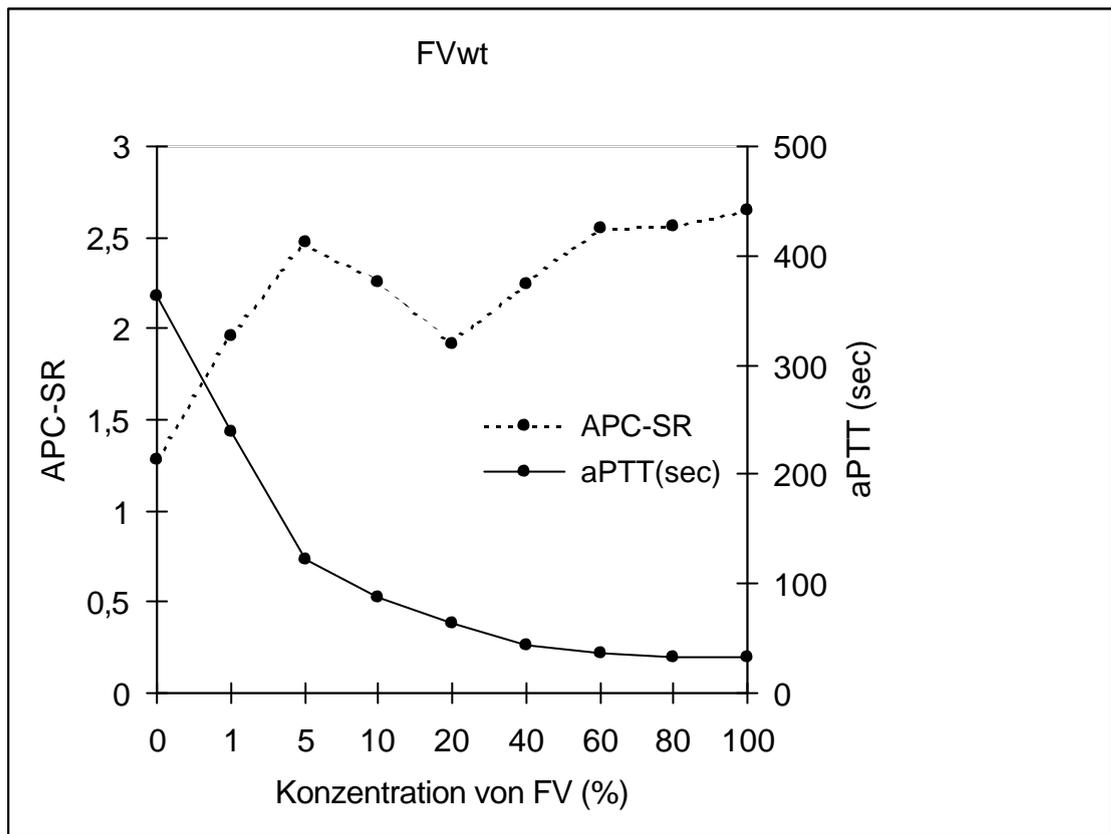


Abbildung 13: APC-SR und aPTT in sec abhängig von der FV-Konzentration für den FV^{wt}

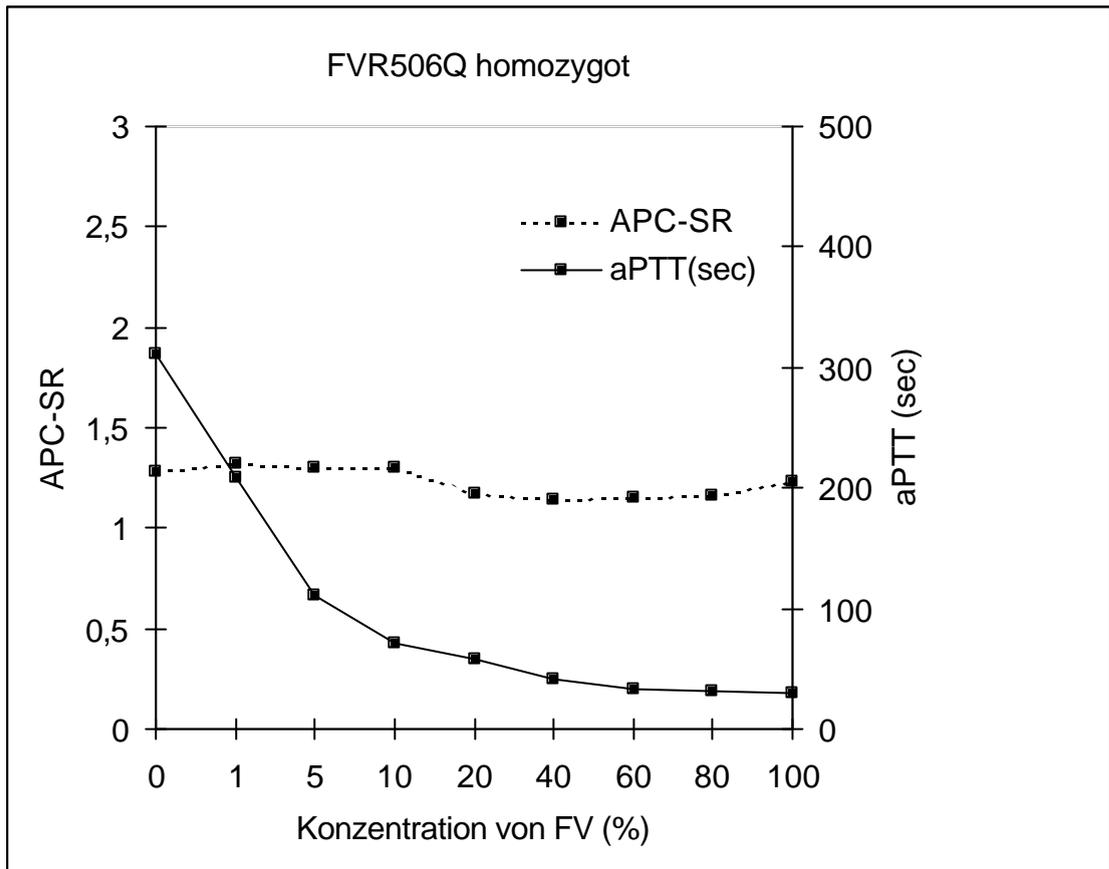


Abbildung 14: APC-SR und aPTT in sec abhängig von der FV-Konzentration für den FV^{R506Q}-homozygot

4.4. Veränderung der Faktor-Va-Restaktivität bei abnehmender Faktor-V-Konzentration im amidolytischen Testverfahren

Der gleiche Versuchsansatz sollte ergänzend für das amidolytische Testverfahren angewendet werden. Allerdings mußte festgestellt werden, daß der Versuchsansatz in dieser Form nicht zu verwertbaren Ergebnissen kommt. Mit abnehmendem FV-Gehalt müßte theoretisch auch die FVa-Restaktivität abnehmen. Dies ist aber nur in einem Konzentrationsbereich von mindestens 60 % FV erkennbar wie auf Abbildung 15 zu sehen, danach steigt sie linear.

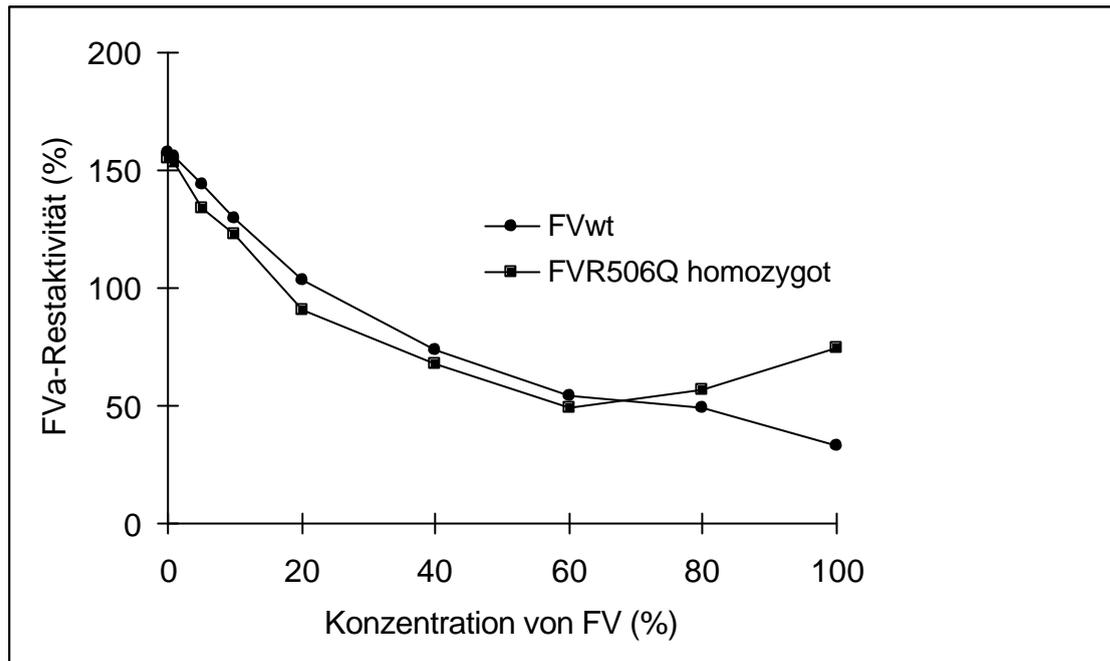


Abbildung 15: FVa-Restaktivität bei abnehmender Konzentration von FV^{wt} bzw. FV^{R506Q} -homozygot

4.5. Verhalten von aPTT und APC/aPTT in sec bzw. der APC-SR bei Veränderung des Verhältnis von Faktor- V^{wt} /Faktor- V^{R506Q} im APC-R-Coatest^R

Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, wie sich aPTT und APC/aPTT verhalten, wenn das Verhältnis von FV^{wt}/FV^{R506Q} verändert wird. Dazu wurde das Plasma des gesunden Spenders mit homozygotem Plasma auf abnehmende Konzentrationen FV^{wt} eingestellt. Getestet wurden 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 % und 0 % FV^{wt} , welches einer 100 % homozygoten Probe entspricht. Auf Abbildung 16 ist ohne APC keine augenscheinliche Differenz zwischen 100 % FV^{wt} und 100 % FV^{R506Q} -homozygot zu sehen. In der Gegenwart von APC allerdings kommt es zu einer starken Abnahme der aPTT in sec in Abhängigkeit vom FV^{wt} -Gehalt. Nach den Graphiken zu urteilen, ist für eine normale APC/aPTT ein FV^{wt} -Gehalt von mindestens 60-80 % nötig. Ein vergleichbares Ergebnis erhält man, wenn nach Berechnung der APC-SR diese gegen den FV^{wt} -Gehalt aufgezeichnet wird. Für eine Normalisierung der Sensi-

tivitäts-Ratio ist wie in Abbildung 17 dargestellt ein FV^{wt} -Gehalt von mindestens 60 % notwendig.

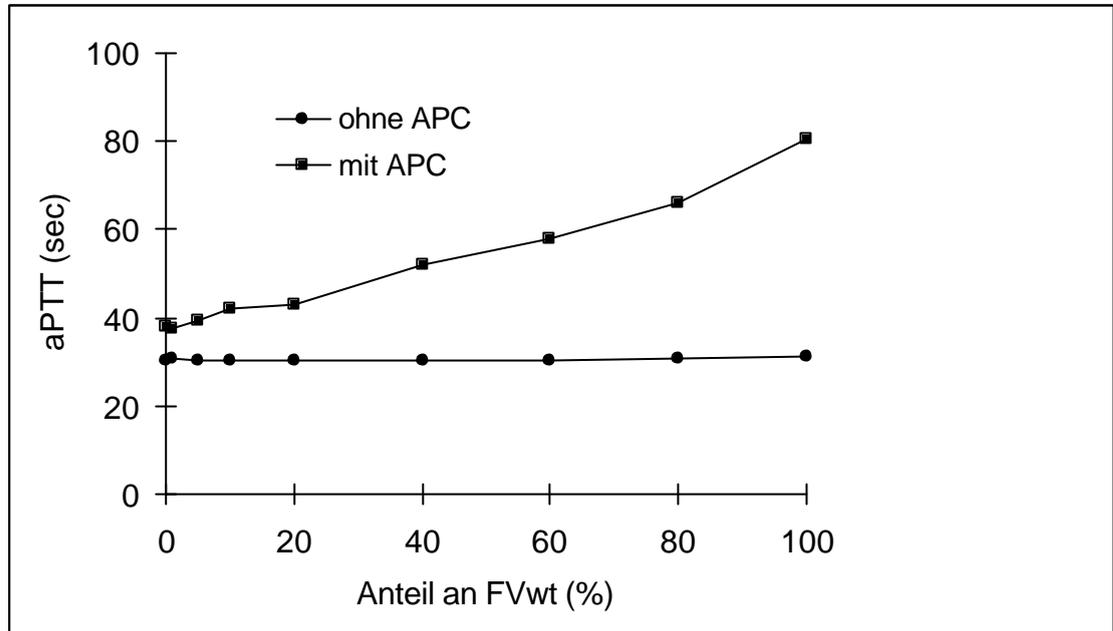


Abbildung 16: aPTT und APC/aPTT in sec bei abnehmendem Anteil an FV^{wt}

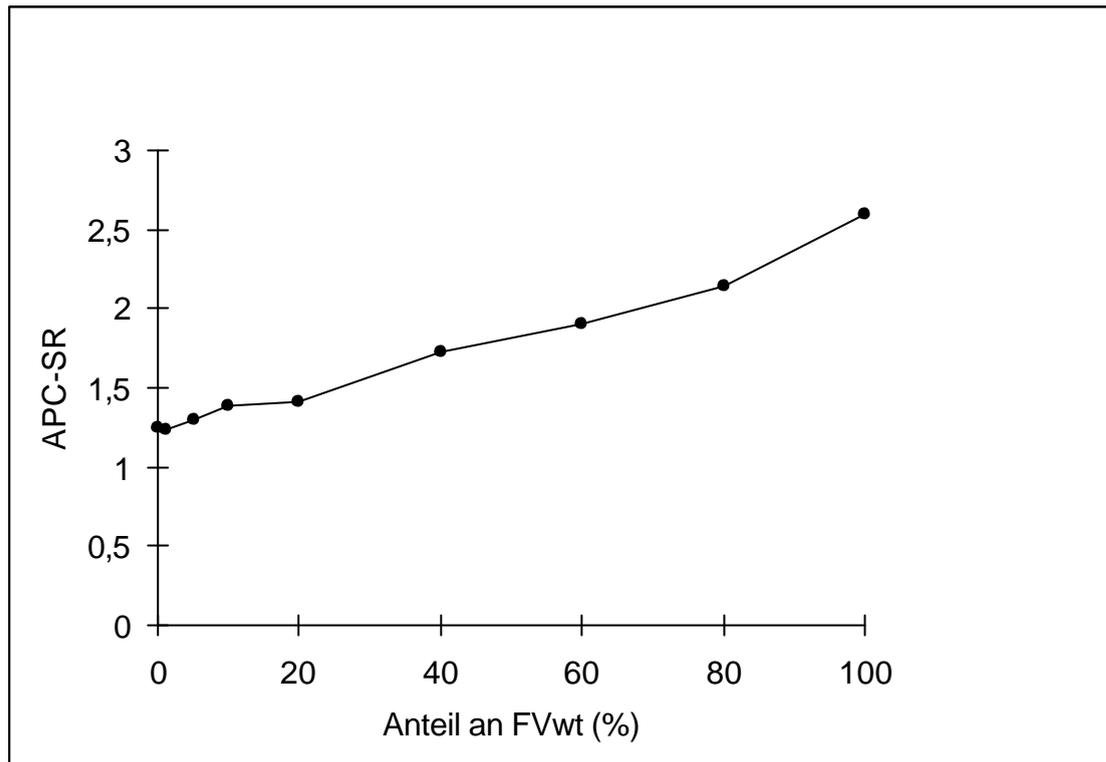


Abbildung 17: APC-SR bei abnehmendem Anteil an FV^{wt}

4.6. Verhalten der Faktor-Va-Restaktivität bei Veränderung des Verhältnis Faktor-V^{wt}/Faktor-V^{R506Q} im amidolytischen Testverfahren

Der gleiche Versuchsansatz wurde nun auf den kinetischen Test übertragen, dessen Ergebnis in der nächsten Abbildung zu sehen ist. Auch hier wird deutlich, daß eine FVa-Restaktivität von weniger als 40 % erst bei einem FV^{wt}-Gehalt von 60-80 % zu erreichen ist. Die Auswertung beider Testverfahren kommt zu einem übereinstimmenden Ergebnis.

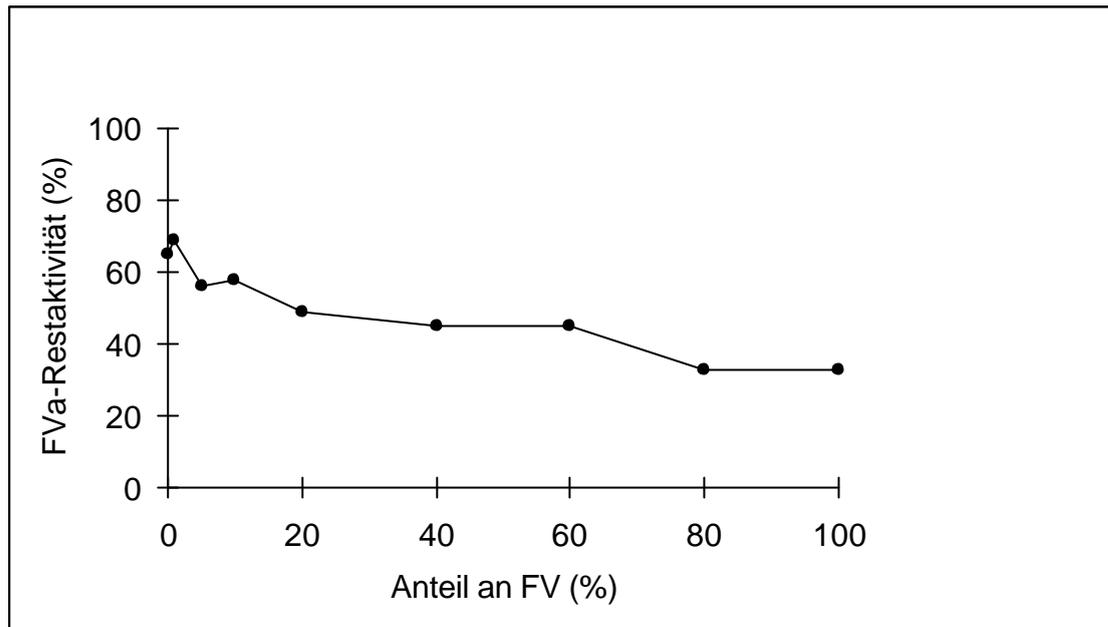


Abbildung 18: FVa-Restaktivität bei abnehmendem Anteil an FV^{wt}

4.7. Veränderung von aPTT und APC/aPTT in sec bzw. der APC-SR bei gleichzeitiger Veränderung von Quantität und Qualität von Faktor-V im APC-R-Coatest^R

Im nächsten Ansatz wurde sowohl das Verhältnis von FV^{wt}/FV^{R506Q} als auch die Quantität von Gesamt-FV verändert. Dazu wurde Mischungen von 80 % $FV^{wt}/20$ % FV^{R506Q} , 60 % $FV^{wt}/40$ % FV^{R506Q} und 40 % $FV^{wt}/60$ % FV^{R506Q} hergestellt und diese mit FV-Mangelplasma von 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 % bis auf 0 % FV verdünnt. Aus diesen Ansätzen wurde die aPTT und die APC/aPTT in sec bestimmt. Nach den Ergebnissen zufolge, die in den Abbildungen 19-24 dargestellt sind, muß man eine FV-Konzentration von mindestens 60 % und einen FV^{wt} -Gehalt von mindestens 80 % fordern, um eine APC-SR größer als 2 zu erzielen.

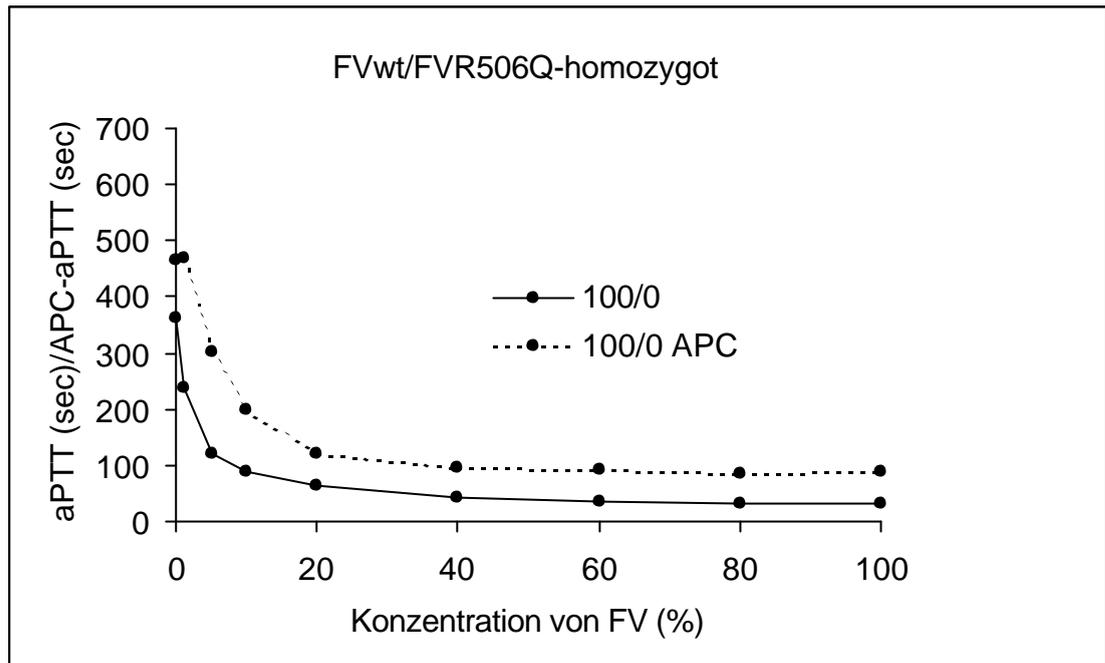


Abbildung 19: aPTT und APC/aPTT in sec bei abnehmender Konzentration an FV^{100%wt/0%R506Q}

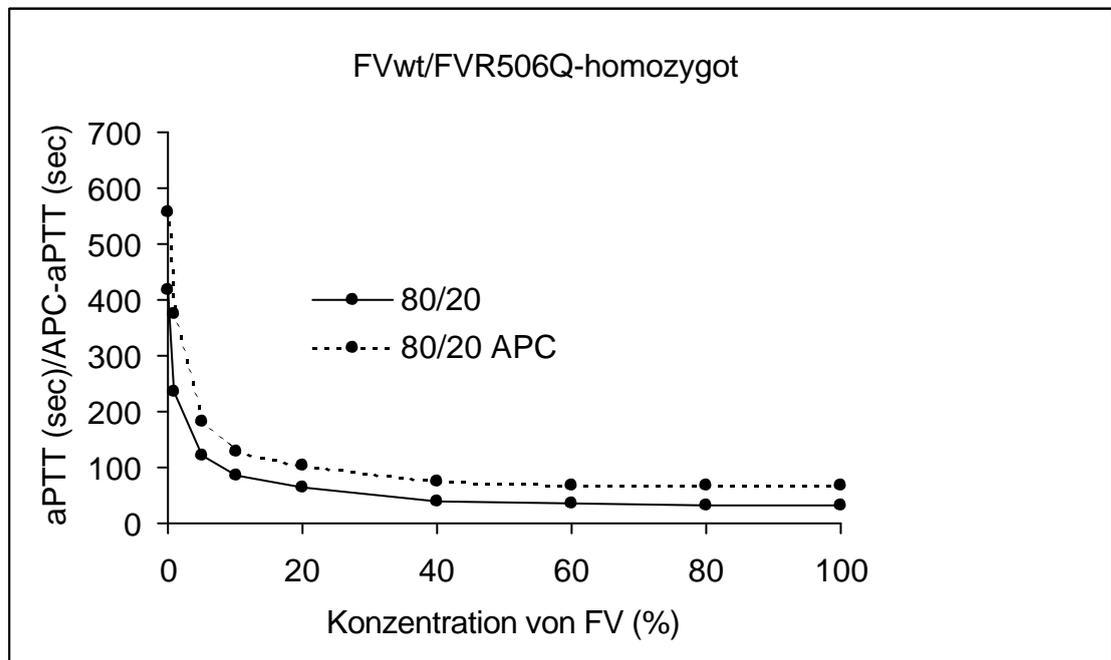


Abbildung 20: aPTT und APC/aPTT in sec bei abnehmender Konzentration an FV^{80%wt/20%R506Q}

