

**Molekulare Analyse der G20210A-Mutation in  
der 3'-untranslatierten Region des  
Prothrombingens**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich 08 - Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der

**JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN**

von

Stephanie Hehlhans  
aus Bad Hersfeld

Wöllstadt 2003

**Max-Planck-Institut**  
**für physiologische und klinische Forschung**

Kerckhoff-Klinik GmbH, Bad Nauheim  
Abteilung Hämostaseologie und Transfusionsmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Müller-Berghaus

Betreuer in der Abteilung für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin:

PD Dr. D. von der Ahe

Betreuerin im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der  
Justus-Liebig-Universität Gießen am Institut für Mikrobiologie und

Molekularbiologie:

Prof. Dr. G. Klug

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Hämostase</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das plasmatische Gerinnungssystem	2
1.1.2	Das fibrinolytische System	5
1.1.3	Thrombophilie	6
<b>1.2</b>	<b>Prothrombin</b>	<b>7</b>
1.2.1	Genstruktur	9
1.2.2	Regulation des Prothrombingens	9
1.2.3	Die G20210A-Mutation im Prothrombingen	11
<b>1.3</b>	<b>mRNA-Stabilität in Eukaryoten</b>	<b>13</b>
1.3.1	Regulatorische mRNA-Sequenzen	14
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Expression von Prothrombin in Säugerzellen</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Bestimmung der Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA</b>	<b>21</b>
2.2.1	Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in HepG2-Zellen	21
2.2.2	Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in primären Rattenleberzellen	23
2.2.3	Vergleich der Halbwertszeiten der endogenen Prothrombin-mRNA aus HepG2 und Rattenleberzellen	25
<b>2.3</b>	<b>Analyse der mRNA-Halbwertszeit von <math>\beta</math>-Globin-Prothrombin-Reporterkonstrukten</b>	<b>27</b>
2.3.1	Klonierung von Prothrombin-Reportergenkonstrukten	27
2.3.2	Stabile Expression von $\beta$ -Globinreporterkonstrukten in HepG2-Zellen	30
2.3.3	Vergleich der Transkriptmengen von Wildtyp und Mutante	30
2.3.4	Bestimmung der Halbwertszeit der Hybrid-mRNA	31
2.3.5	Überprüfung des 3'-Endes der $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybride	35
<b>2.4</b>	<b>Überexpression von Prothrombin in HepG2- und COS-1- Zellen</b>	<b>37</b>
2.4.1	Klonierung der Prothrombin-cDNA in einen Expressionsvektor	37
2.4.2	Untersuchung der Halbwertszeit der rekombinanten Prothrombin -mRNA	40
2.4.3	Nachweis der Überexpression im Western Blot	43
<b>2.5</b>	<b>Erweiterung der humanen 3'-flankierenden Prothrombinregion</b>	<b>46</b>
2.5.1	Southern Blot Analyse eines Prothrombin-Subklons	47
2.5.2	Klonierung der 1,8 kb 3'-flankierenden Prothrombinregion	48

---

<b>2.6</b>	<b>Analyse der regulatorischen Prothrombinregionen mit Luciferase-Reporterkonstrukten</b>	<b>50</b>
2.6.1	Promotoranalyse mit Luciferase-Reporterkonstrukten	51
2.6.2	Einfluss der 3'-Prothrombinregion auf die Luciferaseaktivität	53
<b>2.7</b>	<b>Expression der 3'-Prothrombin-Reporterkonstrukte in HepG2 -Zellen</b>	<b>56</b>
2.7.1	Klonierungsstrategie	57
2.7.2	Transiente Expression von 3'-Prothrombin-Reporterkonstrukten	57
2.7.3	Stabile Expression von 3'-Prothrombin-Reporterkonstrukten	60
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Die G20210A-Mutation in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens</b>	<b>65</b>
<b>3.2</b>	<b>Regulation des Prothrombingens</b>	<b>66</b>
3.2.1	Promotorregulation des Prothrombingens	66
3.2.2	Stabilität der endogenen Prothrombin-mRNA	68
3.2.3	Analyse der 3'-Prothrombinregion mit $\beta$ -Globinreporterkonstrukten	70
3.2.3.1	Vergleich der transienten und stabilen Expression von $\beta$ -Globinkonstrukten	75
3.2.4	Rekombinante Expression der 20210G/A Prothrombin-cDNA	77
3.2.5	Prozessierung der mRNA am 3'-Ende	79
3.2.6	Einfluss der 3'-flankierenden Prothrombinregion	82
<b>3.3</b>	<b>Mögliche regulatorische Bereiche in der 3'-Prothrombinregion</b>	<b>84</b>
<b>3.4</b>	<b>Abschließende Diskussion</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>87</b>
<b>4.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>89</b>
<b>4.3</b>	<b>Kits</b>	<b>90</b>
<b>4.4</b>	<b>Enzyme</b>	<b>91</b>
<b>4.5</b>	<b>Elektrophoresemarker</b>	<b>91</b>
<b>4.6</b>	<b>Stammlösungen</b>	<b>92</b>
<b>4.7</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>92</b>
4.7.1	Oligonukleotidprimer für Sequenzierung	92
4.7.2	Oligonukleotide für PCR-Klonierungen	93
4.7.3	Oligonukleotide für reverse Transkription	96
<b>4.8</b>	<b>Vektoren</b>	<b>96</b>