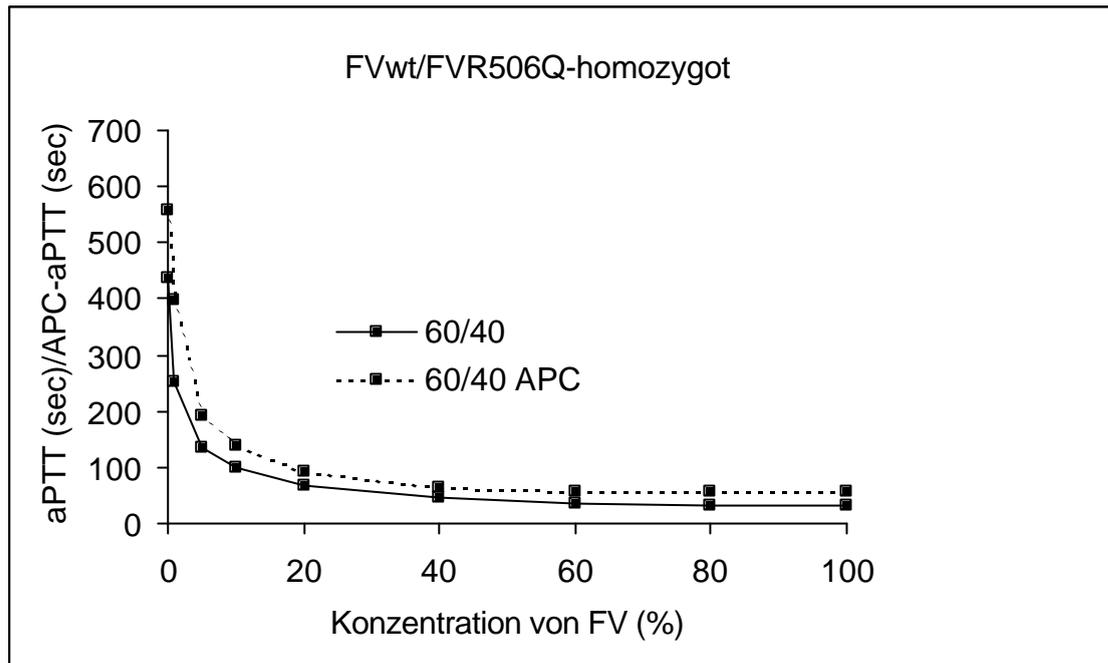


Abbildung 21: aPTT und APC/aPTT in sec bei abnehmender Konzentration an $FV^{60\%wt/40\%R506Q}$

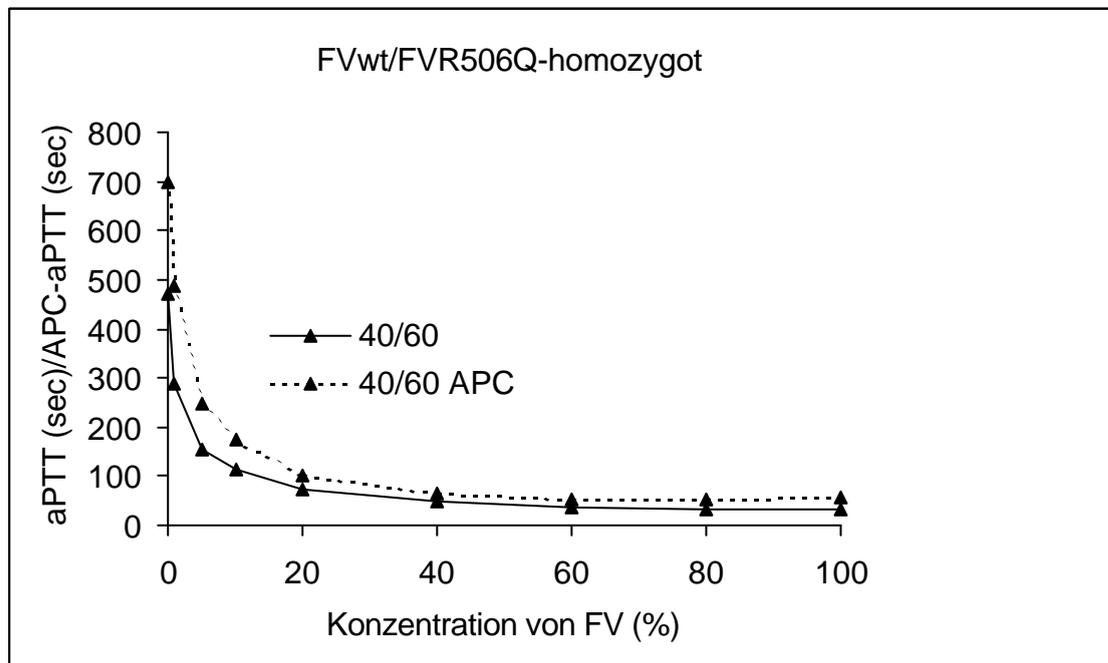


Abbildung 22: aPTT und APC/aPTT in sec bei abnehmender Konzentration an $FV^{40\%wt/60\%R506Q}$

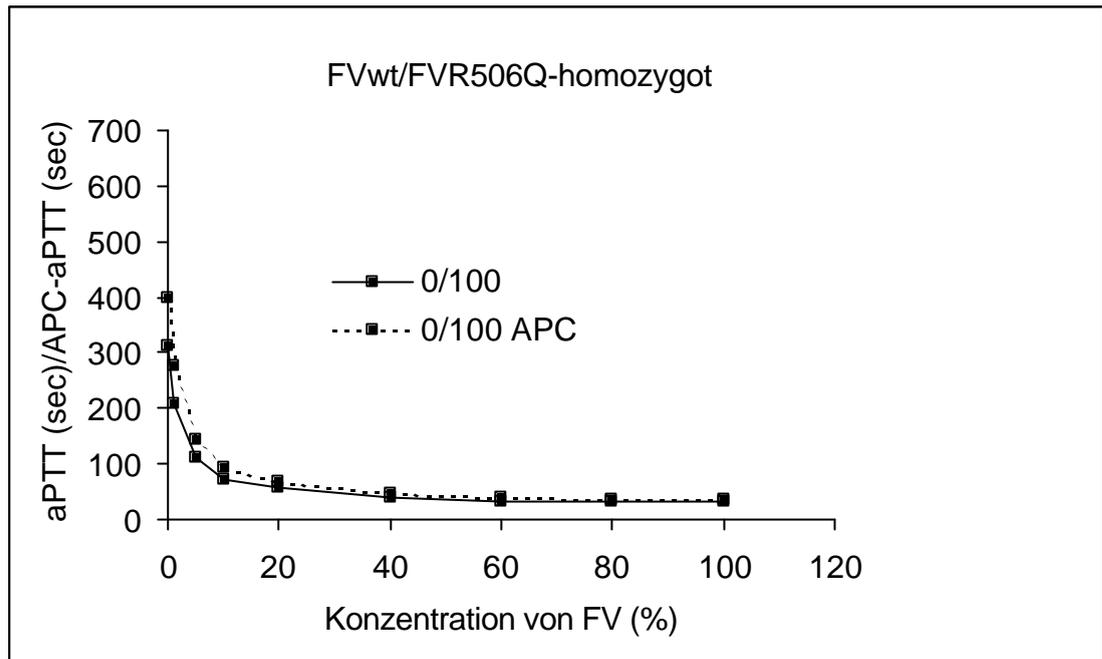


Abbildung 23: aPTT und APC/aPTT in sec bei abnehmender Konzentration an $FV^{0\%wt/100\%R506Q}$

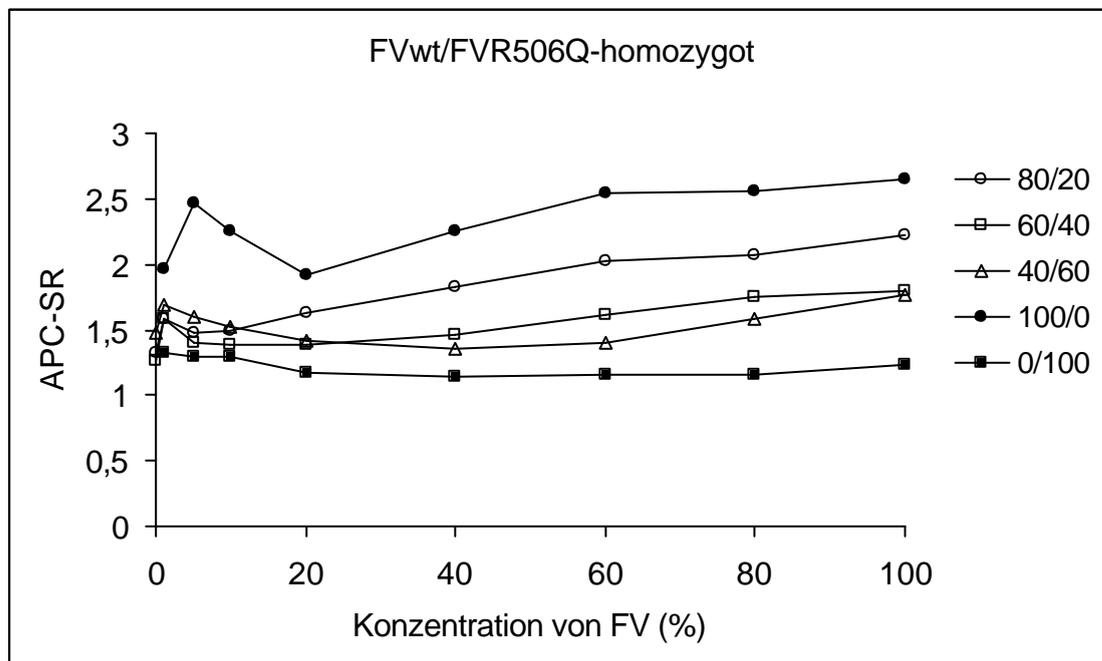


Abbildung 24: APC-SR bei abnehmender Konzentration an FV

4.8. HepG₂-Zellen in Kultur

Um die Regulationsmechanismen der FV-Produktion auf Proteinebene besser kennenzulernen, wurde mit Zellkulturtechniken gearbeitet. Für die Versuche wurde die Zellreihe HepG₂ verwendet, die nach Wilson et al. Faktor V produziert. Ziel war es zunächst eine FV-Aktivität aus Zellüberständen von HepG₂-Zellen nachzuweisen. Dazu sollte Zellüberstand im amidolytischen Test als Nachweisverfahren auf FV-Aktivität getestet werden. Als erstes wurde das in Zukunft verwendete Medium auf Störmechanismen ausgetestet. Dazu wurden verschiedene Plasmakonzentrationen verdünnt mit SFM/DMEM (ohne Phenolrot), mit FV-Mangelplasma und mit SFM speziell für Hepatozyten (ohne Phenolrot) hergestellt. Die Plasmakonzentration wurde abnehmend von 100 %, 80 %, 50 %, 25 %, 10 % auf 0 % eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze 1:100 und 1:300 in TBS 1x/0,1 % BSA verdünnt und im amidolytischen Assay eingesetzt. In Abbildungen 25 und 26 wurde die absolute Extinktion nach einer 60 min dauernden kinetischen Messung gegen die Plasma-Konzentration für die Verdünnungen 1:100 und 1:300 aufgezeichnet. Erkennbar ist, daß kein entscheidender Unterschied zwischen den einzelnen Kurven zu beobachten ist. Zu beobachten ist weiterhin, daß sich die Extinktion bei einer Plasmakonzentration von 10 % noch deutlich von der Hintergrundextinktion abgrenzt.

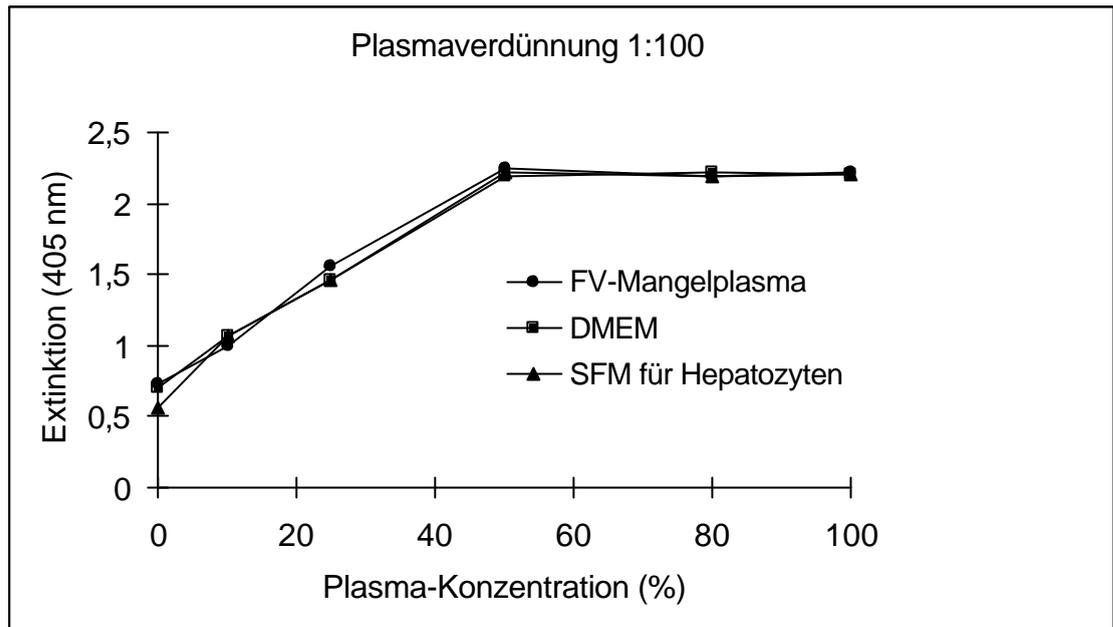


Abbildung 25: Nachweis von FV-Aktivität im amidolytischen Test in der Plas-
maverdünnung 1:100

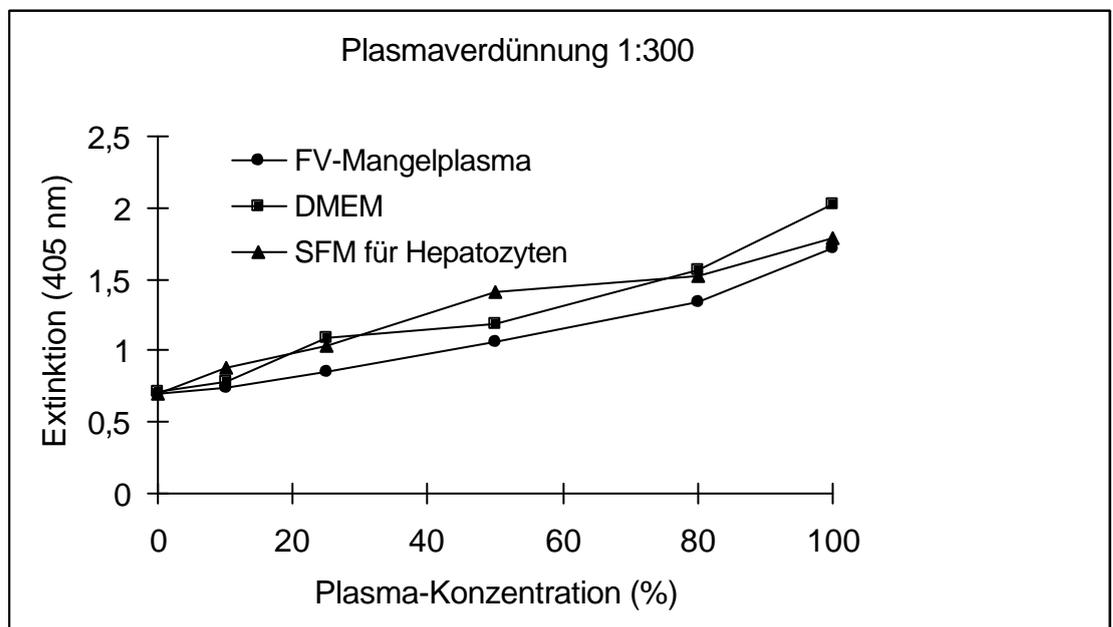


Abbildung 26: Nachweis von FV-Aktivität im amidolytischen Test in der Plas-
maverdünnung 1:300

Für weitere Versuchsansätze konnte demnach SFM/DMEM ohne Phenolrot verwendet werden. Im Versuchsansatz mit den Medien kann FV-Aktivität nachgewiesen werden.

4.9. Sensitivitätstestung

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage wie sensitiv sich der Assay gestalten läßt, ohne seine Spezifität einzubüßen. Dazu wurde eine Schachbrettitation durchgeführt. Hierzu wurden Plasmakonzentrationen von 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % und 0 % in SFM/DMEM ohne Phenolrot und zum Vergleich in FV-Mangelplasma hergestellt und diese jeweils 1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250 und 1:300 in TBS 1x/0,1 % BSA verdünnt. Das Ergebnis der nachfolgenden einstündigen kinetischen Messung bei 405 nm ist auf den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Selbst bei einer Plasmakonzentration von 2 % ist bei einer Verdünnung von 1:25 noch eine deutliche Differenz der Extinktion zum Nullwert erkennbar. Das bedeutet, daß die Sensitivität des amidolytischen Testverfahrens für die FV-Aktivität bei 4 pg/ml liegt, wenn man der Rechnung eine Plasma-FV-Konzentration von 5 ng/ml zugrunde legt.

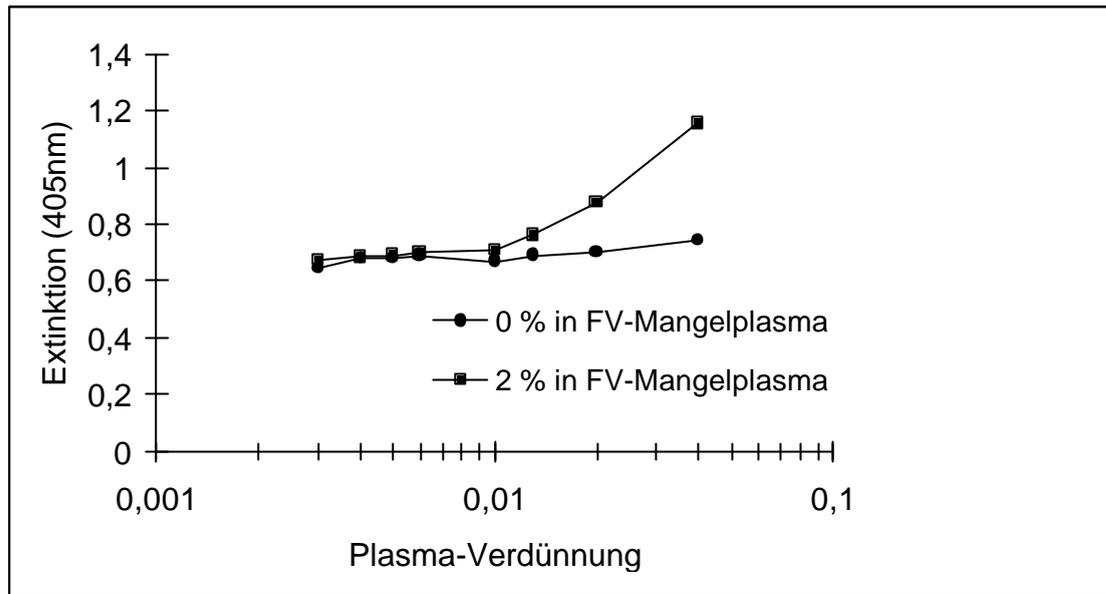


Abbildung 27: Sensitivitätsbestimmung des amidolytischen Testverfahrens für Plasma-FV verdünnt in FV-Mangelplasma

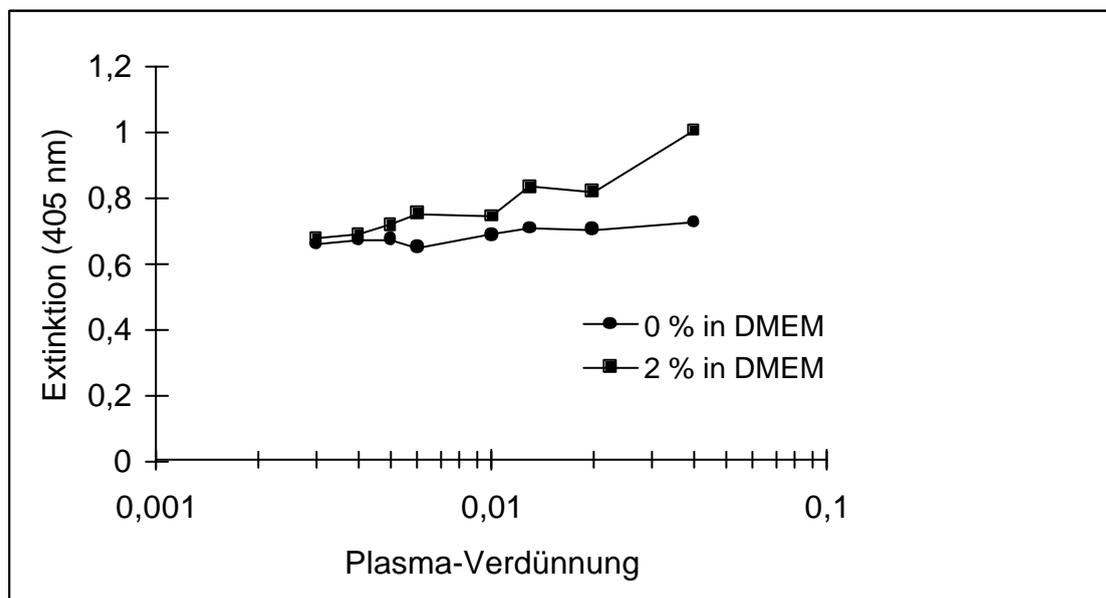


Abbildung 28: Sensitivitätsbestimmung des amidolytischen Testverfahrens für Plasma-FV verdünnt in DMEM

4.10. Intra- und Interassayvarianz des amidolytischen Tests

Im nächsten Schritt mußte für den Versuchsansatz die Intra- und Interassayvarianz ausgetestet werden, um in Zukunft reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Zum Austesten der Intraassayvarianz wurden mit FV-Mangelplasma 3 Konzentrationen Plasma (0 %, 2 %, 20 %) hergestellt und diese in den Verdünnungen 1:25, 1:50 und 1:100 eingesetzt. Von den einzelnen Ansätzen wurden innerhalb eines Assays 8-fach-Werte angesetzt und im kinetischen Test gemessen. Die Assayvarianz wird als Variationskoeffizient in % angegeben und aus dem Quotienten Standardabweichung x 100/Mittelwert berechnet. Die Warngrenzen betragen im allgemeinen bis zu 10 %, die Kontrollgrenzen bis zu 20 %. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt. Zur Bestimmung der Interassayvarianz wurden 4 getrennte Ansätze an verschiedenen Tagen durchgeführt. Verwendet wurden die gleichen Plasma-Konzentrationen wie zur Bestimmung der Intraassayvarianz und die Verdünnungen 1:25 und 1:100. Pro Testansatz wurden Doppelwerte benutzt. Das Ergebnis der Tests ist in der Tabelle 5 zu sehen.

Proben	Verdünnung	Extinktion (405 nm)	s	VK in %
0% Plasma	1:25	0,182	0,004	2,2
0% Plasma	1:50	0,179	0,004	2,2
0% Plasma	1:100	0,179	0,004	2,2
2% Plasma	1:25	0,375	0,022	5,9
2% Plasma	1:50	0,274	0,018	6,6
2% Plasma	1:100	0,224	0,008	3,6
20% Plasma	1:25	1,796	0,089	4,9
20% Plasma	1:50	1,019	0,134	13,2
20% Plasma	1:100	0,702	0,058	8,3

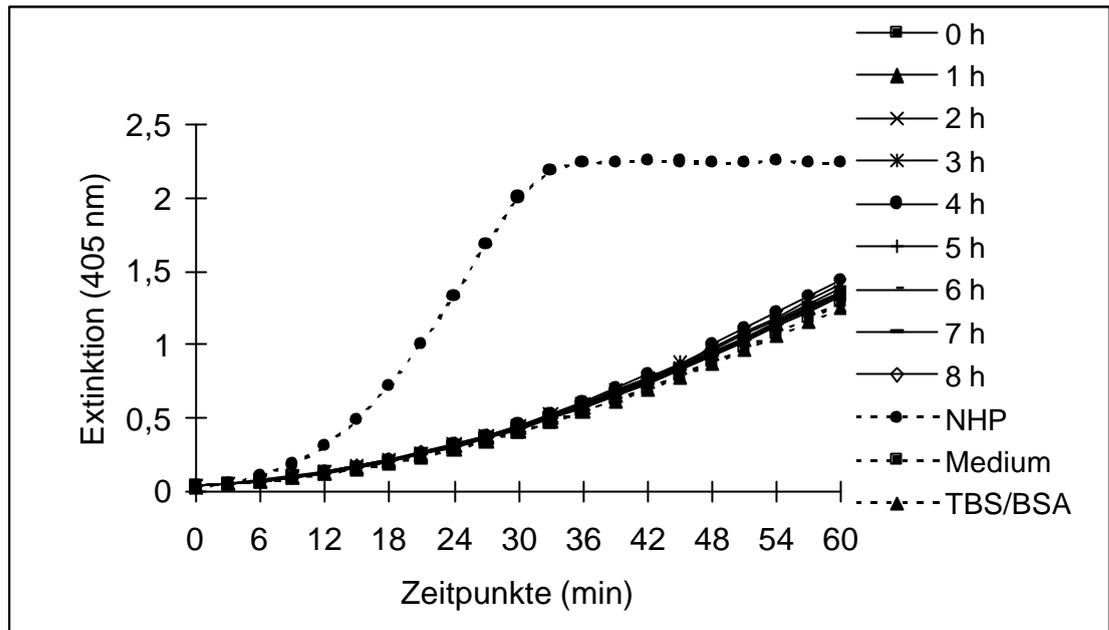
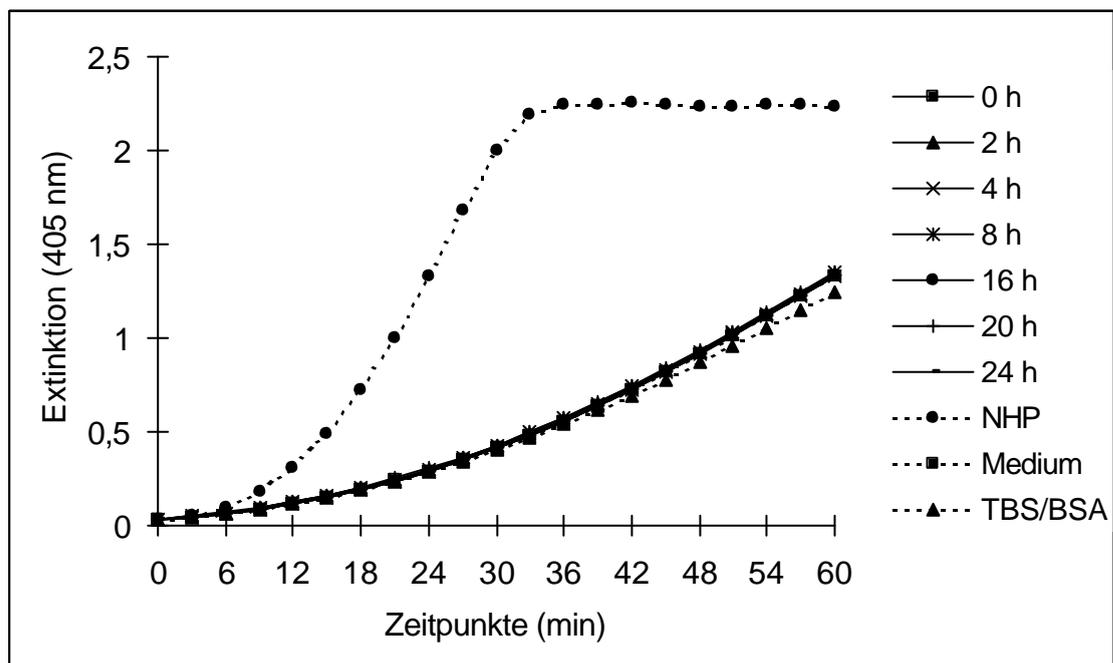
Tabelle 4: Intraassayvarianz des amidolytischen Tests

Proben	Verdünnung	Extinktion (405 nm)	s	VK in %
0% Plasma	1:25	0,408	0,029	7,1
0% Plasma	1:100	0,415	0,023	5,5
2% Plasma	1:25	0,559	0,066	11,8
2% Plasma	1:100	0,446	0,022	4,9
20% Plasma	1:25	1,884	0,237	12,5
20% Plasma	1:100	0,782	0,116	14,8

Tabelle 5: Interassayvarianz des amidolytischen Tests

4.11. Zellversuche mit HepG₂-Zellen

Nachdem der amidolytische Test standardisiert war, wurden nun die eigentlichen Zellversuche gestartet. Dazu wurde die HepG₂-Zellreihe zunächst aufgetaut und hochgezogen. Für den ersten Zellversuch wurde eine konfluente 100er Platte 1:10 gesplittet und mit jeweils 10 ml DMEM/P/S/G/10 % FCS gefüttert und beobachtet, wann sich ein konfluenten Monolayer gebildet hatte. Dann wurde zum Zeitpunkt 0 das Medium abgesaugt, 1 x mit HBS 1x gewaschen und mit 10 ml SFM/DMEM ohne Phenolrot befüllt und damit der Zeitversuch gestartet. Die einzelnen Zeitpunkte waren zum einen 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h und 8 h, zum anderen 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 20 h und 24 h. Zum bestimmten Zeitpunkt wurden 250 µl Medium pro Platte abgenommen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt. Die Zellen wurden verworfen. Nach dem vorsichtigen, aber zügigen Auftauen der Zellüberstände wurden diese zunächst 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand 1:30 und die Plasma-Positivkontrolle 1:300 im amidolytischen Test eingesetzt. Die kinetische Messung lief über 1 h bei 405 nm, wobei alle 3 min ein Messwert genommen wurde. Wie in den Abbildungen 29 und 30 zu erkennen ist, kann im Zellüberstand der HepG₂-Zelllinie in diesem Ansatz keine FV-Aktivität nachgewiesen werden. Ein methodischer Fehler wurde durch die Positivkontrolle mit Normalplasma ausgeschlossen.

Abbildung 29: Amidolytischer Test mit HepG₂-ZellüberstandAbbildung 30: Amidolytischer Test mit HepG₂-Zellüberstand

Im nächsten Schritt wurden Schalengröße und Mediumvolumen verändert. Dazu wurden 100er-, 60er- und 35er-Schalen verwendet. Die Mediummenge der 100er-Schalen variierte von 10 ml, 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml bis zu 5 ml als minimal-

tem Volumen. Das Volumen der 60er-Schalen wurde von 6 ml, 4 ml, 2 ml auf 0,5 ml verändert. Die Mediummenge der 35er-Schalen variierte zwischen 1 ml, 0,5 ml und 0,2 ml. Die Inkubationszeiten waren für alle gleich und betragen 0 h, 24 h und 48 h. Auch diese Ansätze zeigten keine relevante FV-Aktivitätsmessung (Versuch undokumentiert). In einem weiteren Experiment wurden jeweils 5 100er-Schalen mit 7 ml Medium vereinigt, Zeitpunkte der Messung waren 0 h, 24 h und 48 h. Von diesen 35 ml wurden Verdünnungen von 1:10, 1:20 und 1:30 hergestellt und diese im amidolytischen Test gemessen. Als Positivkontrolle wurde Plasma-FV benutzt, welches einmal 1:300 in DMEM/SFM und einmal 1:300 in TBS 1x/0,1 % BSA verdünnt wurde. Das Medium war 1:10, 1:20 und 1:30 vorverdünnt. Als Pufferkontrolle diente einmal TBS 1x/0,1 % BSA und zum anderen DMEM/SFM in den Verdünnungen 1:10, 1:20 und 1:30. Erkennbar wird in den 3 folgenden Abbildungen 31, 32 und 33, daß eine geringe Menge FV-Aktivität nachweisbar ist, die jedoch zu gering ist, um eine konkrete Aussage treffen zu können. In den Abbildungen ist erkennbar, daß die FV-Aktivität mit zunehmender Verdünnung des Zellüberstandes abnimmt und das nach 24 h ein maximaler Messwert erkennbar ist.

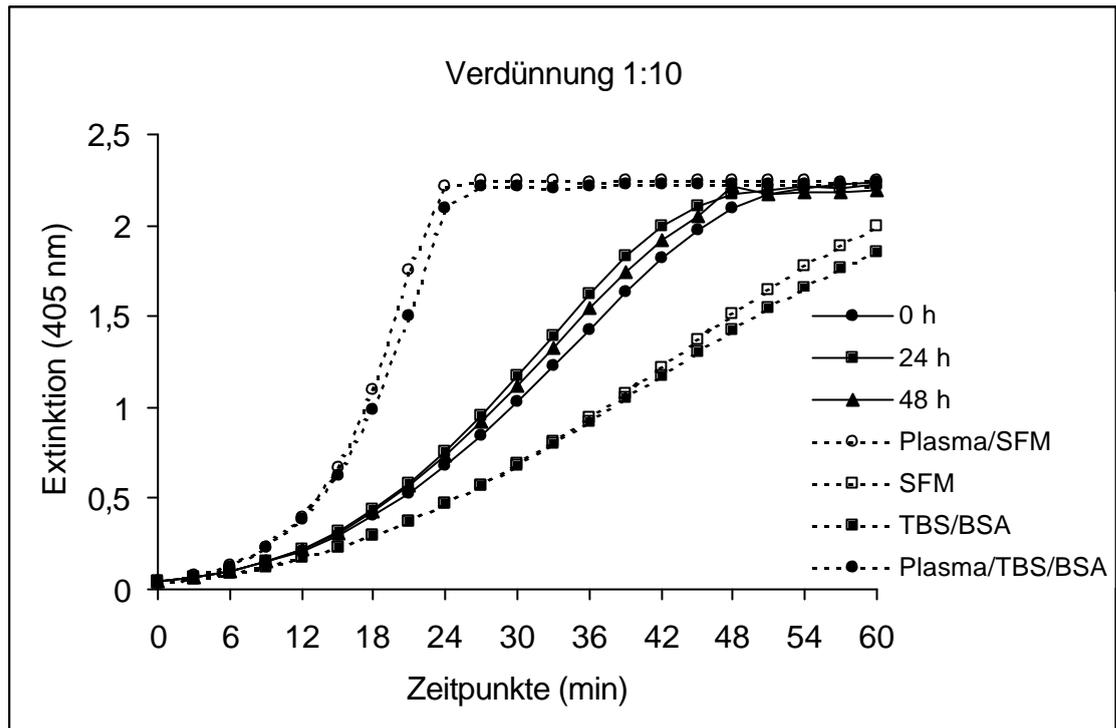


Abbildung 31: Messung von FV-Aktivität in HepG2-Zellüberstand im amidolytischen Test (Verdünnung 1:10)

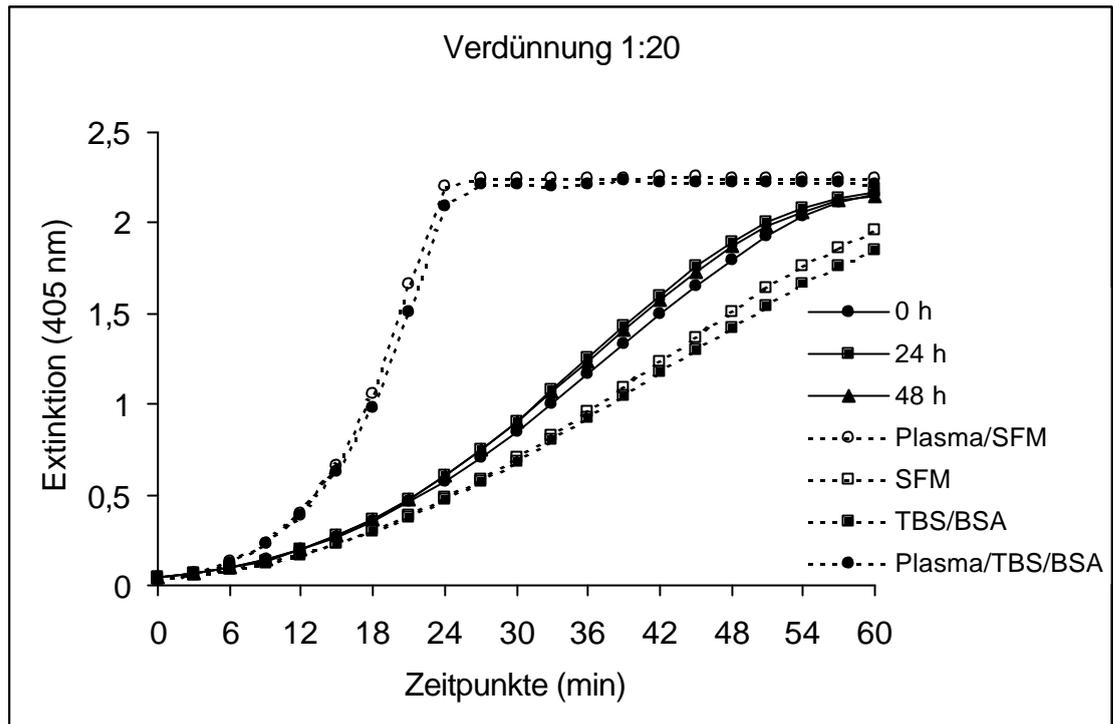


Abbildung 32: Messung von FV-Aktivität in HepG2-Zellüberstand im amidolytischen Test (Verdünnung 1:20)

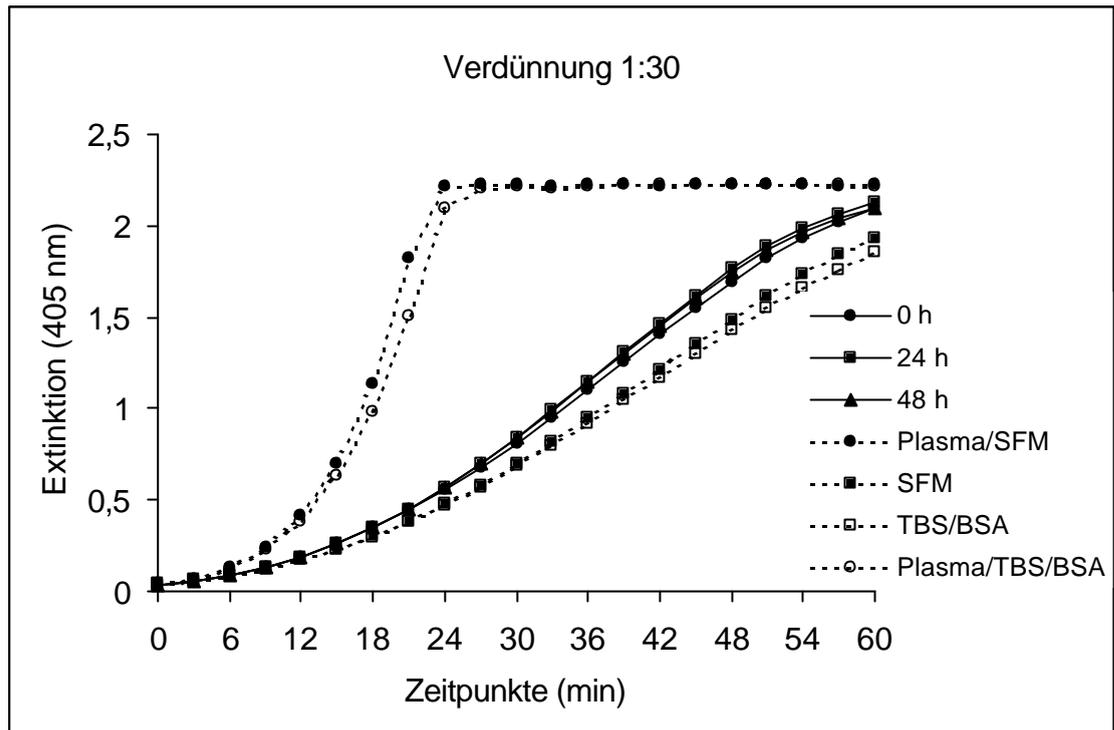


Abbildung 33: Messung von FV-Aktivität in HepG2-Zellüberstand im amidolytischen Test (Verdünnung 1:30)

In den Tabellen 6, 7 und 8 ist nach Berechnung und Berücksichtigung der Pufferkontrollen die messbare FV-Aktivität in % dargestellt.

Proben	Extinktion (1:10)	%	absolut %
Plasma/SFM	1,759	100	
SFM	0,378	21	
Zeitpunkte			
0 h	0,531	30	9
24 h	0,585	33	12
48 h	0,568	32	11

Tabelle 6: FV-Aktivität in Prozent für die Verdünnung 1:10

Proben	Extinktion (1:20)	%	absolut %
Plasma/SFM	1,664	100	
SFM	0,387	23	
Zeitpunkte			
0 h	0,458	27	4
24 h	0,475	29	6
48 h	0,479	29	6

Tabelle 7: FV-Aktivität in Prozent für die Verdünnung 1:20

Proben	Extinktion (1:30)	%	absolut %
Plasma/SFM	1,818	100	
SFM	0,383	21	
Zeitpunkte			
0 h	0,443	24	3
24 h	0,448	25	4
48 h	0,452	25	4

Tabelle 8: FV-Aktivität in Prozent für die Verdünnung 1:30

Es stellten sich sich die Fragen, ob die HepG₂-Zellen überhaupt FV produzieren, ob FV, wenn er denn gebildet wird, in der Mediumlösung stabil ist oder abgebaut wird.

Zur Klärung dieses Sachverhalts wurden parallel zwei Versuchsansätze untersucht. Für den ersten Ansatz wurden 4 konfluente 35er Schalen HepG₂-Zellen benutzt, die zum Zeitpunkt 0 1 x mit HBS 1x gewaschen wurden und anschließend mit 1 ml SFM befüllt wurden. Zu diesem 1 ml Medium wurde isolierter FV beigefügt, der nach Austesten in einer Verdünnung von 1:2000 die gleiche Aktivität wie die 1:300-Verdünnung von Plasma aufwies. Dann wurden die 4 Platten zurück in den Inkubator gestellt und der Zeitversuch mit den Zeitpunkten 0 h, 4 h,

24 h und 48 h gestartet. Die erste Platte wurde sofort weiterverarbeitet wie gewohnt. Im zweiten Ansatz wurde die Stabilität von isoliertem FV in Eppendorfhütchen untersucht. Dazu wurden pro Zeiteinheit 0,5 ml Medium in 4 Eppendorfhütchen vorgelegt und isolierter FV in einer Verdünnung von 1:2000 hinzupipetiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße im Brutschrank bis zum jeweiligen Zeitpunkt inkubiert. In den folgenden Abbildungen 34 und 35 ist zu erkennen, dass die FV-Aktivität von 0h bis 48h nur unwesentlich abnimmt, unabhängig davon, ob sich FV auf einem Zellrasen befindet oder in isoliertem Medium. Des weiteren ist zu sehen, daß die maximale FV-Aktivität in einem Bereich unter 24 h zu messen ist.

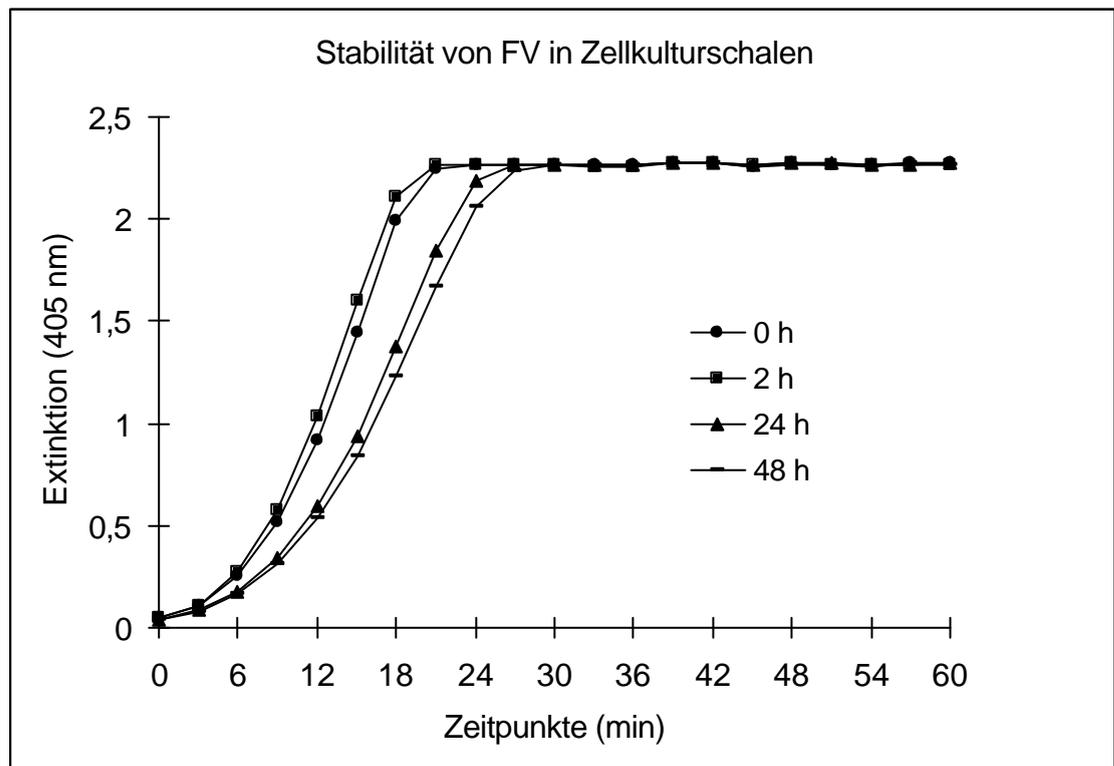


Abbildung 34: Stabilität von FV in Zellkulturschalen

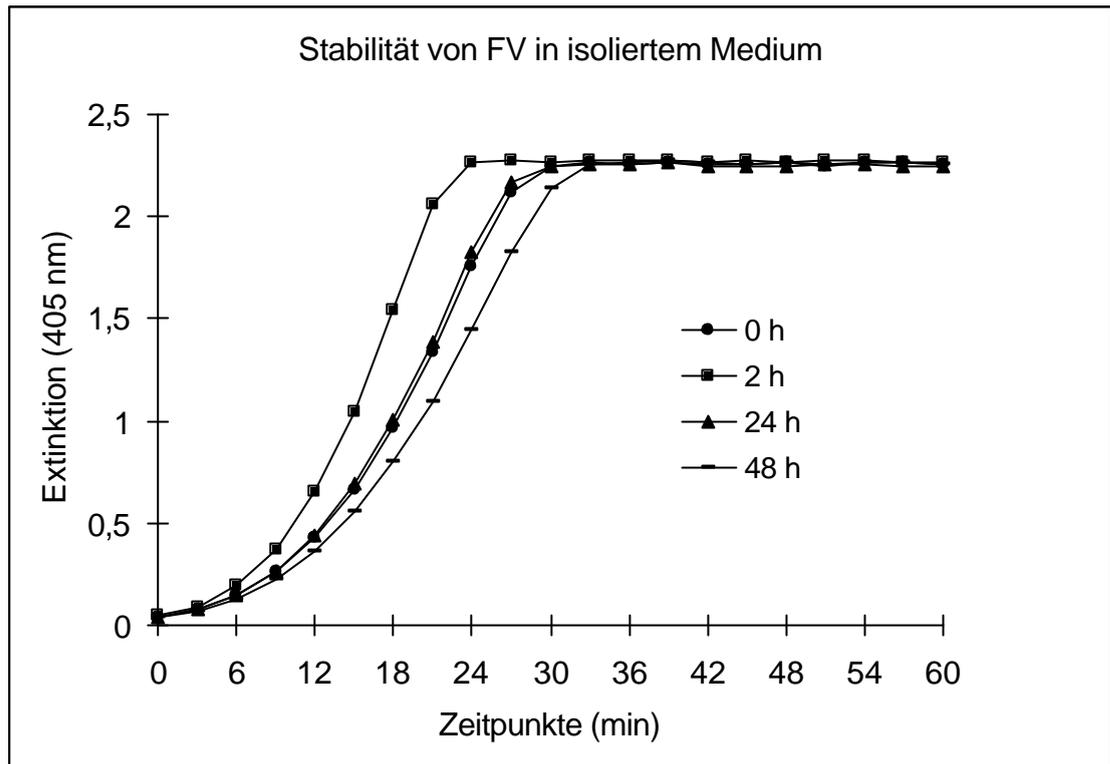


Abbildung 35: Stabilität von FV in isoliertem Medium

Nachdem die Stabilität von isoliertem FV im benutzten Medium bewiesen war, stellte sich die Frage, ob von den Zellen produzierter FV nicht aus der Zelle geschleust wird, sondern im Zellinneren verbleibt. Wenn dies der Fall wäre, so müßte zumindest im Zelllysate FV-Aktivität nachweisbar sein. Zur Herstellung eines Zelllysates kommen zwei verschiedene Lyse-Puffer in Betracht. 1 % NP-40 in TBS-Puffer und 1 % Triton-X-100 in TBS-Puffer. Nach Austesten der beiden Lysepuffer mußte jedoch festgestellt werden, daß die amidolytische Reaktion und die damit verbundene FV-Aktivitätsmessung durch die beiden Substanzen gestört wird. Eine Zelllysatherstellung mit Lysepuffer kam demnach für weitere Versuche nicht in Frage. Eine weitere Möglichkeit Zelllysate zu generieren, ist die Sonifizierung von Zellmaterial. Dabei wird durch Ultraschallwellen die Zellmembran in ihrem Grundgerüst destabilisiert und der Zellinhalt kann austreten. Für den Versuchsansatz wurden zwei konfluente Monolayer von HepG₂-Zellen in 100er-Schalen benutzt. Eine der Platten wurde 1 x mit 10 ml HBS 1x gewaschen, mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert, nochmals 1 x mit HBS 1x gewaschen.

schen. Von dieser Suspension wurde ein Aliquot für die Zellzählung und die Proteinbestimmung aufgehoben. Die Lösung wurde dann abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml TBS 1x aufgenommen. Bei der zweiten Platte wurde der Waschvorgang mit HBS 1x noch zweimal wiederholt, also insgesamt 3 x gewaschen und ein Aliquot aufbewahrt. Anschließend wurden auch diese Zellen in 1 ml TBS 1x aufgenommen. Mit der Zellzählung im Zellcounter Casy wurde eine mittlere Zellzahl von $17,85 \times 10^6$ HepG₂-Zellen/ml für die erste Platte mit 1 x waschen und $16,29 \times 10^6$ HepG₂-Zellen für die zweite Platte mit 3 x waschen ermittelt. Die Proteinkonzentration lag mit der Methode nach Bradford für die erste Platte im Mittel 3,69 mg/ml und für die zweite Platte 3,67 mg/ml. Für den amidolytischen Test wurden die Zellen dann sonifiziert und im Versuch 1:1 eingesetzt. In Abbildung 36 ist zu sehen, daß im Zelllysate eine relativ große FV-Aktivität im Vergleich zum Plasma nachzuweisen ist. Nach 3 Waschschritten nimmt die Aktivität leicht ab, was aber auch an der niedrigeren Zellzahl liegen kann.