---

<b>4.9</b>	<b>Antikörper</b>	<b>99</b>
4.9.1	Primäre Antikörper	99
4.9.2	Sekundäre Antikörper	100
<b>4.10</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>100</b>
<b>4.11</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>100</b>
4.11.1	Primäre Zellen	100
4.11.2	Etablierte Zelllinien	101
<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>102</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>102</b>
5.1.1	Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	102
5.1.1.1	Bakterienkultur	102
5.1.1.2	Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (Minipräparation)	103
5.1.1.3	Maxipräparation von Plasmid-DNA über Anionen-Austauschsäulen	104
5.1.1.4	Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	105
5.1.1.5	Analyse von Plasmid-DNA	105
5.1.1.5.1	Restriktion von Plasmid-DNA	105
5.1.1.5.2	Analytische Agarosegelelektrophorese	106
5.1.1.5.3	Präparative Agarosegelelektrophorese	106
5.1.1.5.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	107
5.1.2	Klonierung von DNA-Fragmenten	108
5.1.2.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	108
5.1.2.2	Reinigung von PCR-Produkten	110
5.1.2.3	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	110
5.1.2.4	Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	111
5.1.2.5	Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol	111
5.1.2.6	Fällung von DNA mit Ethanol	111
5.1.2.7	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden mittels Klenow-Enzym	112
5.1.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	112
5.1.3	Transformation von Bakterien	113
5.1.3.1	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	113
5.1.3.2	Präparation von <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektrottransformation	114
5.1.3.3	Elektrottransformation	114
5.1.4	Isolierung von genomischer DNA	114
5.1.5	Radioaktive Markierung von DNA	115
5.1.6	Southern Blot Analyse	115
5.1.7	Northern Blot Analyse	116
5.1.7.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	116
5.1.7.2	Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe	117