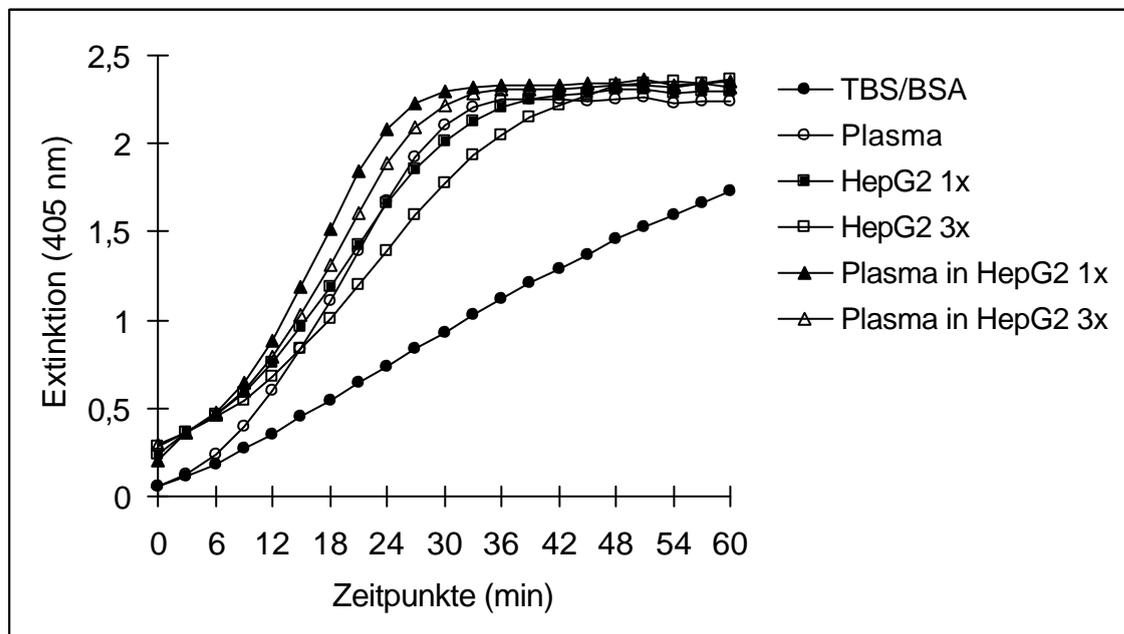


Abbildung 36: Nachweis von FV-Aktivität in Zelllysate von HepG₂-Zellen

Nach Berechnung und Berücksichtigung der Pufferkontrollen konnte ausgehend von Plasma-FV eine absolute FV-Aktivität von 53 % im HepG₂-Zelllysate erreicht werden. Nach 3 Waschschrinen reduziert sich der Wert auf 40 %.

Proben	Extinktion nach 27'	%	absolut %
Plasma	1,927	100	
TBS/BSA	0,836	43	
HepG ₂ -Zelllysate 1x gewaschen	1,858	96	53
HepG ₂ -Zelllysate 3x gewaschen	1,592	83	40
Plasma in HepG ₂ -Zelllysate 1x gewaschen	2,225	116	
Plasma in HepG ₂ -Zelllysate 3x gewaschen	2,09	109	

Tabelle 9: Nachweis von FV-Aktivität in Zelllysate von HepG₂-Zellen in %

4.12. Aufbau eines polyklonalen und eines monoklonalen ELISA's zum Nachweis von Faktor-V

Um noch eine weitere Nachweismöglichkeit für FV zu haben, den Nachweis von FV-Antigen, wurden als nächstes ein polyklonaler und ein monoklonaler ELISA entwickelt. Zur Verfügung standen ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Human-Faktor-V-Antikörper der Firma Behring und ein monoklonaler Maus-Anti-Human-Faktor-V-Antikörper von Haematologic Inc..

4.12.1. Aufbau des polyklonalen ELISA's

Zum Aufbau des polyklonalen Ansatzes wurde ein Teil des Kaninchen-Antikörpers mit Biotin markiert, um diesen im ELISA in einem zweiten Schritt mit Streptavidin-POD nachweisen zu können. Eingesetzt wurde für die Biotinylierung 1,59 mg Antikörper in einem Volumen von 1 ml, welcher zunächst ü. N.

bei 4°C gegen PBS 1x dialysiert wurde. Danach wurde 1 ml einer 1mg/ml-Stocklösung von N-Hydroxy-Succinimido-Biotin hinzugefügt und unter Bewegung 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder gegen PBS 1x bei 4°C dialysiert. In einem Test-ELISA wurde die Biotinylierung als gelungen bewertet. Zum Aufbau des ELISA's mit polyklonalem Antikörper wurde zunächst eine Schachbrett-titration durchgeführt, um die optimale Antikörperkonzentration zu ermitteln. Dafür wurde Kaninchen-Anti-Human-FV in den Konzentrationen 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 µg/ml in einem Volumen von 50 µl/well ü. N. bei 4 C° in Coating-Puffer auf einer Microtiterplatte immobilisiert. Anschließend wurde mit 10 % Milchpulver mit 200 µl/well 1 h bei RT abgesättigt. In einem vorgehenden Versuch mit dem Absättigungsmedium 3 % BSA wurde eine erhöhte Backgroundextinktion festgestellt, daher wurde auf Milchpulver ausgewichen. Anschließend wurde Plasma in einer Verdünnung von 1:10, was einer FV-Konzentration von 50 ng entspricht, in einem Volumen von 50 µl 2 h bei RT inkubiert. Der biotinylierte Erstantikörper zur Detektion, Kaninchen-anti-human-FV-Biotin, wurde nun schachbrettartig in den Konzentrationen 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 µg/ml in einem Volumen von 50 µl 1 h bei RT auf der Mikrotiterplatte inkubiert und im nächsten Schritt mit Streptavidin-POD 1:1000 in einem Volumen von 50 µl 1 h bei RT unter Lichtabschluß detektiert. Entwickelt wurde der ELISA mit ABTS-Reagenz. Gemessen wurde der Test im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm. Kontrollen wurden mit und ohne Beschichtung durchgeführt. Aus dem Ergebnis dieses Vorversuchs wurde eine optimale Konzentrationskombination von 1 µg/ml für den Beschichtungsantikörper und 0,2 µg/ml für den ersten Detektionantikörper ermittelt. Im zweiten Schritt sollte nun die Nachweisgrenze des Assays bestimmt werden. Dazu wurden jeweils Dreifachwerte mit den Plasma-verdünnungen 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:50000, 1:100000, 1:200000 und 1:500000 eingesetzt, was einer Plasma-FV-Konzentration zwischen 1 ng und 1 pg entspricht. In der nachfolgenden Abbildung 37 ist erkennbar, dass nach Subtraktion der Kontroll-Extinktion selbst eine FV-Konzentration von 1pg noch vom 0-Wert zu differenzieren ist.

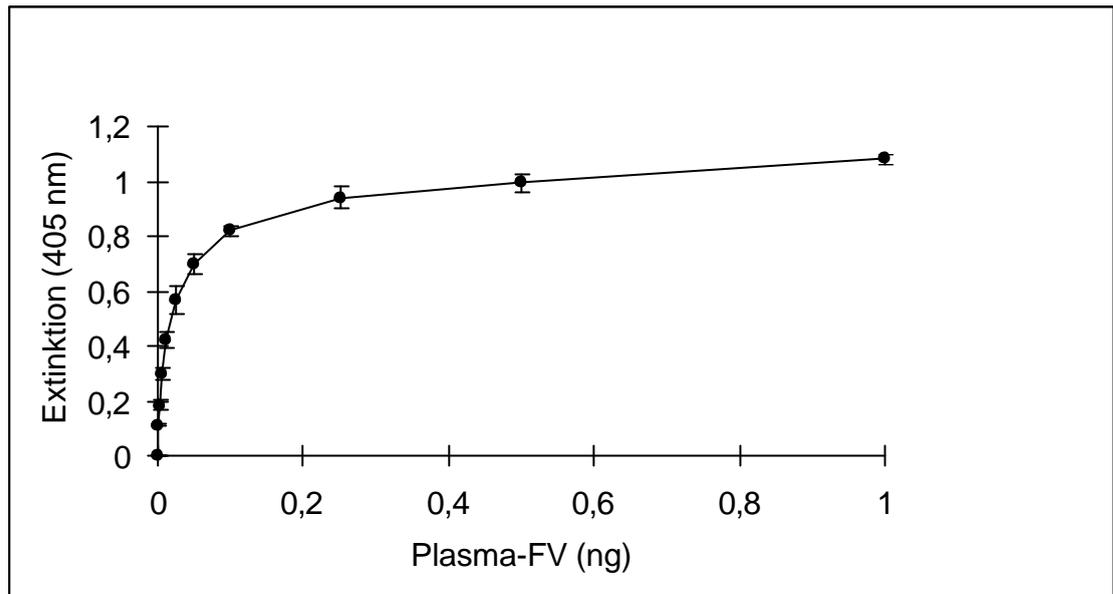


Abbildung 37: Plasma-FV-Eichkurve für den polyklonalen ELISA

Anschließend wurde für den ELISA die Intra- und Interassayvarianz bestimmt. Dazu wurde, an drei aufeinanderfolgenden Tagen, der gleiche Ansatz durchgeführt. Es wurden jeweils 21 Werte der Plasmaverdünnungen 1:1000, 1:10000 und 1:100000 gewonnen und aus diesen Werten die Varianz bestimmt, die in der nachfolgenden Tabelle 10 erläutert sind.

Zeit	VK (%) Verdünnung 1:1000	VK (%) Verdünnung 1:10000	VK (%) Verdünnung 1:100000
Tag 1	2,5	3,9	5,9
Tag 2	2,6	3,6	3,7
Tag 3	6,8	4,9	4,8
Tag 1/2/3	10,9	13,7	22,6

Tabelle 10: Intra- und Interassayvarianz für den polyklonalen ELISA

4.12.2. Aufbau des monoklonalen ELISA's

Genauso wurde auch mit dem zweiten ELISA, wo zur Detektion ein monoklonaler Anti-FV-Antikörper zur Verfügung stand, verfahren. In der Schachbrettitation wurde Kaninchen-Anti-Human-FV in den Konzentrationen 0,5, 1, 2, 5 und 10 µg/ml gecoatet, mit 3 % BSA in PBS 1x 1 h bei RT abgesättigt, mit Plasma-FV in einer Verdünnung von 1:10 (50 ng FV) beladen und mit Maus-Anti-Human-FV schachbrettartig in den Verdünnungen 0,5, 1, 2, 5 und 10 µg/ml detektiert. Als Detektionsantikörper wurde Ziegen-Anti-Maus-POD-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 benutzt. Kontrollen wurden auch hier mit und ohne Beschichtung durchgeführt. Nach den Ergebnissen dieses Vorversuchs wurde der polyklonale Beschichtungsantikörper für weitere Versuche in der Konzentration von 1 µg/ml und der monoklonale Erstantikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Die Nachweisgrenze des monoklonalen Ansatzes wurde anhand von jeweils Dreifachwerten mit Plasmaverdünnungen von 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 bestimmt. Das Ergebnis ist in der nächsten Abbildung 38 zu erkennen.

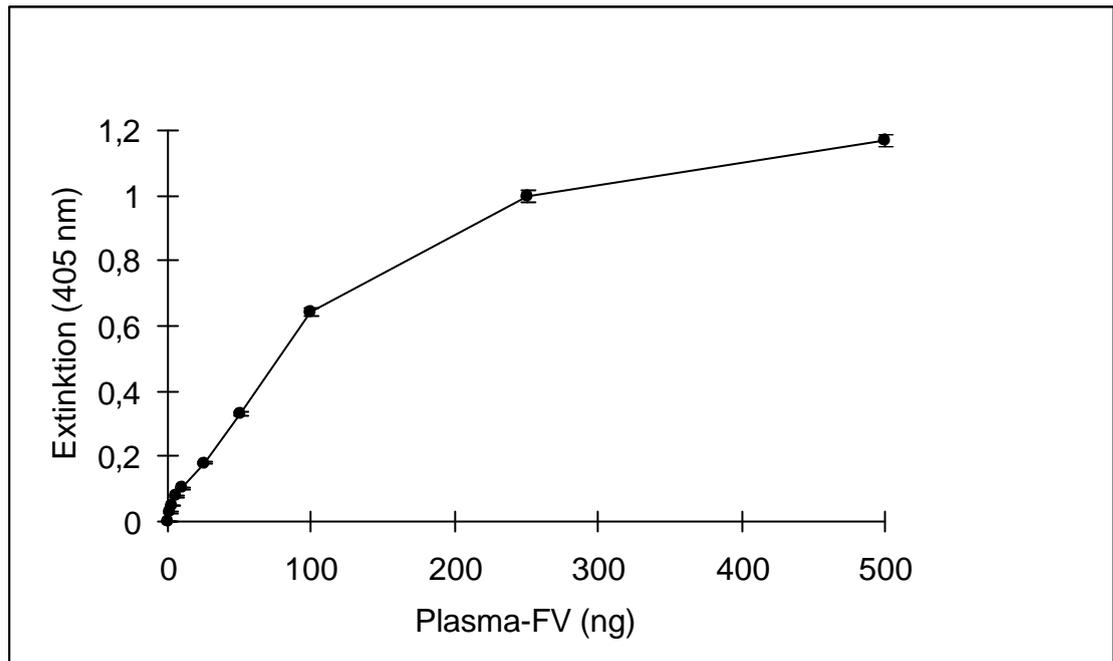


Abbildung 38: Plasma-FV-Eichkurve für den monoklonalen ELISA

Genauso wie für den ersten ELISA mußte auch für diesen Ansatz die Intra- und Interassayvarianz bestimmt werden. Dazu wurden an 3 verschiedenen Tagen jeweils 21 Werte der Plasma-Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 gemessen und aus diesen Werten die Varianz berechnet. Das Ergebnis ist in Tabelle 11 aufgelistet.

Zeit	VK (%)	VK (%)	VK (%)
	Verdünnung 1:2	Verdünnung 1:5	Verdünnung 1:10
Tag 1	3,7	6,4	6,2
Tag 2	3	4,8	7,2
Tag 3	7,6	6,2	8,7
Tag 1/2/3	5,5	11,4	11,4

Tabelle 11: Intra- und Interassayvarianz für den monoklonalen ELISA

4.13. Nachweis von Faktor-V im Zellversuch

Der Zellversuch wurde nun wiederholt. Als Nachweisverfahren für FV wurden parallel der amidolytische Test, der polyklonale und der monoklonale ELISA eingesetzt. Vorbereitung und Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach dem bewährten Schema. Als Negativkontrolle sollten EC dienen, die nach Giddings et al. keinen FV produzieren. Es wurde eine Zellzahl von 15×10^6 Zellen eingestellt. Im amidolytischen Test wurde nur das Zelllysate getestet, und zwar vor und nach Zentrifugation. In den ELISA's wurde sowohl Zellüberstand als auch Zelllysate getestet. Eingesetzt wurden Verdünnungen von 1:1, 1:100, 1:1000 und 1:10000. Im amidolytischen Ansatz konnte FV-Aktivität nachgewiesen werden, wie in den folgenden Abbildungen 39 und 40 zu sehen ist. Interessant ist zum einen die FV-Aktivitätsmessung in EC, die ohne Zentrifugation messbar war. Nach Zentrifugation fiel dieser Messwert sehr stark ab. Das könnte bedeuten, daß FV in EC zellgebunden vorliegt.

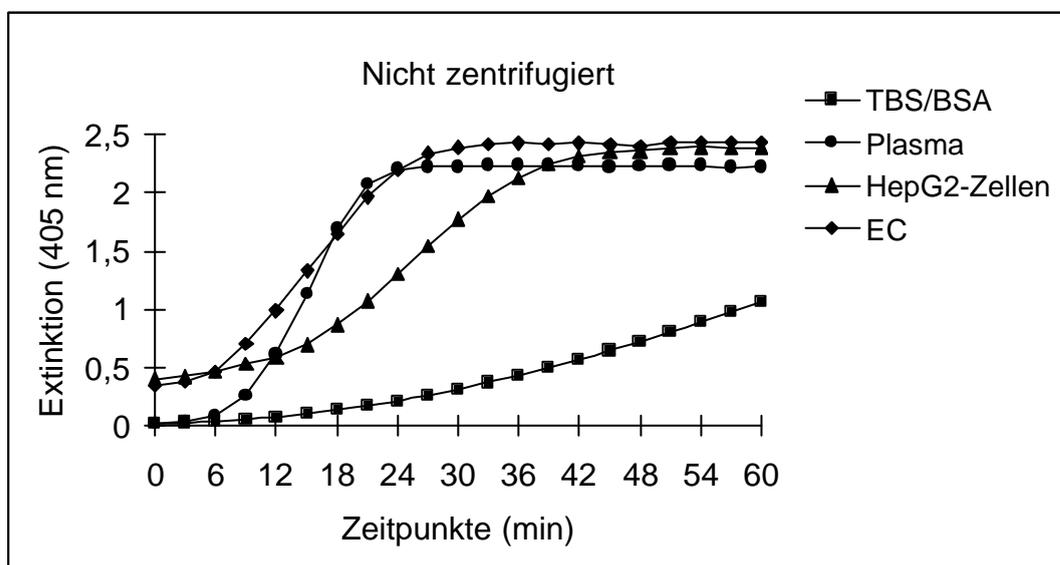


Abbildung 39: FV-Aktivitätsmessung in HepG₂- und EC-Lysat (nicht zentrifugiert)

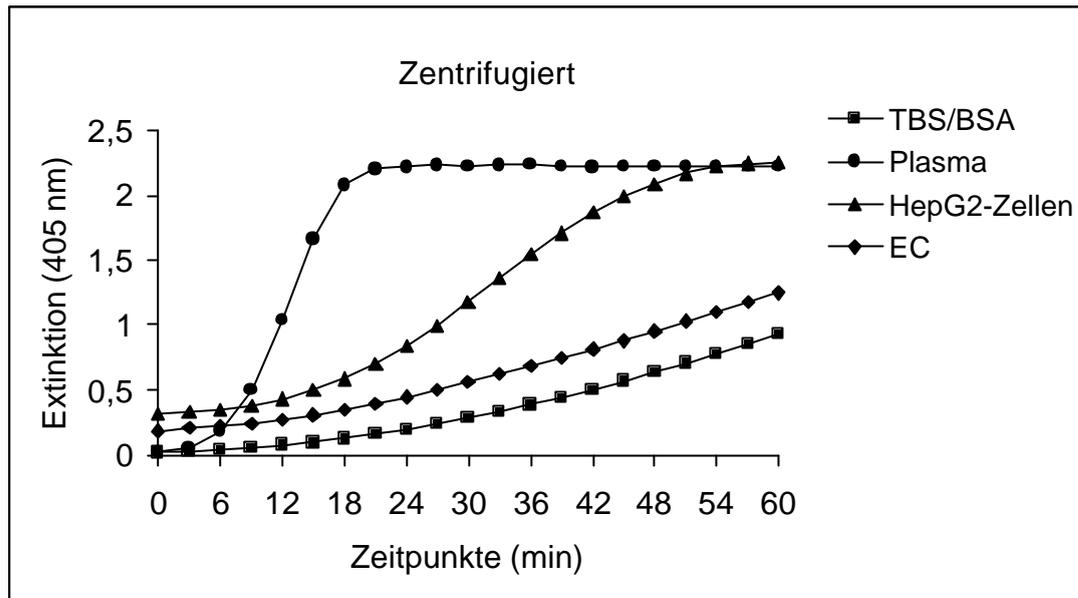


Abbildung 40: FV-Aktivitätsmessung in HepG₂- und EC-Lysat (zentrifugiert)

In den Tabellen 12 und 13 sind die einzelnen Prozentwerte gegenübergestellt.

Probe	Extinktion (405 nm) nach 21 min		
	nicht zentrifugiert		
		FV (%)	absolut %
TBS/BSA	0,175	8,5	
Plasma	2,069	100	
HepG2-Zellen	1,072	51,8	43,3
EC	1,966	95	86,5

Tabelle 12: FV-Aktivität in Prozent (nicht zentrifugiert)

Probe	Extinktion (405 nm) nach 21 min zentrifugiert		
		FV (%)	absolut %
TBS/BSA	0,161	7,31	
Plasma	2,202	100	
HepG2- Zellen	0,698	31,7	24,4
EC	0,395	17,9	10,6

Tabelle 13: FV-Aktivität in Prozent (zentrifugiert)

In den Abbildungen 40 und 41 sind die Eichkurven des polyklonalen und monoklonalen ELISA's für NHP aufgetragen. Erkennbar ist, daß beide ELISA's auf FV reagieren.

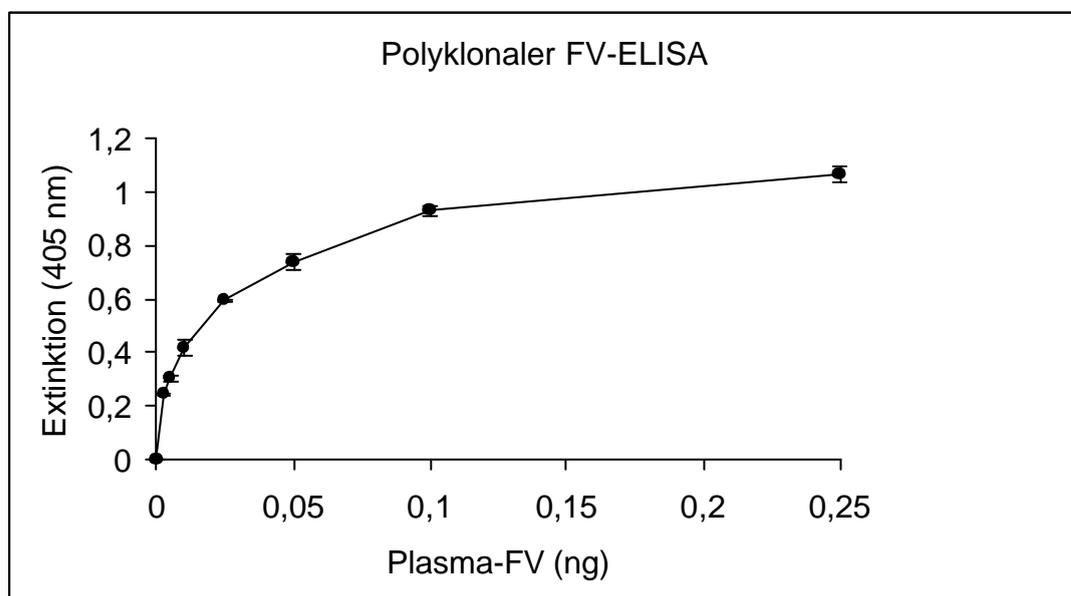


Abbildung 41: Eichkurve polyklonaler ELISA

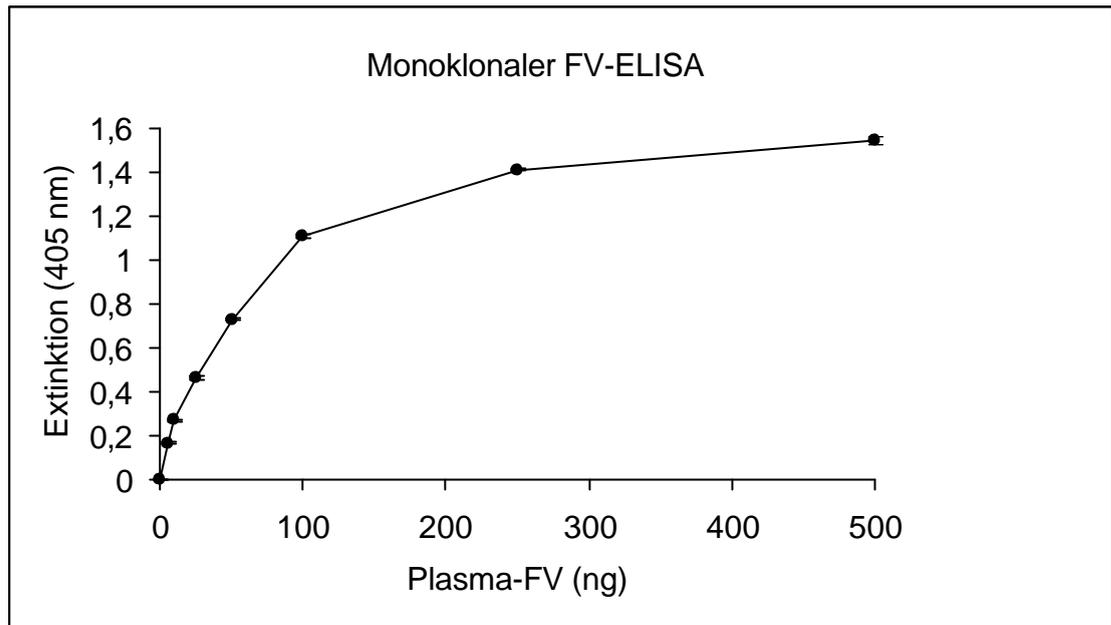


Abbildung 42: Eichkurve monoklonaler ELISA

Weder im Zellüberstand noch im Lysat von HepG₂-Zellen und EC konnte jedoch FV-Antigen nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte lagen unterhalb der Hintergrund-Extinktion.

4.14. Stimulierung der HepG₂-Zellen mit Zytokinen

Im nächsten Ansatz wurde FV-Aktivität bzw. FV-Antigen nach Stimulierung mit IL-6 und TNF- α beobachtet. Für den Versuchsansatz wurden konfluente Monolayer von HepG₂-Zellen verwendet, die mit 100 U/ml IL-6 und mit 20 ng/ml TNF- α 48 h bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen aufgearbeitet wie gewohnt. Parallel wurde ein Ansatz mit DMEM/FCS und ein zweiter Ansatz mit DMEM/SFM untersucht. Das Ergebnis ist in den nächsten Abbildungen 43 und 44 sowie in Tabelle 14 dargestellt.

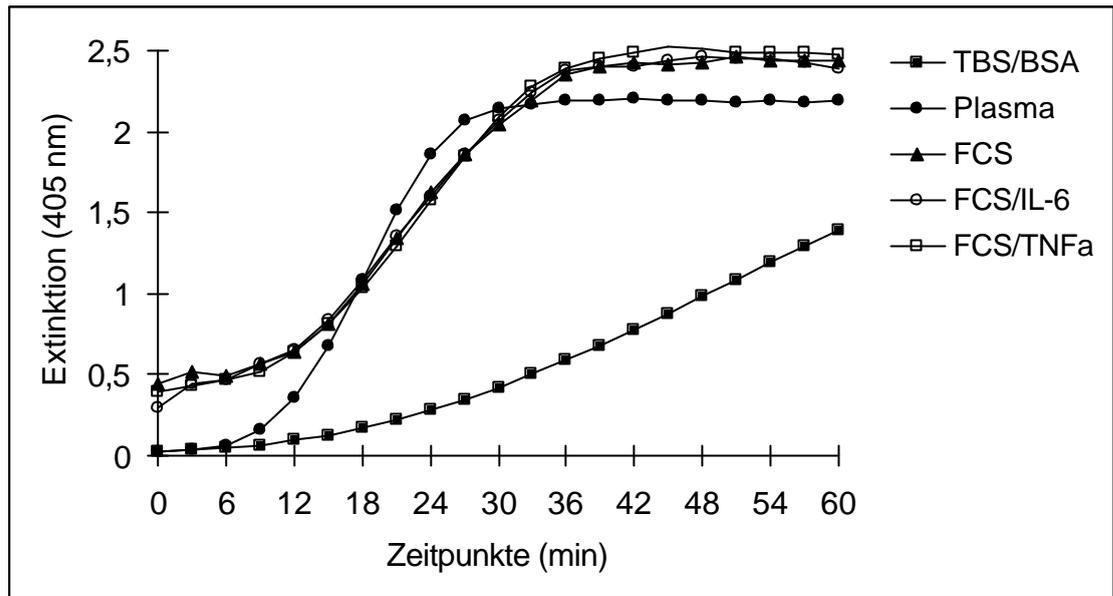


Abbildung 43: Aktivitätsbestimmung in HepG₂-Zelllysate (FCS)

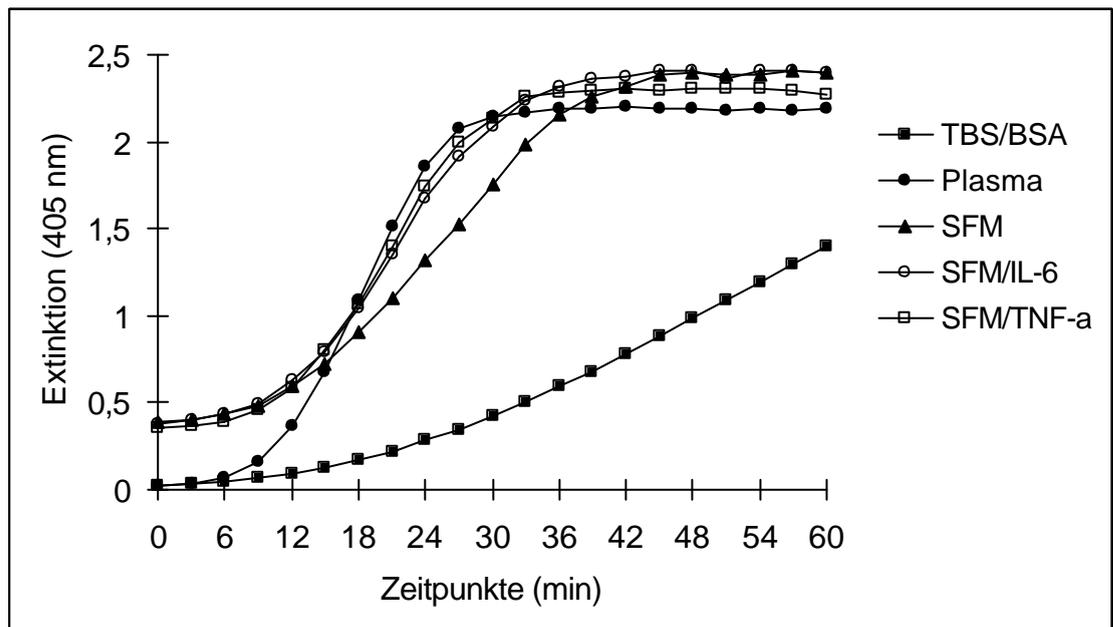
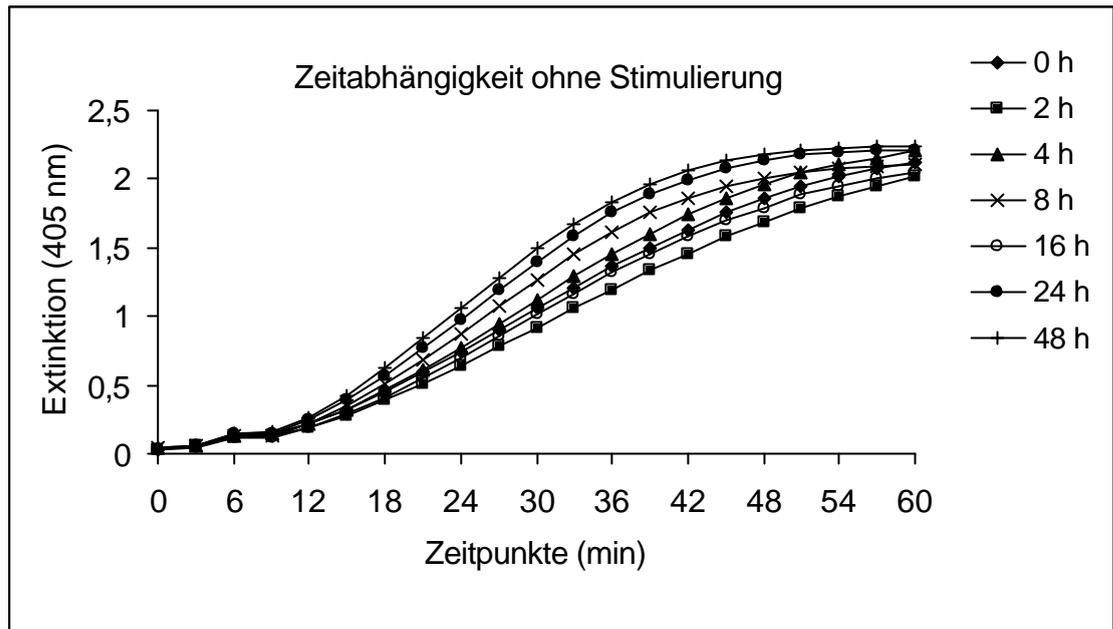
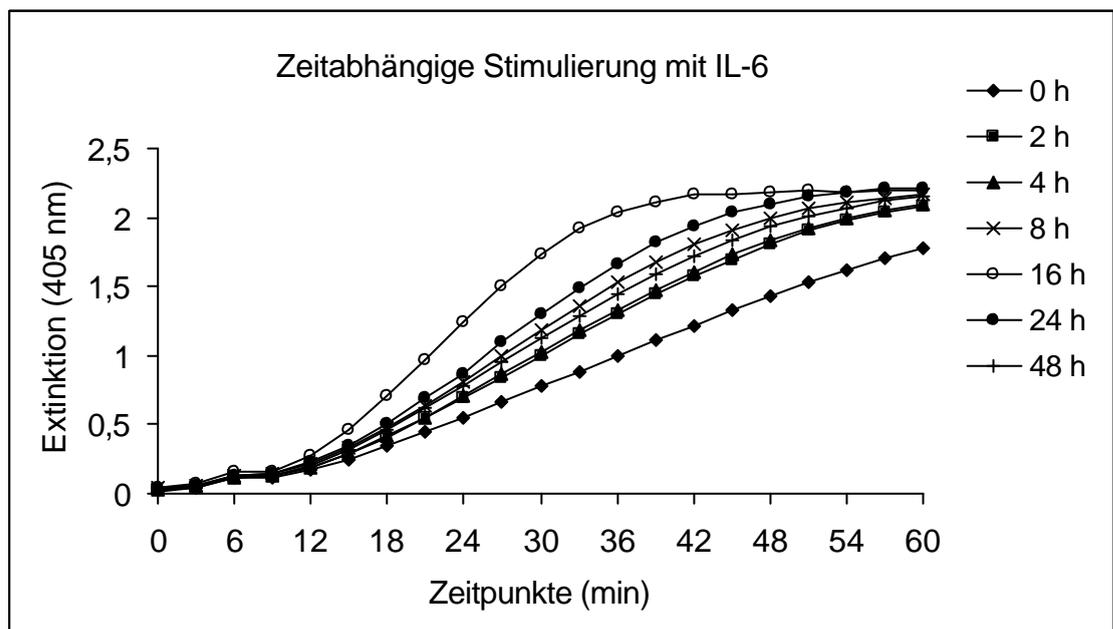


Abbildung 44: Aktivitätsbestimmung in HepG₂-Zelllysate (SFM)

Probe	Extinktion (405 nm)	FV (%)	absolut FV%
TBS/BSA	0,281	15	
Plasma	1,862	100	
HepG2-Zellen			
SFM	1,316	71	56
SFM/IL-6	1,669	90	75
SFM/TNF-a	1,738	93	78
HepG2-Zellen			
FCS	1,623	87	72
FCS/IL-6	1,596	86	71
FCS/TNF-a	1,576	85	70

Tabelle 14: Aktivitätsbestimmung in HepG₂-Zelllysate (FCS/SFM) in %

Im nachfolgenden polyklonalen sowie monoklonalen ELISA konnte wiederum kein FV-Antigen nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit und Konzentration der einzelnen Zytokine wurde zum einen eine Zeitabhängigkeit und zum anderen eine Konzentrationsabhängigkeit getestet. Für die Zeitabhängigkeit wurden konfluente Monolayer von HepG₂-Zellen verwendet. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h und 48 h wurden die Platten weiterbehandelt wie gewohnt. Zur Stimulation wurden IL-6 in einer Konzentration von 100 U/ml, TNF- α in einer Konzentration von 20 ng/ml und IL-8 in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt. Im HepG₂-Zelllysate ohne Stimulation wurde nach 48 h eine maximale Aktivität erreicht. Mit Stimulation von IL-6, TNF- α und IL-8 dagegen wurde schon nach 16 h Stimulation eine maximale Aktivität meßbar. Die folgenden Abbildungen 45-50 zeigen die Ergebnisse der Versuche.

Abbildung 45: Amidolytischer Test von HepG₂-Zelllysate ohne StimulierungAbbildung 46: Amidolytischer Test von HepG₂-Zelllysate mit Stimulierung durch IL-6

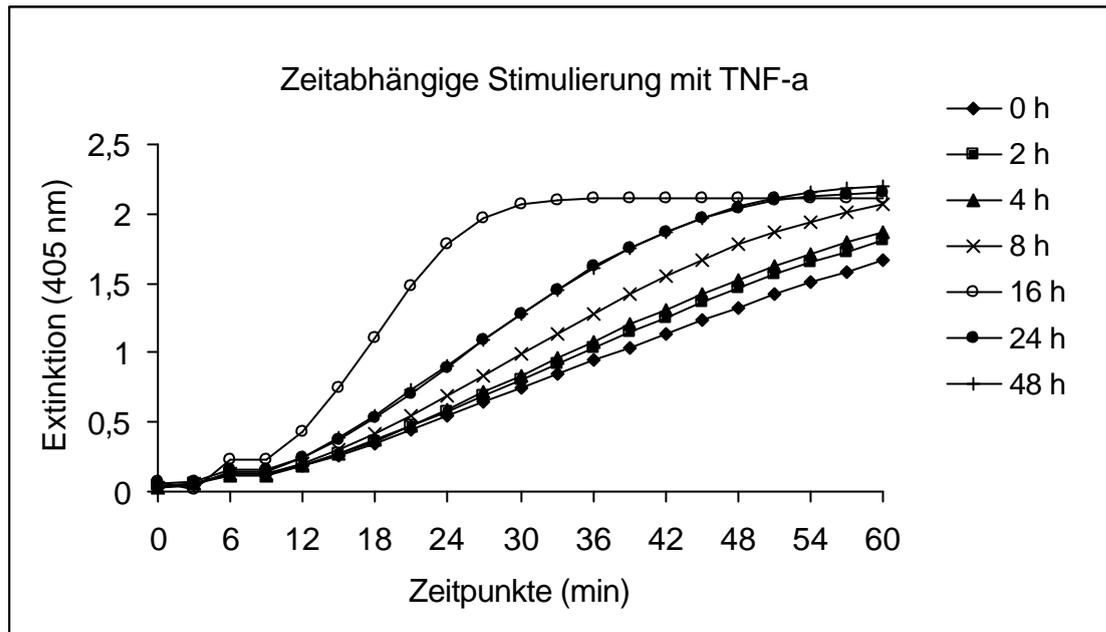


Abbildung 47: Amidolytischer Test von HepG₂-Zelllysate mit Stimulierung durch TNF- α

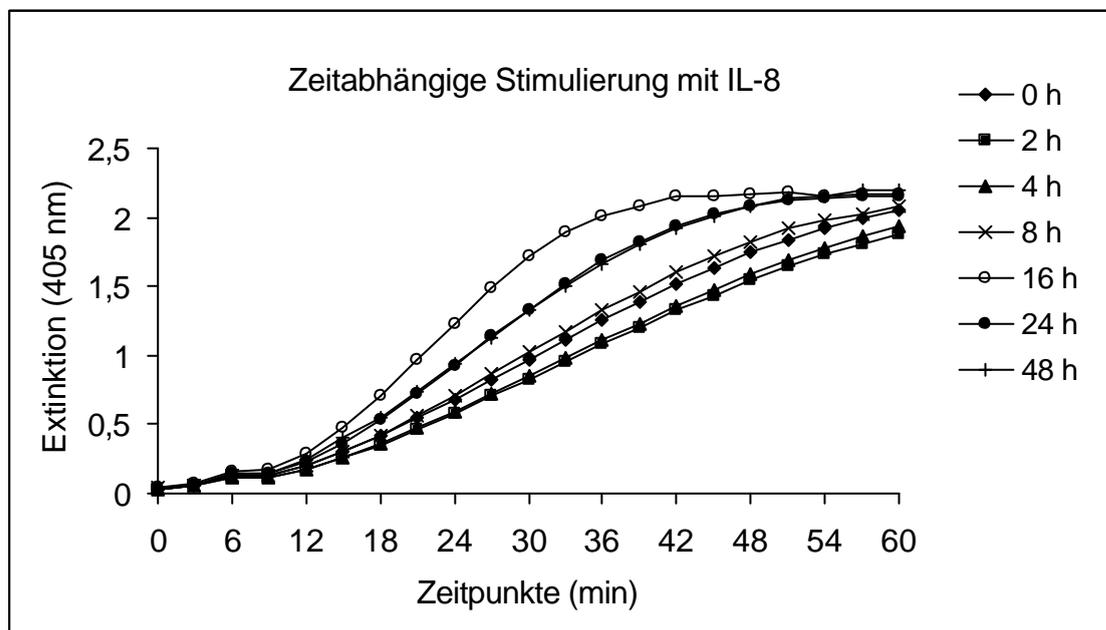
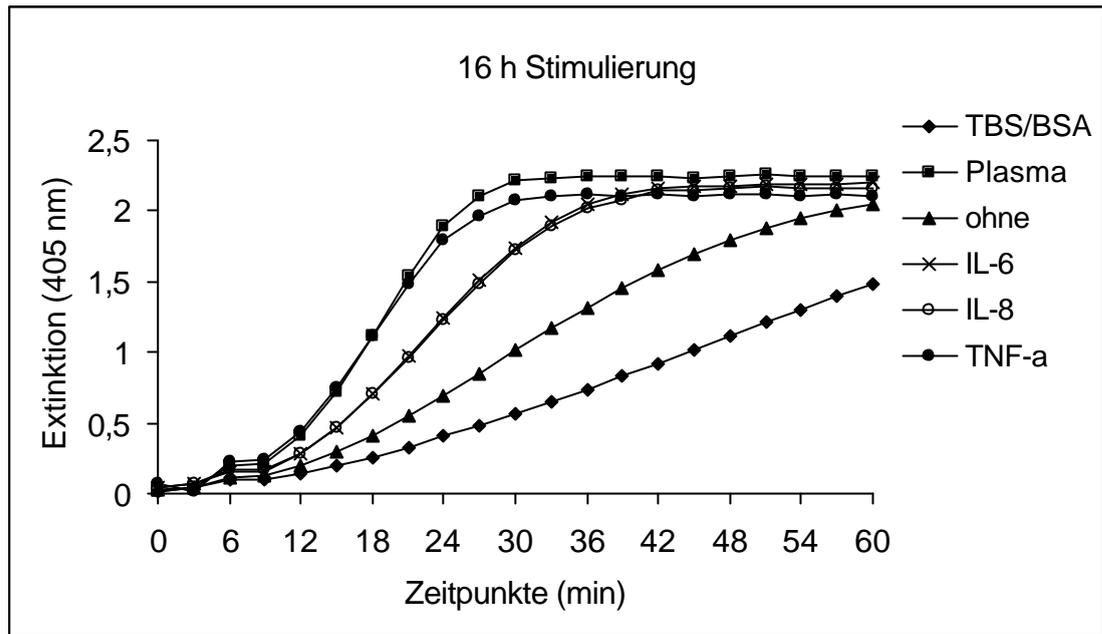
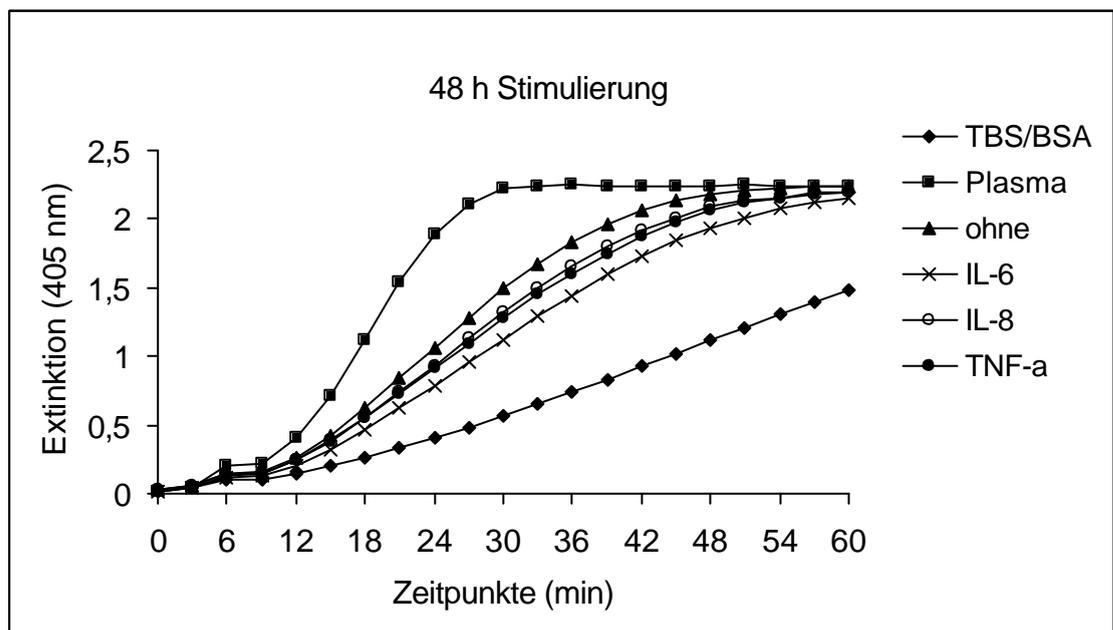


Abbildung 48: Amidolytischer Test von HepG₂-Zelllysate mit Stimulierung durch IL-8

Abbildung 49: Amidolytischer Test von HepG₂-Zelllysate zum Zeitpunkt 16 hAbbildung 50: Amidolytischer Test von HepG₂-Zelllysate zum Zeitpunkt 48 h

Im zweiten Versuchsansatz sollte nun die Konzentrationsabhängigkeit getestet werden. Dazu wurden die HepG₂-Zellen mit IL-6 stimuliert in Konzentrationen 20 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml, 200 U/ml und 300 U/ml sowie mit TNF- α in Konzentra-

tionen von 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml als auch IL-8 in Konzentrationen von 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml. Benutzt wurden 100er-Schalen mit einer Mediummenge von 5 ml. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug, anlehnend an den vorgehenden Zeitversuch, 16 h. Bei Stimulierung mit IL-6 wurde eine optimale Konzentration von 100 U/ml ermittelt. Für TNF- α lag die optimale Konzentration bei 5 oder 20 ng/ml und für IL-8 bei 20 ng/ml.

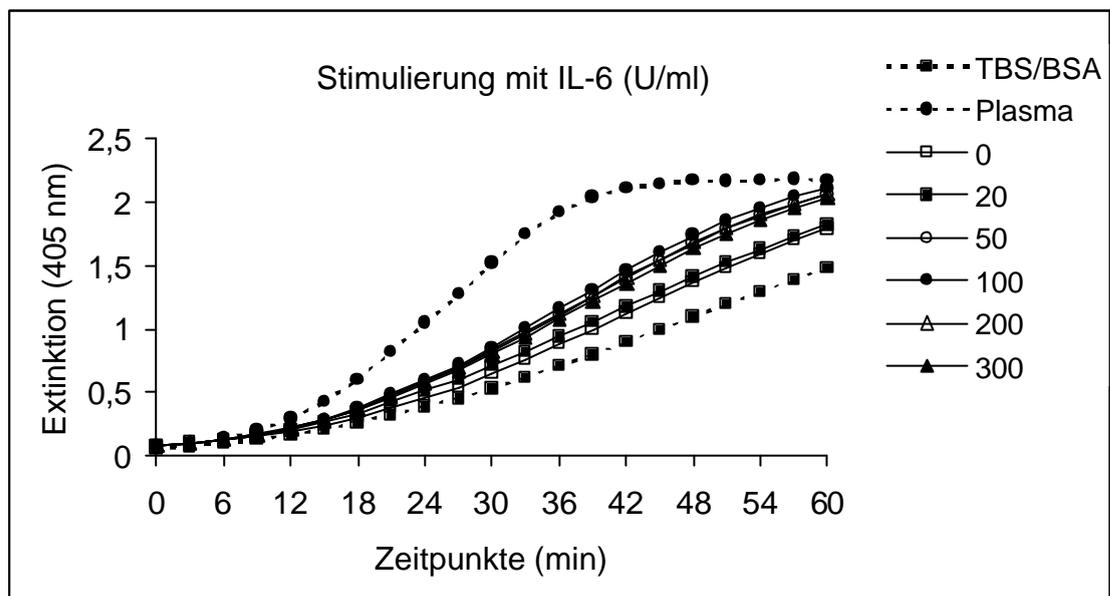


Abbildung 51: Konzentrationsabhängigkeit von IL-6

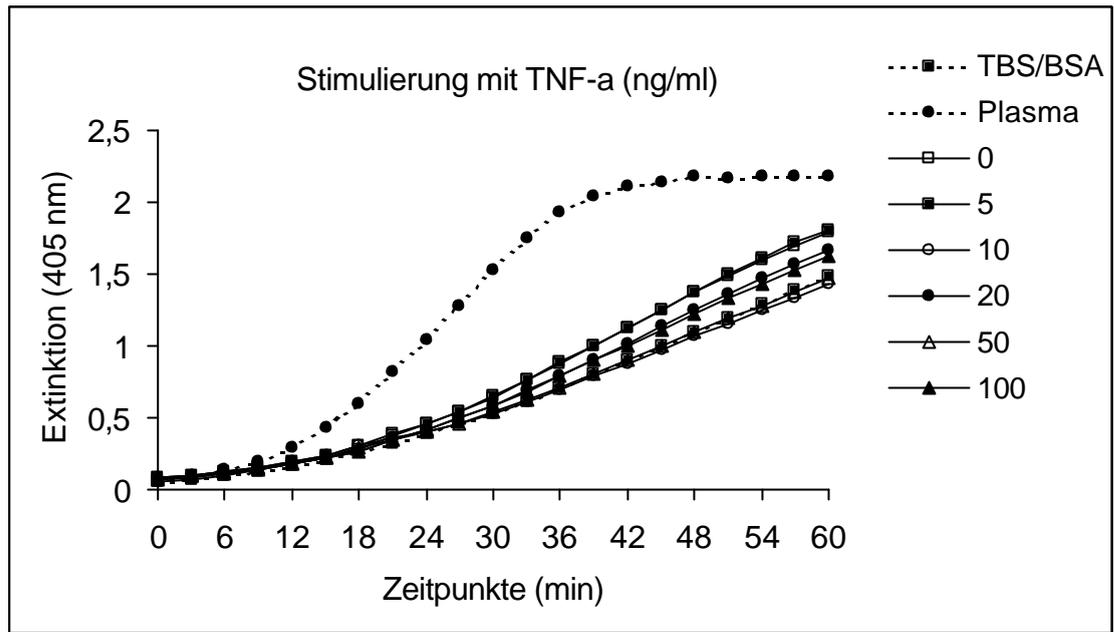


Abbildung 52: Konzentrationsabhängigkeit von TNF- α

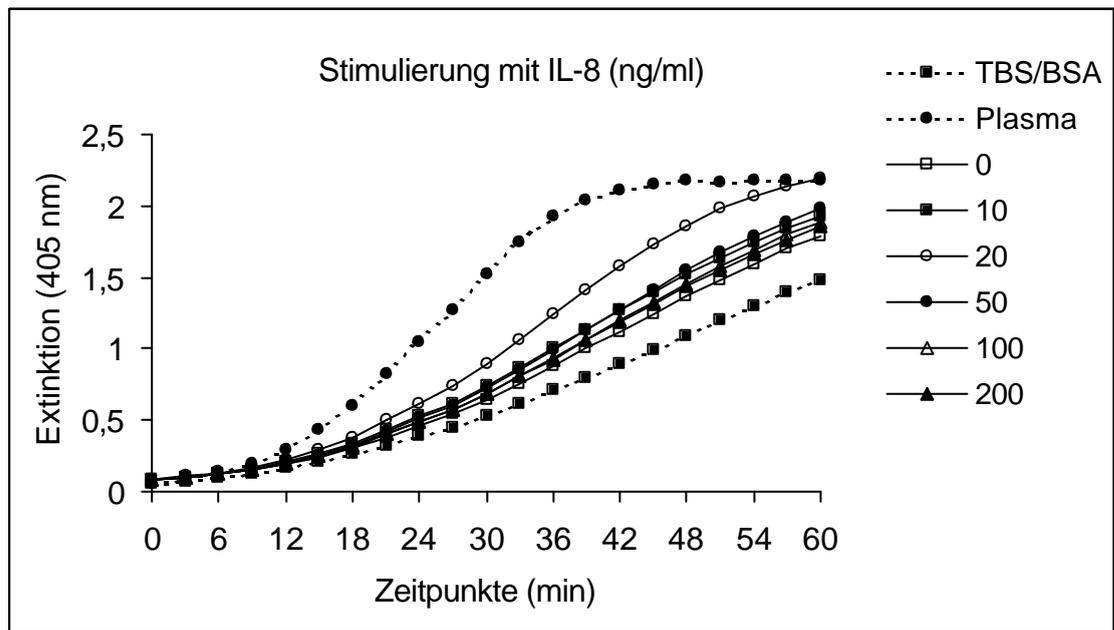


Abbildung 53: Konzentrationsabhängigkeit von IL-8

Als weiteres Zytokin wurde IL-4 getestet. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde eine Zeit- und eine Konzentrationsabhängigkeit gemessen. Die

Zeitabhängigkeit wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Ermittelt wurde eine optimale Inkubationszeit von 48 h.