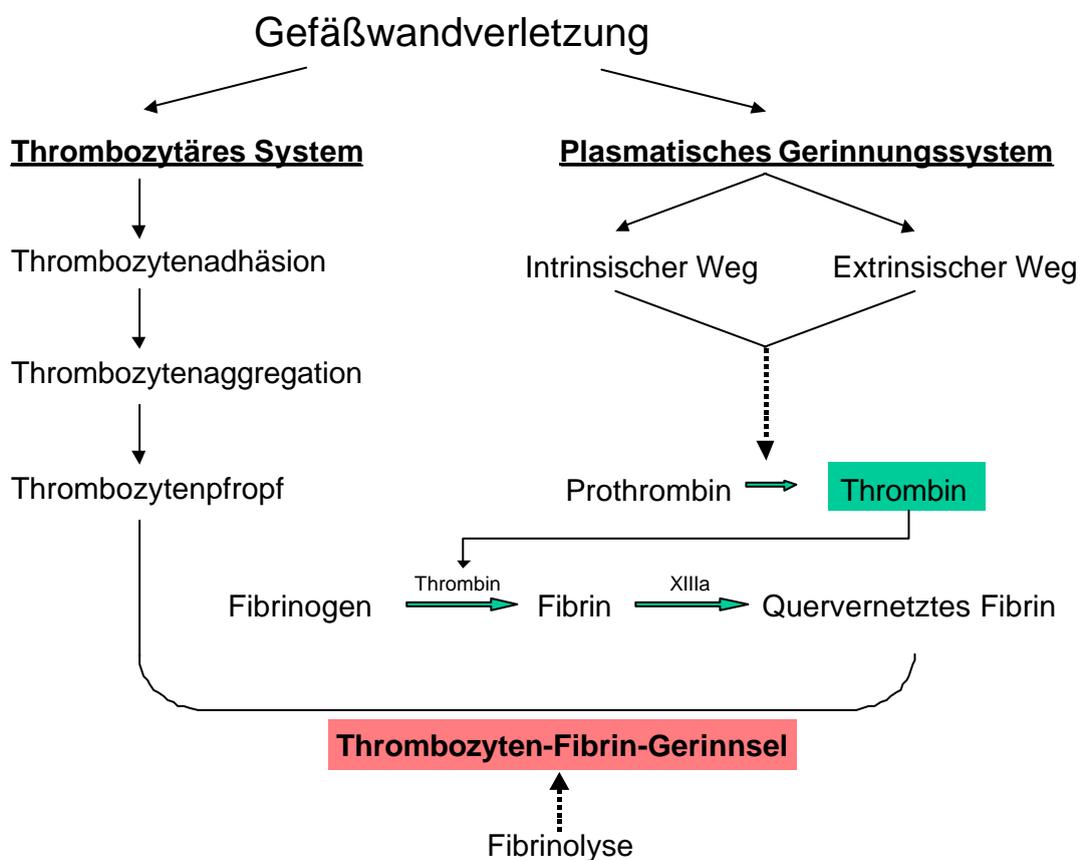
---

5.1.7.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA	117
5.1.7.4	Transfer der RNA auf eine Nylonmembran	117
5.1.7.5	Hybridisierung	118
5.1.8	Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit	118
5.1.9	Überprüfung von mRNA 3'-Enden mittels RT-PCR	119
5.1.9.1	DNase-Behandlung von Gesamt-RNA	119
5.1.9.2	Reverse Transkription (RT-PCR)	120
5.1.9.3	Spezifische Amplifikation des 3'-Endes	120
5.1.9.4	TA-Klonierung und Sequenzierung der Fragmente	121
5.1.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	122
<b>5.2</b>	<b>Sequenzrecherche und Datenbanken</b>	<b>122</b>
<b>5.3</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>123</b>
5.3.1	Kultivierung von Zellen	123
5.3.2	Zellpassage	126
5.3.3	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	126
5.3.4	Mycoplasmen-Test	127
<b>5.4</b>	<b>Analyse regulatorischer Sequenzen mittels Luciferase-Reportergenkonstrukten</b>	<b>127</b>
5.4.1	Transiente Transfektion	127
5.4.2	Bestimmung der Genexpression des Luciferase-Reporters	128
<b>5.5</b>	<b>Stabile Expression von Reportergenkonstrukten in eukaryotischen Zellen</b>	<b>129</b>
5.5.1	Stabile Transfektion mittels Elektroporation	129
5.5.2	Stabile Transfektion mit FuGENE 6	130
5.5.3	Stabile Transfektion mit Lipofectin	130
<b>5.6</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b>	<b>131</b>
5.6.1	Lyse von Säugerzellen mit RIPA-Puffer	131
5.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	131
5.6.3	Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	131
5.6.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	132
5.6.5	Western Blot Analyse	133
5.6.5.1	Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran	133
5.6.5.2	Immunodetektion von Proteinen	133
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>141</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämostase

Das Blut der Wirbeltiere dient nicht nur als Transportmittel für Substanzen wie Nahrungsstoffe und Atemgase zur Versorgung der Gewebe, es trägt auch zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus im Organismus bei. Weiterhin ist es beteiligt an der Verteilung der Wärme bei homoiothermen Tieren und spielt eine Rolle in der Immunabwehr. Für den reibungslosen Ablauf der oben erwähnten Funktionen des Blutes ist die Hämostase essentiell. Bei Verletzungen der Gefäßwand erfolgt primär die Vasokonstriktion der zuführenden Blutgefäße und damit die Drosselung des lokalen Blutflusses. Parallel kommt es zu einer Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten, die durch Aggregation einen Thrombozytenpfropf bilden. Zudem wird die plasmatische Gerinnung aktiviert, die über eine Kaskade in der Spaltung des Fibrinogens durch Thrombin und der Bildung eines Fibringerinnsels mündet (Abb. 1).