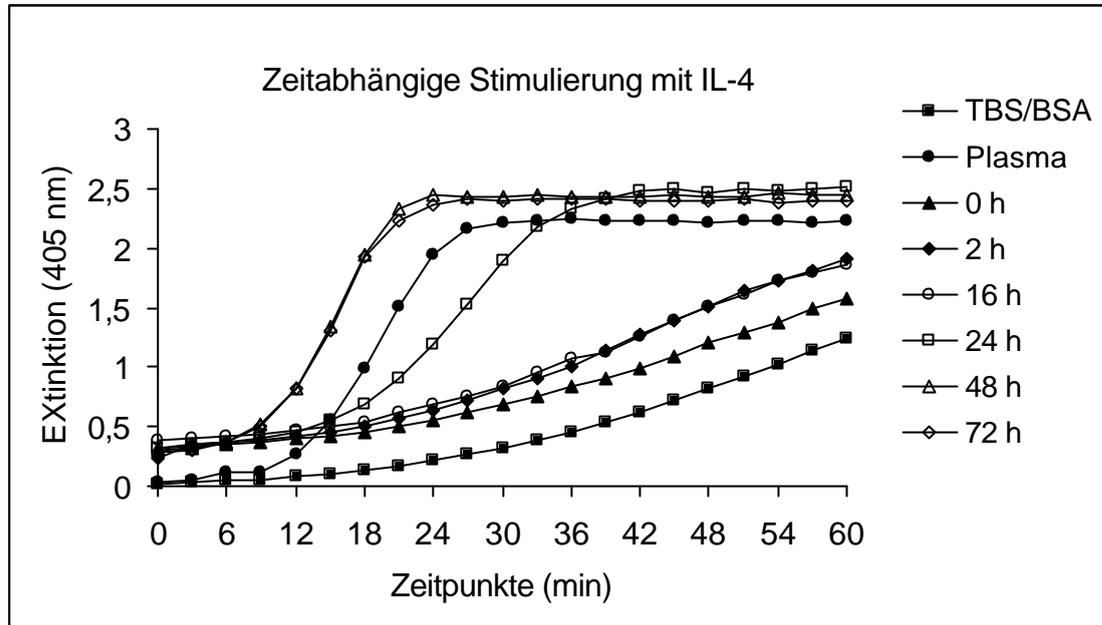


Abbildung 54: Zeitabhängigkeit von IL-4

Die Konzentrationsabhängigkeit wurde in den Konzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml durchgeführt. Ausgehend von den vorherigen Versuchen, wurde 48 h im Brutschrank inkubiert. Es wurde eine optimale Konzentration von 10 ng/ml IL-4 bestimmt.

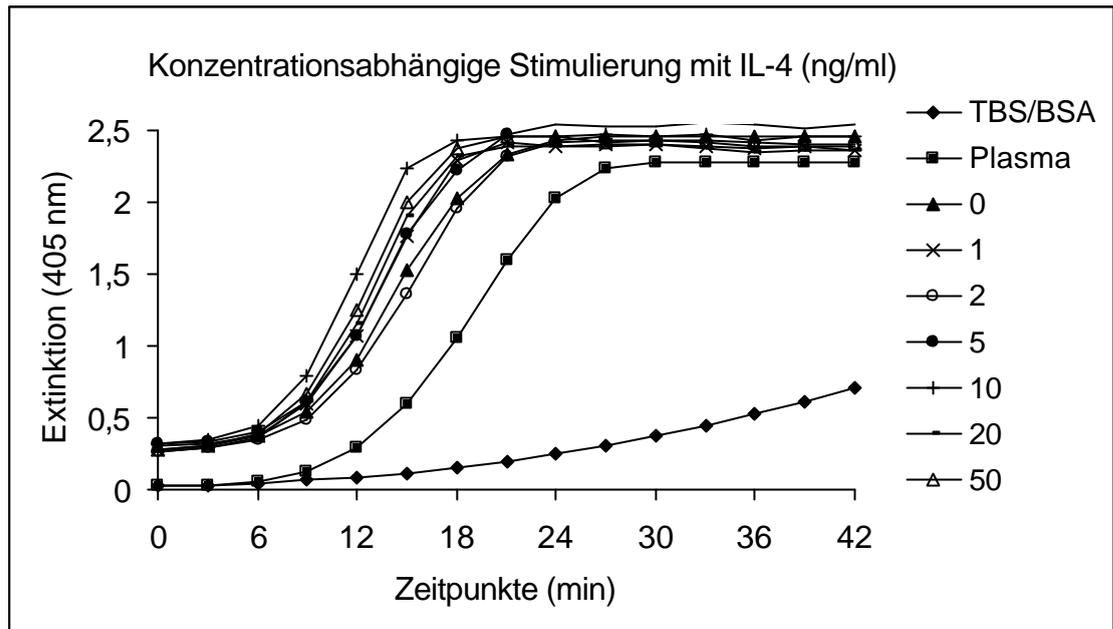


Abbildung 55: Konzentrationsabhängigkeit von IL-4

Im gleichen Versuchsansatz wurde überprüft, ob sich durch gleichzeitiges Stimulieren von 2 oder mehreren Zytokinen eine erhöhte Stimulationsrate zu erzielen ist. In den Kombinationen IL-4/IL-8 und IL-4/TNF- α wurde eine signifikante Aktivitätssteigerung beobachtet. Mäßig war die Steigerung in den Kombinationen IL-4/IL-6 und IL-8/TNF- α . Keine Aktivitätssteigerung wurde mit den Kombinationen IL-6/IL-8 und IL-6/TNF- α erreicht. Mit Kombination aller vier Zytokine konnte die höchste Aktivität gemessen werden.

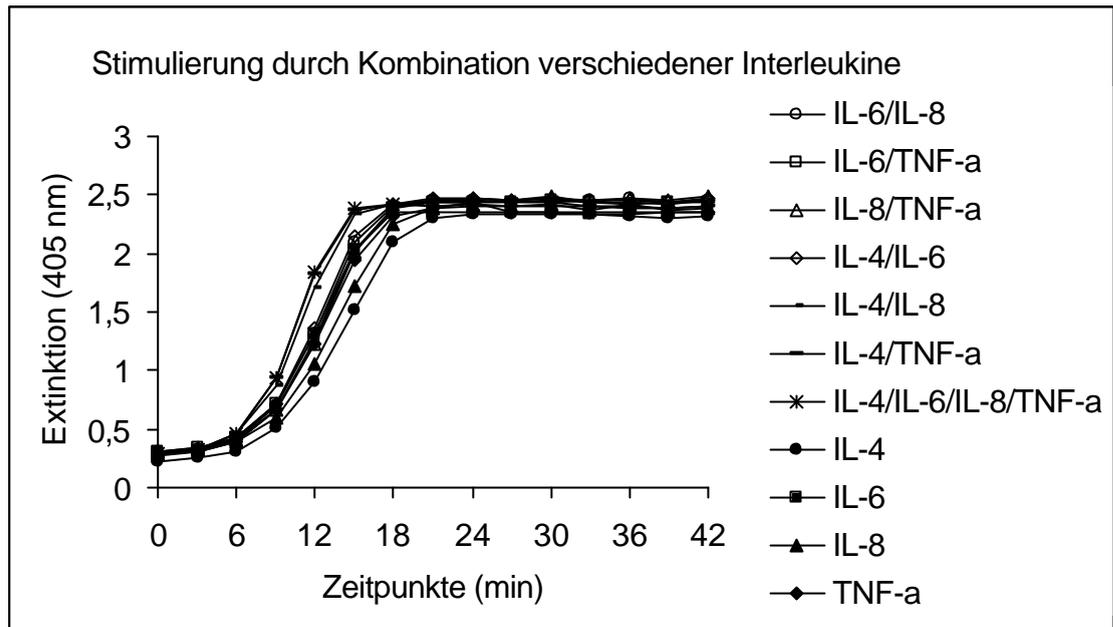


Abbildung 56: Stimulation mit zwei oder mehr Zytokinen

4.15. Hemmung der Faktor-Va-Kofaktoraktivität durch einen polyklonalen Antikörper gegen Faktor-V

In einem weiterführenden Experiment sollte die FV-Kofaktoraktivität im amidolytischen Ansatz mit einem polyklonalen Antikörper gegen FV inhibiert werden. Dafür wurden drei verschiedene Ansätze mit jeweils 3 Konzentrationen an Antikörpern verwendet. Erster Ansatz: Pufferkontrolle. Zweiter Ansatz: Plasma. Dritter Ansatz: HepG₂-Zelllysate. Die Konzentration des polyklonalen Antikörpers betrug in den Versuchsansätzen 3 µg/ml, 30 µg/ml und 150 µg/ml.

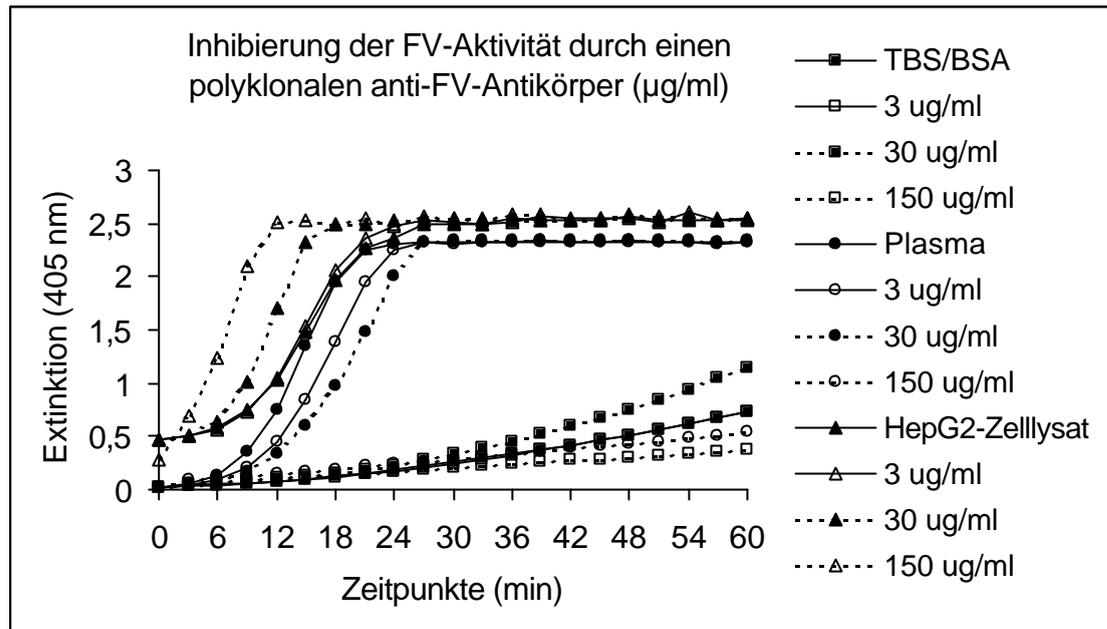


Abbildung 57: Hemmung der FVa-Kofaktoraktivität durch einen polyklonalen anti-FV-AK

Mit einer Antikörperkonzentration von $150 \mu\text{g/ml}$ ist in der Plasmaprobe die FV-Kofaktoraktivität komplett inhibiert. Im HepG₂-Zelllysate dagegen kommt es mit steigender AK-Konzentration zu einer verstärkten Aktivitätsmessung. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt, daß es sich bei der Aktivitätsmessung von HepG₂-Zelllysate nicht um die Messung von FV-Aktivität handeln kann. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um eine Protease handelt, die FV-unabhängig zu einer FX-Aktivierung führt. Um zu sehen, ob es sich in diesem Fall um eine Verunreinigung handelt, wurden Platten von HepG₂-Zellen angefertigt und diese verschieden behandelt. Jeweils 4 Platten wurden in SFM und in FCS-haltigem Medium kultiviert. Die ersten Platten wurden 1 x mit HBS 1x gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die zweiten Platten wurden genauso behandelt. Die dritten Platten wurden 3 x mit HBS 1x gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die vierten Platten wurden mit Hilfe eines Schabers abgekratzt, in 5 ml HBS 1x aufgenommen und abzentrifugiert.

	1	2	Spalte	3	4	5	6
		Kontrollen	Proben				
A	TBS/BSA	HepG ₂ -Zelllysate	SFM 1 x gewaschen	SFM 1 x gewaschen	SFM 3 x gewaschen	SFM Abkrazmethode	
B	TBS/BSA	HepG ₂ -Zelllysate + Plasma	SFM 1 x gewaschen	SFM 1 x gewaschen	SFM 3 x gewaschen	SFM Abkrazmethode	
C	Plasma	TBS/BSA	0 % FCS	1 % FCS	2 % FCS	5 % FCS	
D	Plasma	TBS/BSA + Plasma	0 % FCS	1 % FCS	2 % FCS	5 % FCS	

		Spalte	7	8	9	10	11	12
		Proben						
A		HepG ₂ -Zelllysate	FCS 1 x gewaschen	FCS 1 x gewaschen	FCS 3 x gewaschen	FCS Abkrazmethode		
B		HepG ₂ -Zelllysate + Plasma	FCS 1 x gewaschen	FCS 1 x gewaschen	FCS 3 x gewaschen	FCS Abkrazmethode		
C		TBS/BSA	10 % FCS	20 % FCS	50 % FCS	100 % FCS		
D		TBS/BSA + Plasma	10 % FCS	20 % FCS	50 % FCS	100 % FCS		

Tabelle 15: Pipettierprotokoll des kinetischen Tests

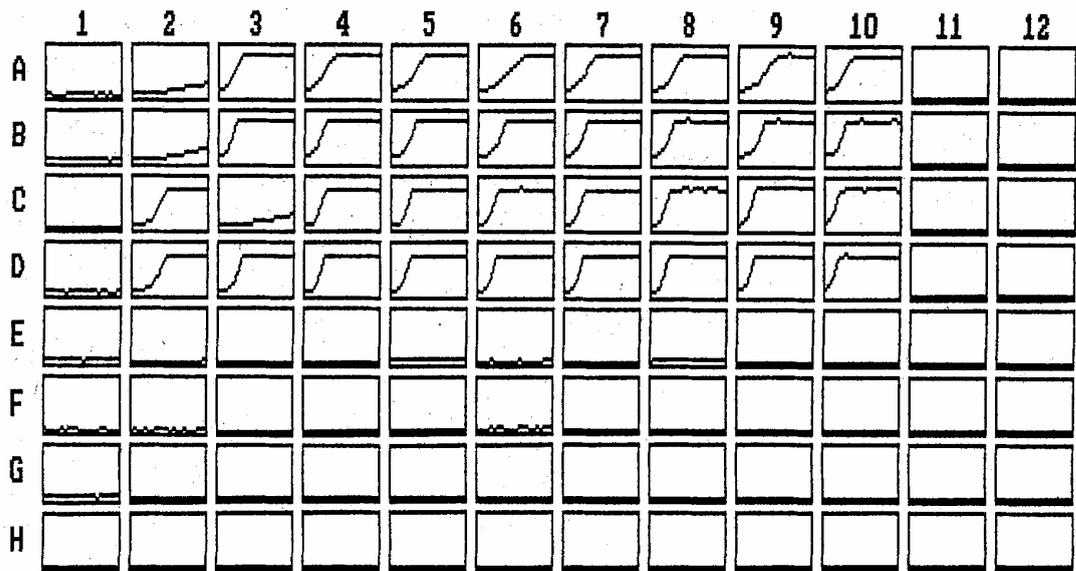


Abbildung 58: Kinetische Messung

Deutlich wird hier, daß im Zelllysate von HepG₂-Zellen, die in SFM gehalten wurden und mit dem Schaber abgekratzt worden sind eine deutliche Aktivität meßbar ist. Sie ist zwar noch gesteigert in der Zelllysateprobe, wo die Zellen in FCS gehalten wurden, was für eine gewisse FCS-Verunreinigung spricht, ist aber allein damit nicht zu erklären. Desweiteren ist erkennbar, daß schon eine Verunreinigung von 1 % FCS ausreicht eine FV-Aktivität vorzutäuschen.

4.16. Nachweis einer Phospholipid-unabhängigen Faktor-X-Aktivierung durch HepG₂-Zelllysate

In einem weiteren Experiment konnte festgestellt werden, daß es in der Probe mit HepG₂-Zelllysate zu einer PL-unabhängigen Aktivierung von FX kommt.

	Ansatz	Probe (μl)	S 2238 (μl)	PT (μl)	PL (μl)	FXa (μl)	Puffer (μl)	CaCl ₂ (μl)
1								
2	Probe + S 2238 + PT/PL + FXa/CaCl ₂	50	50	15	10	25	30	20
3	Probe + S 2238	50	50				100	
4	Probe + S 2238 + PT	50	50	15			85	
5	Probe + S 2238 + PL	50	50		10		90	
6	Probe + S 2238 + PT/PL	50	50	15	10		75	
7	Probe + S 2238 + FXa	50	50			25	75	
8	Probe + S 2238 + CaCl ₂	50	50				80	20
9	Probe + S 2238 + FXa/CaCl ₂	50	50			25	55	20
10	Probe + S 2238 + PL + FXa/CaCl ₂	50	50		10	25	45	20
11	Probe + S 2238 + PT + FXa/CaCl ₂	50	50	15		25	40	20
12								

Tabelle 16: Pipettierprotokoll des kinetischen Tests

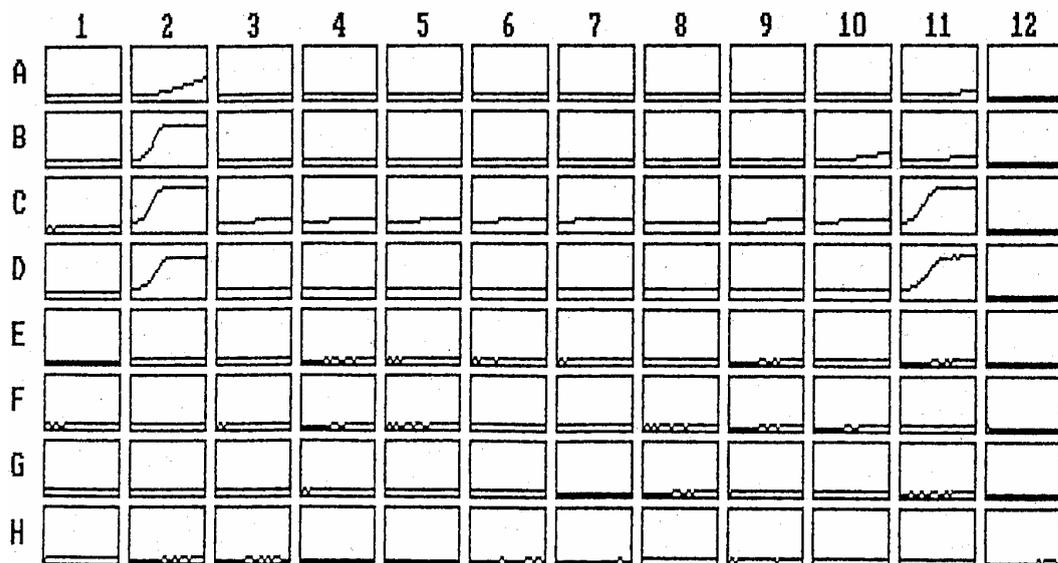


Abbildung 59: Kinetische Messung

4.17. Zellversuche mit weiteren Leberzellen

Um zu sehen, ob es sich hierbei um eine Besonderheit der HepG₂-Zellen handelt, wurden noch drei weitere Leberzelllinien auf dieses Phänomen hin untersucht. Zur Anwendung kamen SK-1-Zellen, CL-48-Zellen und CCL-13-Zellen. Die Zellen wurden nach Anleitung kultiviert und für einen vergleichenden amidolytischen Ansatz genauso behandelt wie die HepG₂-Zellen und die EC. In Abbildung 60 ist erkennbar, daß es sich hierbei wahrscheinlich um eine Besonderheit der HepG₂-Zellen handelt. Die Aktivität ist in den drei weiteren getesteten Leberzellen sehr viel niedriger als im HepG₂-Zelllysate.

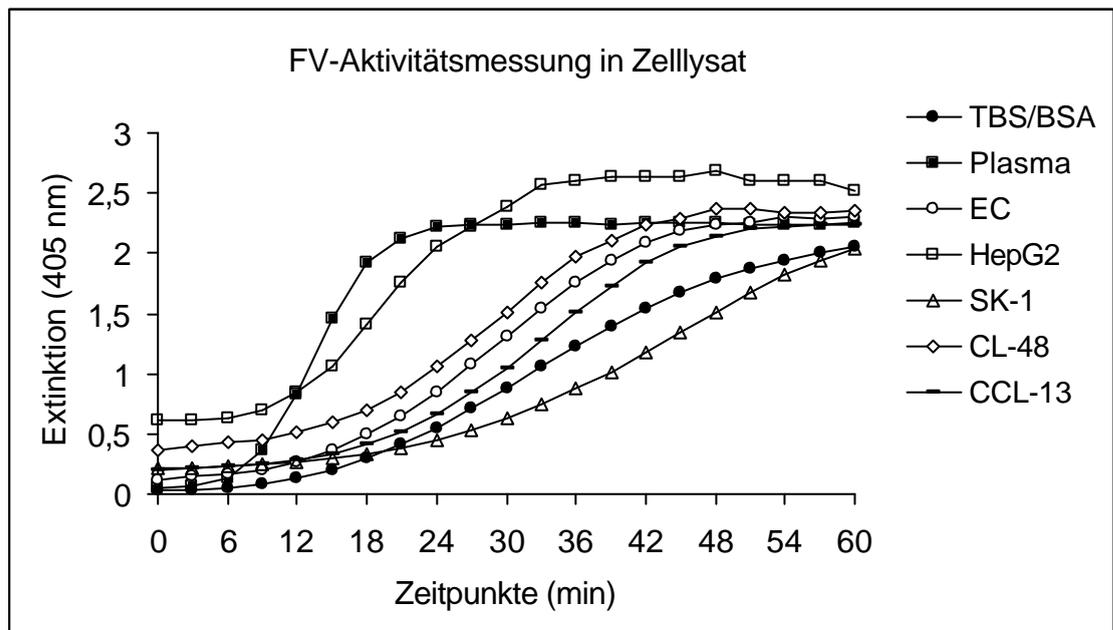


Abbildung 60: Austesten von SK-1-, CL-48- und CCL-13-Zellen

5. Diskussion

Das Krankheitsbild der APC-Resistenz ist durch eine verminderte antikoagulatorische Antwort von APC gekennzeichnet ist mit 30-40 % die bisher häufigste Ursache von Thrombosen (Svenson und Dahlbäck; 1994). Dennoch werden nicht alle Patienten, die genotypisch APC-resistent sind auch phänotypisch auffällig. In der vorliegenden Arbeit sollten der Einfluß der FV^{R506Q}-Konzentration auf die APC-Sensitivität untersucht sowie denkbare kausale Therapieansätze aufgezeigt werden. Denkbare Ansätze waren die Verringerung des Gesamt-FV-Plasmaspiegels oder eine selektive Verminderung der FV^{R506Q}-Konzentration sowie die Kombination beider Ansätze. Da nicht bei allen Patienten, die phänotypisch APC-resistent sind, eine Mutation im FV-Genom nachgewiesen werden kann, müssen weitere Ursachen existieren, die einen solchen Phänotyp hervorbringen. Andere theoretische Möglichkeiten, die eine APC-Resistenz bedingen können sind Autoantikörper gegen PC, anti-Phospholipidantikörper, die die Funktion von APC behindern, eine mutierte Serinprotease, die als APC-Inhibitor wirkt, PS-Mangel, ein bisher unbekannter Kofaktor für APC oder Mutationen im FV- oder FVIII-Genom. Zunächst wurde angenommen, daß es sich bei dem Krankheitsbild um eine Abnormalität im FVIII-Molekül handelt (Dahlbäck und Carlson; 1991). Diese Theorie wurde 1993 von Dahlbäck et al. widerrufen. Die Beobachtung, daß die APC-Resistenz durch Zugabe von aufgereinigtem FV korrigiert wurde, ließ die Schlußfolgerung einer Kofaktoraktivität von FV für APC zu. Als Ursache dieser Beobachtung mutmaßte Dahlbäck 1994, daß durch die FV-bedingte Kofaktoraktivität die APC-katalysierte FVIII-Inaktivierung erhöht wird. Eine eventuelle kompetitive Hemmung von mutiertem FV durch FV^{wt} ist eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diesen Sachverhalt. Dahlbäck und Hildebrand propagierten noch im gleichen Jahr, daß die antikoagulatorische Funktionsstörung im FV-Molekül selbst zu finden sei. Von Bertina et al. wurde dies bestätigt. Demnach handelt es sich um eine Punktmutation im FV-Gen, wobei die Aminosäure Arg⁵⁰⁶ an der Posi-

tion 1691 gegen Glu ausgetauscht ist. Die FV^{R506Q}-Mutation kommt in der kaukasischen Gesamtbevölkerung mit einer Häufigkeit von 1-15 % vor und ist in anderen Rassen nur gering bis gar nicht nachzuweisen (Dahlbäck; 1997/Svenson und Dahlbäck; 1994/Fujimura et al.; 1995). Es müssen demnach weitere Ursachen für das Krankheitsbild der APC-Resistenz existieren. Bei symptomatischen homozygoten Merkmalsträgern sowie bei mehrfach symptomatischen heterozygoten Merkmalsträgern wird heute therapeutisch eine lebenslange Antikoagulation durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß der FV^{R506Q}-Konzentration auf die APC-Sensitivität untersucht werden und kausale Ansätze einer anderen Therapie der APC-Resistenz aufzeigen. Mögliche Therapieansätze bestehen in einer Verringerung der FV-Gesamtkonzentration, mit der die mangelnde antikoagulatorische Aktivität ausgeglichen werden könnte oder einer selektiven Verminderung der FV^{R506Q}-Konzentration oder in einer Kombination beider Ansätze. Denkbar wäre auch eine alternative Inaktivierung von FVa oder die Inhibierung der Aktivierung von FV schon im Vorfeld.

Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu überprüfen, wurden praktisch durchführbare Testverfahren benötigt. Dazu dienten zwei Formen der Aktivitätsmessung. Zum einen der handelsübliche APC-R-Coatest^R (modifizierte aPTT-Messung) der Firma Chromogenix und zum anderen ein von Pötzsch et al. entwickelter kinetischer Test. Das Ergebnis wird einmal als Sensitivitäts-Ratio (normal > 2) und einmal als FVa-Restaktivität (normal < 40 %) angegeben. Für den kinetischen Test wird aufgereinigtes APC benötigt. Dazu wurde zunächst rekombinantes PC aus der Zelllinie HU 293 (transfektierte humane Nierenzelllinie) isoliert. Das rekombinante PC hat gegenüber einem aus humanem Plasma isoliertem den Vorteil, daß es absolut frei von Kontaminationen mit anderen Gerinnungsfaktoren ist. In Form eines ELISA's sowie einer sensitiven Silberfärbung und eines Western-Blot's wurde das PC anschließend nachgewiesen. Die Aktivierung von PC erfolgte durch den Schlangengiftaktivator Protac. APC-resistente Plasmen zeigen normale Mengen an prokoagulatorisch wirksamer FV-Aktivität, zeigen jedoch keine antikoagulatorische Funktion nach Zugabe

von APC (Zöller und Dahlbäck; 1994). Durch Verringerung der FV-Gesamtkonzentration könnte die mangelnde antikoagulatorische Aktivität ausgeglichen werden. Eine Absenkung der FV-Gesamtkonzentration auf Werte zwischen 5 und 10 % wäre auch in vivo denkbar, da das Krankheitsbild des FV-Mangels Plasma-FV-Konzentrationen in diesem Bereich mit nur milder Blutungstendenz toleriert (Owren und Cooper; 1955). Für den folgenden Versuchsansatz wurden zum Vergleich Plasma eines gesunden Spenders und Plasma eines Spenders, der für die APC-Resistenz als homozygot verifiziert wurde, benutzt und diese mit einem handelsüblichen FV-Mangelplasma der Firma Behring ausverdünnt.

Wie verhalten sich aPTT und APC/aPTT in sec bzw. die APC-Sensitivitäts-Ratio, wenn die Faktor-V-Gesamtkonzentration verringert wird ?

Aus den Versuchsergebnissen wird ersichtlich, daß die aPTT in sec bei beiden Plasmen mit der FV-Konzentration korrelierte. Der FV^{R506Q}-Typ zeigt im Vergleich zum FV^{wt} wie erwartet eine deutlich verkürzte APC/aPTT in sec. Beide Proben verhalten sich aber gleichsinnig mit abnehmender FV-Gesamtkonzentration. In einem Bereich zwischen 10 und 20 % FV^{R506Q}-Gesamtkonzentration entspricht der APC/aPTT-Wert in sec dem der Normalprobe bei 100 % FV^{wt}-Konzentration. Nach Berechnung der Sensitivitäts-Ratio wurde deutlich, daß dieser Wert selbst in einem Konzentrationsbereich von weniger als 20 % FV pathologisch bleibt. Das bedeutet, daß das Versuchsergebnis ausgedrückt als Sensitivitäts-Ratio nicht aussagekräftig genug ist. Wichtiger ist die Normalisierung der APC/aPTT in sec in einem Bereich zwischen 10 und 20 % FV-Gesamtkonzentration. Den Untersuchungen zufolge würde sich die klinische Situation der Patienten durch eine Verringerung der FV-Gesamtkonzentration unter 20 % und damit durch eine Veränderung des Phänotyps tatsächlich verbessern.

Wie verhält sich die Faktor-Va-Restaktivität, wenn die Faktor-V-Gesamtkonzentration verringert wird ?

Die Umsetzung des gleichen Testansatzes auf den kinetischen Test scheiterte an der Bedingung, daß für verwertbare Ergebnisse eine FV-Mindestkonzentration von 60 % erforderlich ist, um das Testprinzip erfüllen zu können. Das Prinzip des kinetischen Tests basiert auf der Messung der Kofaktoraktivität von FVa, welcher zusammen mit FXa PT zu T umsetzt. Die T Umsetzung wird über ein chromogenes Substrat gemessen. Als FVa-Restaktivität wird der Differenzwert zwischen keinem APC-Zusatz und APC-Zugabe angegeben. Nimmt nun die FV-Gesamtkonzentration ab, so erschwert sich die Inaktivierung von FVa durch APC und die Extinktion bleibt hoch. Vermindert sich die FV-Konzentration unter 60% der Ursprungskonzentration, erschwert sich die Inaktivierung von FVa durch APC. Demnach bleibt die Extinktion höher als erwünscht

Im zweiten Schritt der Untersuchungen wurde die Qualität von FV (Verhältnis zwischen FV^{wt} und FV^{R506Q}) verändert. Dazu wurde das Plasma des gesunden Spenders mit homozygotem Plasma auf abnehmende Konzentrationen FV^{wt} eingestellt.

Wie verhalten sich aPTT und APC/aPTT in sec bzw. die APC-Sensitivitäts-Ratio, wenn der Anteil an mutiertem Faktor-V verändert wird ?

Aus den Versuchsergebnissen wird deutlich, daß wie erwartet mit abnehmendem FV^{wt} bzw. zunehmendem FV^{R506Q} keine wesentliche Differenz der aPTT's in sec zu erkennen ist. Im gleichen Verlauf zeigt sich eine kontinuierliche Verkürzung der APC/aPTT in sec. Erst in einem Bereich von 60-80 % FV^{wt} -Gehalt normalisiert sich die Sensitivitäts-Ratio und liegt über 2. Das bedeutet, daß eine Verringerung des FV^{R506Q} -Anteils zwischen 20 und 40 % ausreicht, eine phänotypische Besserung der APC-Resistenz zu erzielen.

Wie verhält sich die Faktor-Va-Restaktivität, wenn der Anteil an mutiertem Faktor-V verändert wird?

Im amidolytischen Testansatz wird ein vergleichbares Ergebnis erzielt, wobei eine FVa-Restaktivität von unter 40 % erst bei 60-80 % FV^{wt} -Gehalt zu verzeichnen ist.

Um parallel Quantität und Qualität von FV zu verändern wurden mit Plasma eines gesunden Spenders und Plasma eines homozygoten Spenders verschiedene Mischungsverhältnisse von FV^{wt} zu FV^{R506Q} hergestellt und diese mit FV-Mangelplasma ausverdünnt.

Wie verhalten sich aPTT und APC/aPTT in sec bzw. die APC-Sensitivitäts-Ratio, wenn gleichzeitig Quantität und Qualität von Faktor-V verändert werden ?

Wenn parallel Quantität und Qualität von FV verändert werden, so muß man den Versuchsergebnissen dieser Arbeit zufolge für eine normale APC-Sensitivitäts-Ratio von über 2 eine FV-Konzentration von unter 60 % und einen FV^{wt}-Gehalt von 80 % fordern.

Wie verhält sich die Faktor-Va-Restaktivität, wenn gleichzeitig Quantität und Qualität von Faktor-V verändert werden ?

Der amidolytische Ansatz wurde nicht durchgeführt, da in den vorangehenden Versuchen gezeigt werden konnte, daß für verwertbare Ergebnisse im kinetischen Test eine Mindestkonzentration von 60 % FV erforderlich ist.

Um die Regulationsmechanismen der FV-Synthese auf Proteinebene besser verstehen zu können, sollten diese anschließend anhand von Zellkulturtechniken untersucht werden. Benutzt wurden für diese Zwecke HepG₂-Zellen (humane Leberkarzinomzelllinie), die laut Wilson et al. in der Lage sind FV zu synthetisieren und diesen an den Zellüberstand abgeben. Als Negativ-Kontroll-Zelllinie wurden EC benutzt, wobei sich verschiedene Autoren bezüglich der FV-Synthesefähigkeit von EC widersprechen. Cervený et al. konnten FV im Kulturüberstand von EC aus boviner Aorta nachweisen, nicht jedoch in Zelllysaten. Die Versuche von Giddings 1986 konnten dies nicht verifizieren. Annamalai stellte 1986 schließlich die Hypothese auf, daß EC zwar FV synthetisieren, diesen aber nicht aus der Zelle ausschleusen. Als Nachweisverfahren zur FV-Bestimmung dienten der von Pötzsch et al. entwickelte amidolytische Test und ein polyklonaler sowie ein monoklonaler ELISA. Beide ELISA's wurden zu diesem Zwecke eigens entwickelt. Im ersten Schritt der Untersuchungen wurde der Zellüberstand auf FV-Aktivität untersucht. Mit den zur Verfügung stehenden

Nachweisverfahren konnte im Zellüberstand von HepG₂-Zellen weder FV-Aktivität noch FV-Antigen nachgewiesen werden. Die Stabilität von FV im Zellüberstand konnte durch entsprechende Versuche bestätigt werden. Im nächsten Schritt wurde das Zelllysate von HepG₂-Zellen untersucht. Hierbei konnte im amidolytischen Testverfahren Aktivität nachgewiesen werden. In Diskrepanz dazu stand das Ergebnis der beiden ELISA's, in denen keine signifikante FV-Antigen-Menge nachgewiesen werden konnte. Bei einer Sensitivität des polyklonalen ELISA's von 5 pg FV und des monoklonalen ELISA's von 5 ng FV sollte ein Nachweis möglich sein, wenn HepG₂-Zellen laut Wilson et al. 5 ng FV/Va pro Stunde und 10⁶ Zellen produzieren. In Übereinstimmung mit Annamalai wurde im Test auch für EC Aktivität nachgewiesen, die sich nach Zentrifugation des Zelllysats und wiederholter Messung drastisch reduzierte. Das könnte bedeuten, daß FV zwar synthetisiert wird, jedoch nicht an den Überstand abgegeben wird, sondern zellgebunden vorliegt. Um zu überprüfen, ob und wie sich die FV-Produktion beeinflussen läßt, wurden die Zellen mit Zytokinen stimuliert. Interessant war, ob sich die FV-Synthese durch Zytokinbehandlung herunterregulieren läßt. Eine solche Zytokinbehandlung könnte zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Situation der Patienten durch Normalisierung der APC/aPTT führen. Wichtig war in diesem Zusammenhang die Regulation von Akute Phase Proteinen durch Zytokine. Als wichtigster Vertreter der Stimulierung gilt IL-6. Nach Castell et al. steigert IL-6 die Synthese von CRP, Serumamyloid A, Fibrinogen, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin und Haptoglobin. Gesenkt wird die Produktion von Albumin, Transferrin und Fibronectin. Die dosisabhängige Stimulierung der Fibrinogen-Produktion durch IL-6 wurde auch von Amrani 1990 in primären Hühner-Hepatozyten bestätigt. IL-6 reguliert die FXII-Produktion in HepG₂-Zellen bis zu 75 % herunter (Citarella et al.; 1997). Niesen et al. konnten 1997 zeigen, daß die Synthese von AT durch eine IL-6-Behandlung verringert wird. Einen additiven Effekt sieht man durch die Kombination von IL-6 und IL-1. Schon 1990 konnte gezeigt werden, daß IL-6 ein negativer Regulator für den Proteinase-Inhibitor α_1 -Inhibitor III bedeutet (Abraham et al.; 1990). Eine weitere wichtige Beobachtung machte Weissbach 1984. Er

konnte zeigen, daß die FV-Konzentration im Blut von Kindern, die eine Sepsis durchmachen, stark vermindert ist.

Im Rahmen der HepG₂-Stimulierungsversuche konnte mit IL-6 eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der Aktivität mit einem Maximum nach 16 h Stimulierung und mit einer optimalen Konzentration von 100 U/ml IL-6 beobachtet werden. TNF- α ist ein weiterer wichtiger Regulator der Akute-Phase-Protein-Produktion. So konnte gezeigt werden, daß die totale Proteinsynthese und die Synthese des Anti-Akute-Phase-Proteins Albumin in murinen Hepatozyten sowohl in vivo als auch in vitro durch TNF- α gesenkt wird. Im Verhältnis dazu kommt es zu einer Steigerung der Produktion von Akute Phase Proteinen, wobei CRP als bekanntester Vertreter gemessen wurde (Bankey et al.; 1990). Auch durch TNF- α konnte in den Zellversuchen mit HepG₂-Zellen eine Steigerung der Aktivität nachgewiesen werden, wobei die maximale Stimulierungsrate auch hier bei 16 h lag, bei einer optimalen Konzentration von 5 oder 20 ng/ml.

Über einen Zusammenhang zwischen Stimulierung der Akute Phase Proteine und IL-8-Regulation ist bisher nicht viel bekannt. IL-8 kann die Produktion von Akute Phase Proteine in isolierten humanen Hepatozyten und in humanen Hepatomazellen positiv beeinflussen (Wigmore et al.; 1997). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge führt IL-8, nach einer initialen Depression der Aktivität nach 2 bis 4 h, zu einer Steigerung der Aktivitätsmessung mit einem Maximum nach 16 h. Als optimale Konzentration wurde ein Wert von 20 ng/ml ermittelt.

Über einen Zusammenhang zwischen IL-4 und Akute Phase Proteine ist derzeit nichts beschrieben. In Zellversuchen mit HepG₂-Zellen konnte auch mit IL-4 eine zeit- und dosisabhängige Stimulierung der Aktivität erreicht werden, wobei das Maximum der Aktivität nach 48 h Stimulierung mit 10 ng/ml IL-4 zu beobachten war.

Durch Kombination von zwei Zytokinen konnte im Verhältnis zur alleinigen Stimulation in den Kombinationen IL-4/IL-8 und IL-4/TNF- α eine signifikante Steigerung der Aktivität gezeigt werden. Mäßig war die Steigerung in den Kombinationen IL-4/IL-6 und IL-8/TNF- α . Keine Steigerung konnte durch die Kombina-

tionen IL-6/IL-8 und IL-6/TNF- α erreicht werden. Durch Kombination aller 4 Zytokine wurde eine maximale Aktivierung erreicht.

Die FV-Aktivität im kinetischen Test kann in NHP durch einen polyklonalen AK in einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ vollständig inhibiert werden. Im Gegensatz dazu kommt es mit zunehmender Antikörperkonzentration zu einer erhöhten Aktivitätsmessung bei Verwendung von HepG₂-Zelllysate. In einem weiterführenden Versuch konnte gezeigt werden, daß eine Aktivität im amidolytischen Assay auch ohne Zusatz von PL messbar ist. Das spricht gegen eine Aktivitätsmessung von FV. Um Verunreinigungen bei der Zellaufarbeitung auszuschließen wurden verglichen: Zellen in SFM 1 x und 3 x gewaschen, Zellen in FCS 1 x und 3 x gewaschen sowie abgekratzter Zellrasen in SFM und FCS. Zelllysate von Zellen, die vor Versuchsbeginn in SFM gehalten wurden genauso wie Lysate von Zellen, die bis Versuchsbeginn in FCS gehalten wurden, zeigten Aktivität, die nach 3 x waschen etwas geringer war als nach 1 x waschen und die durch Zugabe von NHP noch gesteigert werden konnte. Die Aktivität von Zelllysate nach der Abkratzmethode von Zellen, die bis Versuchsbeginn in FCS kultiviert wurden, ist höher als von den Zellen, die in SFM gehalten wurden. Das spricht für eine gewisse FCS-Verunreinigung. Allerdings kann damit nicht die Aktivitätsmessung im Zelllysate von HepG₂-Zellen erklärt werden, die vor Versuchsbeginn in SFM kultiviert waren und danach nicht mehr mit FCS in Berührung kamen. Um zu sehen, ob dieses Phänomen auch auf andere Leberzellarten übertragbar ist, wurde der gleiche Versuchsansatz parallel mit HepG₂-, SK-Hep-1-, CL-48- und CCL-13-Zellen durchgeführt. In diesen Versuchen wurde deutlich, daß es sich bei der Aktivitätsmessung um eine Besonderheit der HepG₂-Zellen handelt, die von den anderen getesteten Zelllinien nicht verifiziert werden konnte. Undokumentiert ist hierbei die Beobachtung, daß nach einmaligem Einfrieren bei -20°C und zügigem Auftauen bei 37°C keinerlei Aktivität mehr messbar ist. Die in den vorangegangenen Versuchen gemessene Aktivität wird vermutlich durch eine HepG₂-spezifische Protease hervorgerufen, die in der Lage ist den Gerinnungsfaktor X FV-unabhängig zu aktivieren. Für eine Protease spricht unter anderem die Temperaturlabilität des Moleküls. In weiterführenden Expe-

rimenten sollte diese Protease weiter untersucht werden. Dazu sollte versucht werden, diese zu isolieren und DNA-technisch zu charakterisieren. Wenn sich dabei herausstellen sollte, daß es sich tatsächlich um ein neues, bisher noch nicht erwähntes Protein handelt, dann müßte dem Gerinnungssystem ein weiterer FX-Aktivierungsweg zugeschrieben werden.

6. Zusammenfassung

Die APC-Resistenz ist die bis dahin häufigste Ursache von venösen Thrombosen. Der Grund der Erkrankung in der Mehrheit des untersuchten Patientengutes liegt in einer verminderten antikoagulatorischen Antwort von APC, bedingt durch eine Punktmutation im FV-Gen. Aufgrund des Austausches der Aminosäure Arg⁵⁰⁶ durch Glu wird eine wichtige Spaltstelle für APC zerstört und FV behält lange seine prokoagulatorische Funktion, weil FVa nur verlangsamt abgebaut werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der absoluten und relativen FV^{R506Q}-Konzentration auf die APC-Sensitivität untersucht. Die relative FV-Konzentration ist dabei definiert als Anteil von FV^{R506Q} an der Gesamt-FV-Konzentration. Durch Verringerung der FV-Gesamtkonzentration erreicht man zwar keine Normalisierung der APC-Sensitivitäts-Ratio, dennoch gelingt es, die APC/aPTT in sec, bei einer FV-Konzentration im Bereich zwischen 10 und 20 %, soweit zu verlängern, daß der Wert dem einer Normal-Plasmaprobe mit 100 % FV-Gesamtkonzentration entspricht. Wird selektiv die FV^{R506Q}-Konzentration verändert, so ist ein FV^{wt}-Gehalt von mindestens 60 % gefordert, um eine APC-SR von über 2 zu erhalten sowie eine APC/aPTT, die sich im Vergleich zur aPTT mindestens verdoppelt hat. Diese Beobachtung geht konform mit der Tatsache, daß gerade heterozygote APC-Resistenz-Träger in Abwesenheit anderer Risikofaktoren ein nur geringes Thromboserisiko zeigen. Wenn parallel FV-Konzentration und FV^{wt}-Gehalt verändert werden, muß man eine FV-Konzentration von mindestens 60 % und einen FV^{wt}-Gehalt von mindestens 80 % für eine Normalisierung fordern. Mit Hilfe eines amidolytischen Testverfahrens kann selektiv FVa-Aktivität gemessen werden. Dieses Testverfahren wurde angewendet, um die FV-Syntheseleistung sowie den Regulationsmechanismus verschiedener Leberzelllinien humanen Ursprungs, zu untersuchen. Zur Anwendung kamen HepG₂-Zellen, die laut Literaturrecherchen sicher FV synthetisieren. Im Zellüberstand konnte weder im amidolytischen Ansatz noch im ELISA FV nachgewiesen werden. Die Stabilität von FV im Zell-

überstand wurde untersucht und konnte gezeigt werden. Nach Lysieren der Zellen wurde im kinetischen Test Aktivität gemessen. Der parallel dazu bearbeitete ELISA konnte den FV-Nachweis nicht bestätigen. Die Aktivität läßt sich durch Stimulierung mit verschiedenen Zytokinen steigern. Im amidolytischen Testansatz läßt sich die FV-Aktivität von humanem Plasma mit Hilfe eines polyklonalen anti-FV-Antikörpers vollständig blockieren, die Aktivität der HepG₂-Lysate wird im Vergleich dazu noch gesteigert. Eine FV-Aktivitätsmessung ist nur in der Gegenwart von PL möglich. Im Vergleich dazu reagieren die Zelllysate auch ohne PL. Diese gemessene Aktivität ist den Untersuchungen zufolge eine HepG₂-spezifische Aktivität. In drei weiteren untersuchten Leberzelllinien humanem Ursprungs konnte nach gleicher Behandlung und Aufarbeitung kein vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

7. Literaturverzeichnis

Abraham L.J., Bradshaw A.D., Fletcher R.G., Fey G.H.: Interleukin-6 is a negative regulator of the acute phase alpha 1-inhibitor II gene.

Mol. Biol. Med. 7(3), 261-271 (1990)

Annamalai A.E., Stewart G.J., Hansel B., Memoli M., Chiu H.C., Manuel D.W., Doshi K., Colman R.W.: Expression of factor V on human umbilical vein endothelial cells is modulated by cell injury.

Arterioscl. 6 (2), 196-202 (1986)

Bankey P.E., Mazuski J.E., Ortiz M., Fulco J.M., Cerra F.B.: Hepatic acute phase protein synthesis is indirectly regulated by tumor necrosis factor.

J. Traumat. 30(10), 1181-1187 (1990)

Bauer K.A., M.D.: Hypercoagulability-a new cofactor in the protein C anticoagulant pathway.

N. Engl. J. Med. 330 (8), 566-567 (1994)

Baumann H., Gauldie J.: Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation.

Mol. Biol. Med. 7(2), 147-159 (1990)

Bertina R. M., Koeleman B.P.C., Koster T., Rosendaal F.R., Dirven R.J., De Ronde H., Van der Velden P.A., Reitsma P.H.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.

Nature 369, 64-67 (1994)

Bertina R.M., Broekmans A.W., Van der Linden I.K., Mertens K.: Protein C deficiency in a dutch family with thrombotic disease.

Thromb. Haemost. 48 (1), 1-5 (1982)

Broekmans A.W., M. D., Veltkamp J.J., Bertina R.M., Ph. D.: Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism.

N. Engl. J. Med. 309 (6), 340-344 (1983)

Buonassisi V.: Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures.

Exp. Cell Res. 76 (2), 363-368 (1973)

Castell J.V., Gomez-Lechnon M.J., David M., Andus T., Geiger T., Trullenque R., Fabra R., Heinrich P.C.: Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes.

FEBS-Lett. 242(2), 237-239 (1989)

Cervený T.J, FassD.N., Mann K.G.: Coagulation factor V synthesis by cultured endothelium.

Fed. Proc. 42; 1032 (1983)

Chan et al.: FV Arg/Glu 506 has no dominant influence on the severity of hemophilia when inherited occurrently.

Thromb. Haem. 73, 1793 a (1995)

Chang: .CCL 13.

Proc. Society Experim. Biology Method 87, 440 (1954)

Chiu C, Schick P., Colman R.W.: Biosynthesis of coagulation factor V by megakaryocytes.

Fed. Proc. 42; 1994 (1984)

Chiu H.C., Whitaker E., Colman R.W.: Heterogeneity of human factor V deficiency.

J. Clin. Invest. 72, 493-503 (1993)

Citarella F., Felici A., Brouwer M., Wagstaff J., Fantoni A., Hack C.E.: Interleukin-6 downregulates factor XII production by human hepatoma cell line (HepG2).

Blood 90(4), 1501-1507 (1997)

Collen D.: On the regulation and control fibrinolysis.

Thromb. Haemost. 43, 77 (1980)

Colman R.W.: Factor V

Prog. Hemost. Thromb. 3, 109-143 (1976)

Colucci M., Ciavarella N., Giliberti M.G., Semeraro N.: Resistance to activated protein C (APC): Influence of factor V levels.

Thromb. Haemost. 72 (6), 985-989 (1994)

Dahlbäck B., Carlson M.: FVIII defect associated with familial thrombophilia.

Thromb Haem.,, 654-658 (1991)

Dahlbäck B., Carlsson M., Svensson P. J.: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1004 (1993)

Dahlbäck B., Hildebrand B.: Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91, 1396-1400 (1994)

Dahlbäck B.: The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis.

Thromb. Res. 77 (1), 1-43 (1995)

Dahlbäck B: Physiological anticoagulation.

J. Clin. Invest. 94, 923-927 (1994)

Davie E.W.: The proteins of blood coagulation.

Chemica scripta 26, 241-245 (86)

De Ronde H., Bertina R.M.: Laboratory diagnosis of APC-resistance: A critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria.

Thromb. Haemost. 72 (6), 880-886 (1994)

Delvos U., Müller-Berghaus G.: Die Regulation der Blutgerinnung.

Naturwissenschaften 72 (9), 461-469 (1985)

Esmon C.T., Owen W.G.: Identifikation of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalysed activation of protein C.

Proc. Natl. Acad.Sci. USA 78, 2249 (1981)

Esmon C.T.: Protein C: Biochemistry, physiology, and clinical implications.

Blood 62 (6): 1155-1158 (1983)

Esmon C.T.:The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation.

J. Biol. Chem. 264 (5), 4743-4746 (1989)

Esmon N.L., Owen W.G., Esmon C.T.: Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C.

J. Biol. Chem. 257 (2), 859-864 (1982)

Esmon, C.T.: The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity.

J. Biol. Chem. 254 (3), 964-973 (1979)

Fujimura H., Kambayashi J., Monden M., Kato H., Miyata T.: Coagulation factor V-Leiden mutation may have a racial background.

Thromb. Haemost. 74 (5), 1379-1382 (1995)

Giddings J.C., Jarvis A.L., Hogg S.: Factor V in human vascular endothelium and in endothelial cells in culture.

Thromb. Res., 44 (6), 829-835 (1986)

Griffin J.H., Evatt B., Zimmerman T.S., Kleiss A.J., Wideman C.: Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease.

J. Clin. Invest. 68 (5), 1370-1373 (1980)

Griffin J.H., Evatt B., Wideman C., Fernandez J.A.: Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients.

Blood 32 (7), 1989-1993 (1993)

Griffin J.H., Heeb M.J., Kojima Y., Fernandez J.A., Kojima K., Hackeng T.M., J.S. Greengard.

Activated protein C-resistance: Molecular mechanisms.

Thromb. Haemost. 74 (1), 444-448 (1995)

Grinnell B. W., Walls J.D., Gerlitz B.: Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin.

J. Biol. Chem. 226 (15), 9778-9785 (1991)

Gross R., Schölmerich P., Gerok W.: Die Innere Medizin.

8. Aufl. (1994)

Haeberli A.: Human protein data.

(1992)

Halbmayer W.-M., Haushofer A., Schön R., Fischer M.: The prevalence of poor anticoagulant response to activated protein C (APC-resistance) among patients suffering from stroke or venous thrombosis and among healthy subjects. Blood coagulation and fibrinolysis 5, 51-57 (1994)

Heeb M.J., Griffin J.H.: Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin.

J. Biol. Chem. 263 (24), 11613-11616 (1988)

Hiller E., Riess H.: Die normale Hämostase. Hämorrhagische Diathese und Thrombose.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1988)

Hiron M., Daveau M., Arnaud P., Bauer J., Lebreton J.P.: The human hepatoma Hep 3B cell line as a experimental model in the study of the long-term regulation of acute-phase proteins by cytokines.

Biochem. J. 287, 255-259 (1992)

Hogg P.J., Öhlin A.-K., Stenflo J.: Identification of structural domains in protein involved in its interaction with thrombin-thrombomodulin on the surface of endothelial cells.

J. Biol. Chem. 267 (2),. 703-706 (1992)

Horellou M.H., Conrad J., Bertina R.M., Samama M.: Congenital protein C deficiency and thrombotic disease in nine french families.

Br. Med. J. 289, 1285 (1984)

Hurtubize P.E., Coots M.C., Jacob D.J., Muhleman A.F., Glueck H.I.: A monoclonal IgG4 (lambda) with factor V inhibitory activity.

J. Immunol. 122 (5), 2119-2121, (1979)

Jackson C.M., Nemerson Y.: Blood coagulation.

Annu. Rev. Biochem. 49, 765-811 (1980)

Kalafatis M., Bertina R., Rand M.D., Mann K.G.: Characterisation of the molecular defect in factor V^{R506Q}.

J. Biol. Chem. 270 (8), 4053-4057 (1995)

Kalafatis M., Mann K.G.: Role of the membrane in the inactivation of factor Va by activated protein C.

J. Biol. Chem. 268, 27246-27257 (1993)

Kalafatis M., Rand M.D., Mann K.G.: The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C.

J. Biol. Chem. 269, 31869-31880 (1994)

Kane W.H., Majerus P.W.: Purification and characterization of human coagulation Factor V.

J. Biol. Chem. 256 (2), 1002-1007 (1981)

Kane W.H., Majerus P.W.: Purifikation and characterihation of human coagulation factor V.

J. Biol. Chem. 256 (2),1002-1007 (1981)

Kisiel W., Canfield W.M., Ericsson L.H., Davie E.W.: Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin.

Biochem. 16, 5824-5831 (1977)

Kisiel W., Ericsson L.H., Davie E.W.: Proteolytic activation of protein C from bovine plasma.

Biochem. 15 (22), 4893-4900 (1976)

Kisiel W.: Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin.

J. Clin. Invest. 64 (3), 761-769 (1979)

Koster T., Rosendaal F.R., De Ronde H., Briet E., Vandenbroucke J.P., Bertina R.M.: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to APC.

Lancet 342, 1503-1506 (1993)

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.

Nature 227, 680 (1979)

Le J. M., Vilcek J.: Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response.

Lab. Invest. 61(6), 588-602 (1989)

Lecander I., Astedt B.: Isolation of a new specific plasminogen activator inhibitor from pregnancy plasma.

Br. J. Haem. 62 (2), 221-228 (1986)

Loskutoff D.J., Van Mourik J.A., Erickson L.A., Lawrence D.: Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (10), 2956-2960 (1983)

Majerus P.W.: Bad blood by mutation.

Nature 369, 14 (1994)

Mammen E.F., Thomas W.R., Seegers W.H.: Activation of purified prothrombin to autoprothrombin II (platelet cofactor II or autoprothrombin II-a).

Thromb. Diath. Haemorrh. 5, 218 (1960)

Marciniak E., Wilson H.D., Marlar R.A.: Neonatal purpura fulminans. A genetic disorder related to the absence of protein C in blood.

Blood 65, 15 (1985)

Marquette K.A., Pittman D.D., Kaufman R.J.: The factor V B-domain provides two functions to facilitate thrombin cleavage and release of the light chain.

Blood 86 (8), 3026-3034 (1995)

Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A., Ebert M. H.: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamid-gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins.

Science 211, 1437 (1981)

Messmore J.H.: Natural inhibitors of the coagulation system.

Sem. Thromb. Hemost. 8, 267 (1982)

Moshage H.: Cytokine and the hepatic acute phase response.

J. Pathol. 181(3), 257-266 (1997)

Müller-Berghaus G., Preissner K.T.: Regulation der Thrombinaktivität an der Interphase zwischen Blut und Gefäßwand. Interaktion der Komponenten Protein C, Protein S und Thrombomodulin.

Hämostaseologie 7, 14 (1987)

Müller-Berghaus G.: Physiologie und Regulation der Blutgerinnung und Fibrinolyse.

Die medizinische Welt 38, 407-413 (1987)

Nesheim, M.E., Myrnes K.H.; Hibbard L.; Mann K.G.: Isolation and characterization of single chain bovine factor V.

J. Biol. Chem. 254 (2), 508-517(1979)

Niessen R.W., Lamping R.J., Jansen P.M., Prins M.H., Peters M., Taylor F.B., De Vijlder J.J., Cate J.W., Hack C.E., Sturk A.: Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2-cells and in baboons.

Thromb. Haemost. 78(3), 1088-1092 (1997)

Nishioka J., Masaru Ido, Hayashi T., Suzuki K.: The Glu²⁶ residue of protein C is required for the binding of protein C to thrombomodulin and endothelial cell protein C receptor, but not to protein S and factor Va.

Thromb. Haem. 75 (2), 275-282 (1996)

Öhlin A.-K., Landes G., Bourdon P., Oppenheimer C., Wydro R., Stenflo J.: β -hydroxyaspartic acid in the first epidermal growth factor-like domain of protein C.

J. Biol. Chem. 263 (35), 19240-19248 (1988)

Olson J.P., Miller L.L., Troup S.B.: Synthesis of clotting factors by the isolated perfused rat liver.

J. Clin. Invest. 45, 690-701 (1966)

Owren P.A., Cooper T.: Parahemophilia

Arch. Intern. Med. 95, 194 (1955)

Owren P.A.: The coagulation of blood. Investigations on a new clotting factor.
Acta Med. Scand. 194, 1 (1947)

Pannen B.H., Robotham J.L.: The acute phase response.
New Horiz. 3(2), 183-197 (1995)

Rodgers G.M., Shuman M.A.: Prothrombin is activated on vascular endothelial cells by factor Xa and calcium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (22), 7001-7005 (1983)

Rosing J., Hoekema L., Nicolaes G.A.F., Christella M., Thomassen L.G.D., Coenraad Hemker H., Varadi K., Schwarz H.P., Tans G.: Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor Va^{R506Q} by activated protein C.
J. Biol. Chem. 270 (46), 27852-27858 (1995)

Sakata Y., Curriden S., Lawrence D., Griffin J. H., Loskutoff D. J.: Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1121 (1985)

Salem H.H., Broze G.J., Miletich J.P., Majerus P.W.: Human coagulation factor Va is a cofactor for the activation of protein C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1584 (1983)

Seegers W.H., Novoa E., Henry R.L., Hassouna H.I.: Relationship of "new" vitamin K-dependent protein C and "old" autoproteolytic IIa.
Thromb. Res. 8 (5), 543-552 (1976)

Sehgal P.B.: Interleukin-6: Molecular pathophysiology.
J. Invest. Dermatol. 94(6), 2s-6s (1990)

Shen L., Dahlbäck B.: Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa.

J. Biol. Chem. 269 (29), 18735-18738 (1994)

Simioni P., Girolami A.: Homozygous factor V deficient patients show resistance to activated protein C whereas heterozygotes do not.

Blood Coagul. Fibrinol. 5(5), 825-827 (1994)

Stenflo J.: A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterisation.

J. Biol. Chem. 251 (2), 355 (1976)

Sun X., Evatt B., Griffin J.H.: Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to APC in venous thrombosis.

Blood 83, 3120-3125 (1994)

Suttie J.W., Koskins J.A.; Engelke J.: Vit-K-dependent carboxylase: Possible role of the substrate propeptide as an intracellular recognition site.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 634 (1987)

Suzuki K., Dahlbäck B., Stenflo J.: Thrombin-catalysed activation of human coagulation factor V.

J. Biol. Chem. 257 (11), 6556-6564 (1982)

Suzuki K., Deyashiki Y., Nishioka J., Kurachi K., Akira M., Yamamoto S., Hashimoto S.: Characterization of a cDNA for human protein C inhibitor. A new member of the plasma serine protease inhibitor superfamily.

J. Biol. Chem. 262 (2), 611-616 (1987)

Suzuki K., Nishioka J., Kusumoto H., Hashimoto S.: Mechanism of inhibition of activated protein C by PCI.

Biochem. 95, 187 (1984)

Suzuki K., Stenflo J., Dahlbäck B., Teodorsson B.: Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C.

J Biol. Chem. 258, (3), 1914-1920 (1983)

Svenson P.J., Dahlbäck B.: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis;

N. Engl. J. Med. 330, 517 (1994)

Thomas D.P.: Pathogenesis of venous thrombosis.

Haem. Thromb. 3, 1335 (1994)

Thompson D., Whicher J.T., Evans S.W.: Interleukin-6 signal transduction in a human hepatoma cell line (Hep G2).

Immunopharmacol. Immunotoxicol. 15 (4), 371-386 (1993)

Tollefsen D.M., Majerus D.W., Blank M.K.: Heparin Cofactor II, purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.

J. Biol. Chem. 257 (5), 2162-9 (1982)

Trossaert M., Conard J., Horellou H., Samama M.M.: Influence of storage conditions on activated protein C-resistance assay.

Thromb. Haemst. 73 (1), 162-166 (1995)

Tsakiris D.A., Yasikoff M.-L., Wolf F., Marbet G.A.: Anticardiolipin antibodies do not seem to be associated with APC-resistance in vivo or in vitro.

Ann. Hematol. 71, 195-198 (1995)

Tuddenham E.G.D.: Thrombophilia: The new factor is old factor V.
Lancet 343, 1515-1516 (1994)

Voorberg J., Roelse J., Koopman R., Büller H., Berends F., Cate J. W.,
Mertens K., A van Mourik J: Association of idiopathic venous thromboem-
bolism with single point mutation at Arg⁵⁰⁶ of factor V.
Lancet 343, 1535-1536 (1994)

Walker F.J., Scandella D., Fay P.J.: Identifikation of the binding site for acti-
vated protein C on the light chain of factors V and VIII.
J. Biol. Chem. 265 (3), 1484-1489 (1990)

Weissbach G., Domula M., Handrick W.: Beeinflussung von Hämostase und
Thrombogenese durch septische Prozesse speziell im Kindesalter.
Z. Gesamte Inn. Med. 39 (10), 214-219 (1984)

Wiesinger K., Hohenwallner W.: Bestimmung der APC-Resistenz nach enzy-
matischem Abbau von Heparin durch Dade^R HepzymTM.
Berichte der ÖGKC 17, 135-137 (1994)

Wigmore S.J., Fearon K.C., Maingay J.P., Lai P.B., Ross J.A.: Interleukin-8
can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes.
Am. J. Physiol. 273, 720-726 (1997)

Wilson D. B., Salem H.H., Mruk J.S., Maruyama I., Majerus P.W.: Biosynthesis
of coagulation factor V by human hepatocellular carcinoma cell line.
J. Clin. Invest. 73, 654-658 (1984)

Yan S.C.B., Razzano P., Chao Y.B., Walls J.D., Berg D.T., McClure D.B., Grinell W.: Characterization and novel purification of recombinant human protein C from three mammalian cell lines.

Biotechnology 8, 655-660 (1990)

Zöller B., Dahlbäck B.: Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis.

Lancet 343, 1536-1538 (1994)

Zöller B., He X., Dahlbäck B.: Homozygous APC-resistance combined with inherited type I protein S deficiency in a young boy with severe thrombotic disease.

Thromb. Haem. 73 (5), 743-745 (1995)

Zöller B., Holm J., Svensson P., Dahlbäck B.: Elevated levels of prothrombin activation fragment 1+2 in plasma from patients with heterozygous Arg⁵⁰⁶ to Gln mutation in the factor V gene (APC-resistance) and/or inherited protein S deficiency.

Thromb. Haemost. 75 (2), 270-274 (1996)

Zöller B., Svensson P.J., He X., Dahlbäck B.:

Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C.

J. Clin. Invest. 94, 2521-2524 (1994)

8. Anhang

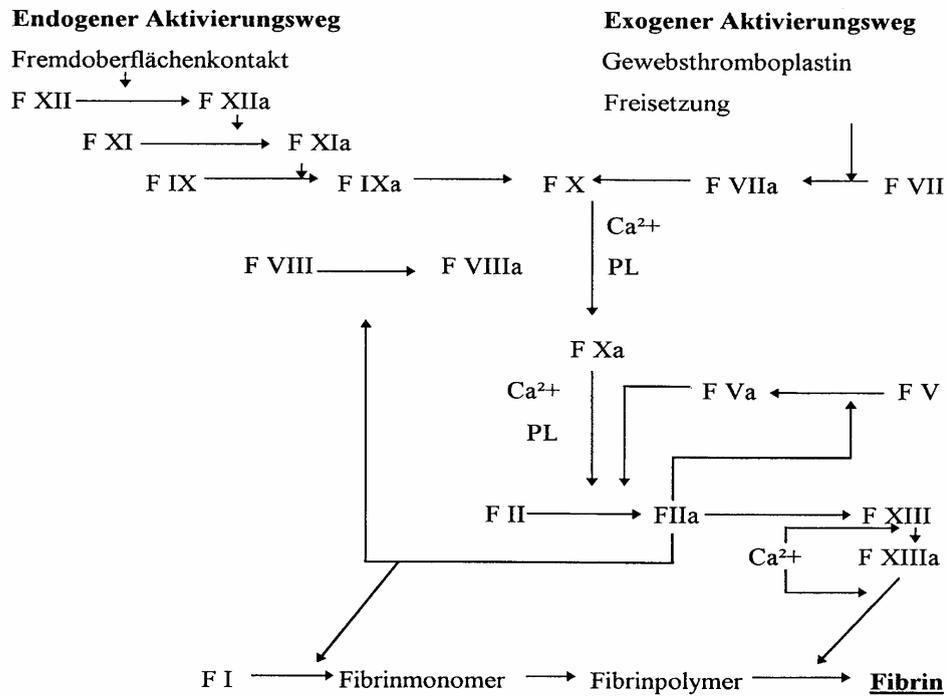


Abbildung 1: Ablauf der sekundären Hämostase (Hiller und Riess; 1988/Gross, Schölmerich und Gerok; 1994)

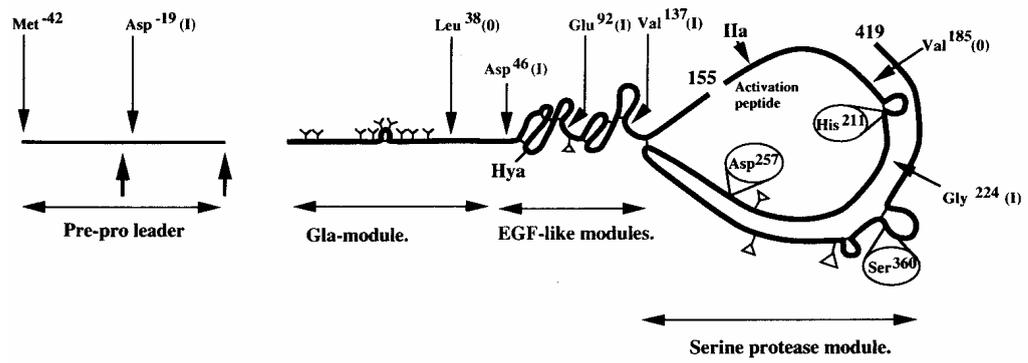


Abbildung 2: PC/APC (Dahlbäck; 1994)

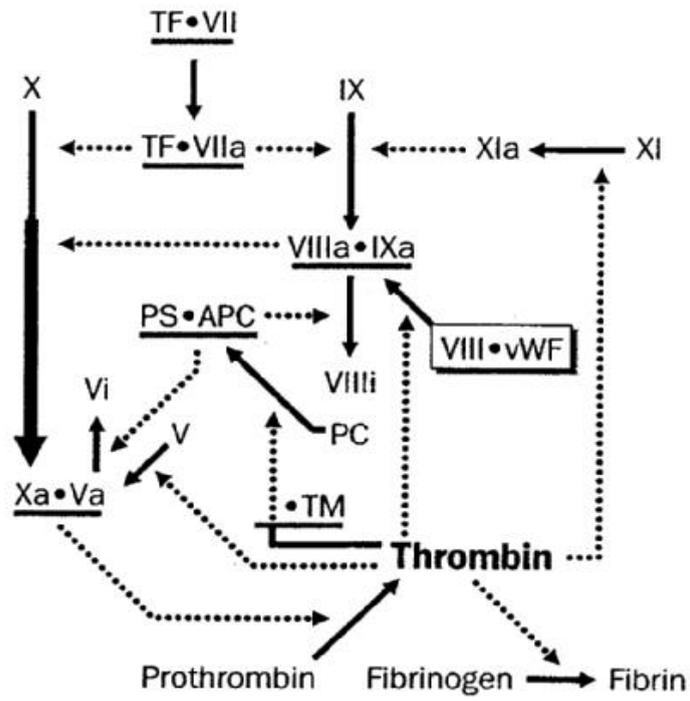


Abbildung 3: Mechanismus der Blutgerinnung (Tuddenham; 1994)

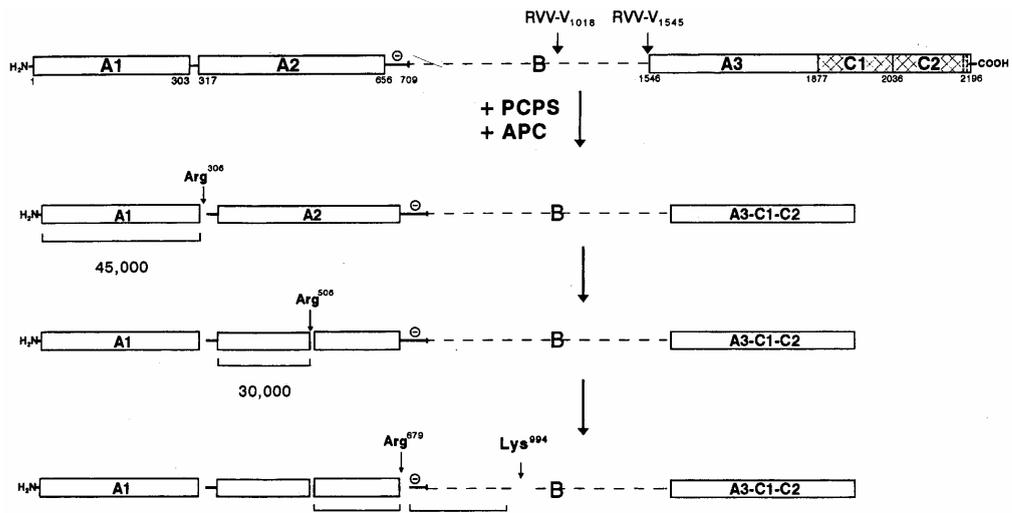


Abbildung 4a: FV (Kalafatis und Mann; 1994)

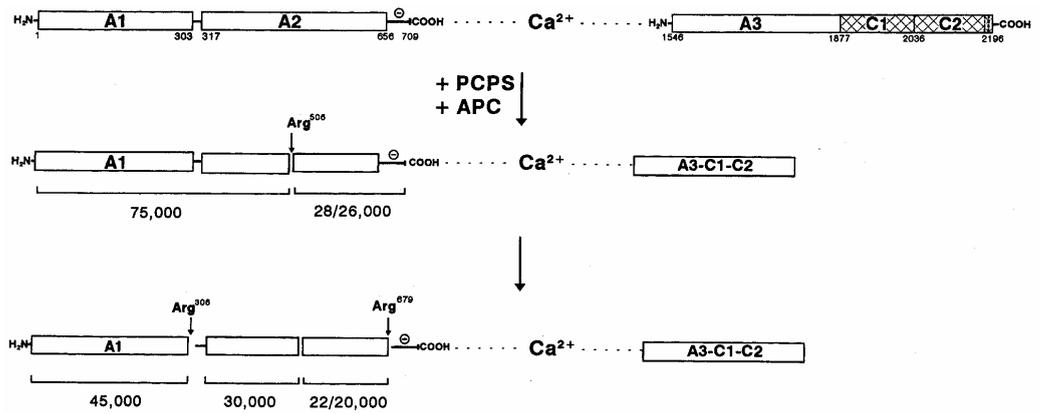


Abbildung 4b: FVa (Kalafatis und Mann; 1994)

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Herrn Prof. Dr. G. Müller-Berghaus für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. B. Pötzsch für die intensive Betreuung meiner Arbeit.

Anette Knedla, Bettina Kropp sowie Christoph Seelig für Ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Frau Dr. Katharina Madlener für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in Ihrem Labor sowie für die Mitbenutzung einzelner technischer Geräte.

Birgit Rabenau und Mathias Heil für die freundliche Unterstützung und nette Zusammenarbeit.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes sowie unseren freundlichen Sekretärinnen danke ich für die hilfsbereite Zusammenarbeit.

Danken möchte ich vor allem noch Peter Speiser, der mir bei der Formatierung dieser Arbeit sehr geholfen hat sowie seiner Familie, die ihn für viele Stunden entbehren mußte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. T. Preissner für die kompetente Einführung in das Fachgebiet der Hämostaseologie sowie in biochemische Arbeitsmethoden, die ich während meiner MTLA-Tätigkeit erwerben konnte und die mir meine Arbeit deutlich erleichterten.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bender, geb. Benner
Vorname: Kerstin
Straße: Eichenweg 20 A
Wohnort: 35633 Lahnau
Geburtsdatum: 19. März 1969
Geburtsort: Wetzlar
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1975 – 1979 Grundschule in Dorlar
1979 – 1985 Gesamtschule in Atzbach
1985 – 1988 Gymnasiale Oberstufe in Wetzlar

Berufsausbildung

1988 – 1990 Ausbildung zur MTLA an der staatlichen Lehranstalt für medizinisch-technische Assistenten der Uniklinik Gießen

Berufliche Tätigkeiten

1991 – 1992 MTLA am Institut für Haemostaseologie und Transfusionsmedizin in Bad Nauheim, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Müller-Berghaus,

	tätig im Labor von Herrn Prof. Dr. K. T. Preissner
1993 - 1994	berufliche Nebentätigkeit im gleichen Labor
1995 - 1997	studentische Hilfskraftstelle in der Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin der Uniklinik Gießen, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Hempelmann, tätig im Labor von Herrn Dr. M. Dehne

Studium

Seit WS 1992/93	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1992 - 1994	Vorklinischer Studienabschnitt
1994	Physikum
1994 - 1997	Klinischer Studienabschnitt
1995	1. Teil der ärztlichen Prüfung
1997	2. Teil der ärztlichen Prüfung
1997 - 1998	Praktisches Jahr Uniklinikum Gießen (Anaesthesiologie) Klinikum Wetzlar (Innere Medizin) Klinikum Wetzlar (Chirurgie)
1998	3. Teil der ärztlichen Prüfung