**Abb. 1: Zusammenspiel von thrombozytärem und plasmatischem System in der Hämostase** (verändert nach Müller-Berghaus, 1998).

Das Fibrinolyse-System schließlich wirkt durch Hemmung der Fibrinbildung und der Thrombozytenaggregation regulatorisch, begrenzt die Bildung des Fibringerinnsels und löst es nach erfolgter Wundheilung auf.

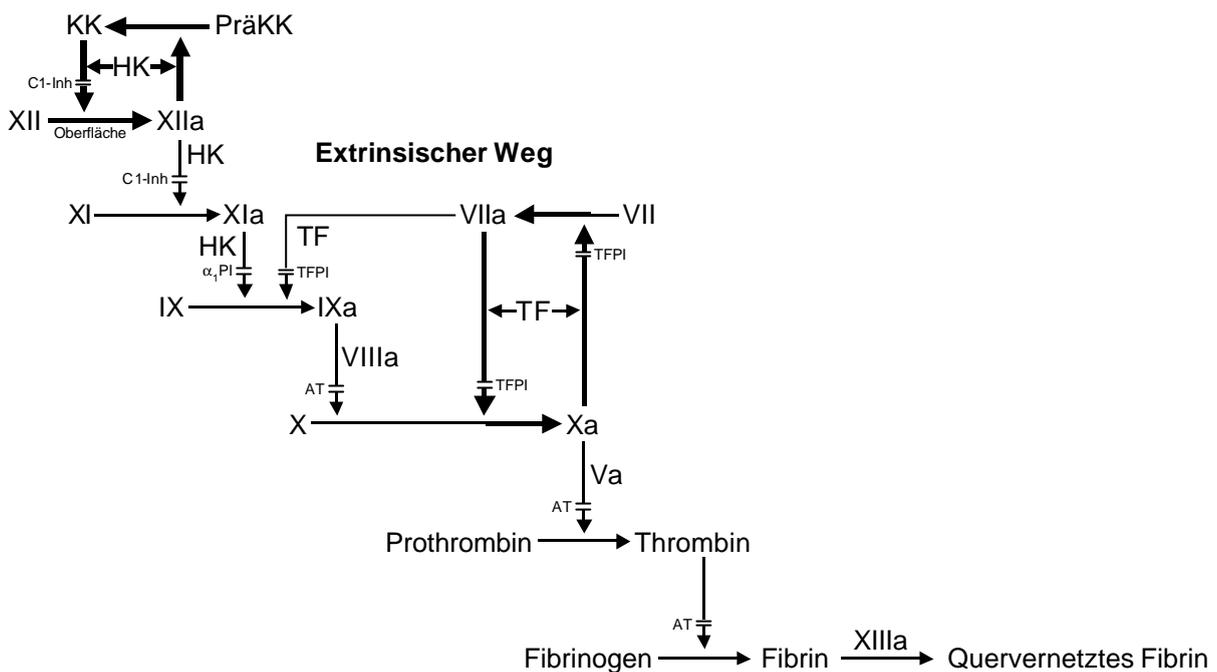
Durch ein komplexes Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren der Blutgerinnung wird die Fluidität des Blutes gewährleistet und nach Verletzungen des Gefäßsystems ein übermäßiger Blutverlust durch Bildung eines Blutgerinnungspropfs verhindert. Die kaskadenartige Aktivierung der Blutgerinnung wird durch positive Rückkopplungsmechanismen erheblich beschleunigt. Die Regulation erfolgt unter Beteiligung der Oberfläche von Endothelzellen und Thrombozyten sowie der subendothelialen Strukturen.

Eine Fehlregulation des Hämostasesystems oder Defekte beteiligter Faktoren können pathologisch entweder zu Blutungen oder zu Thrombosen führen (Müller-Berghaus, 1998).

### ***1.1.1 Das plasmatische Gerinnungssystem***

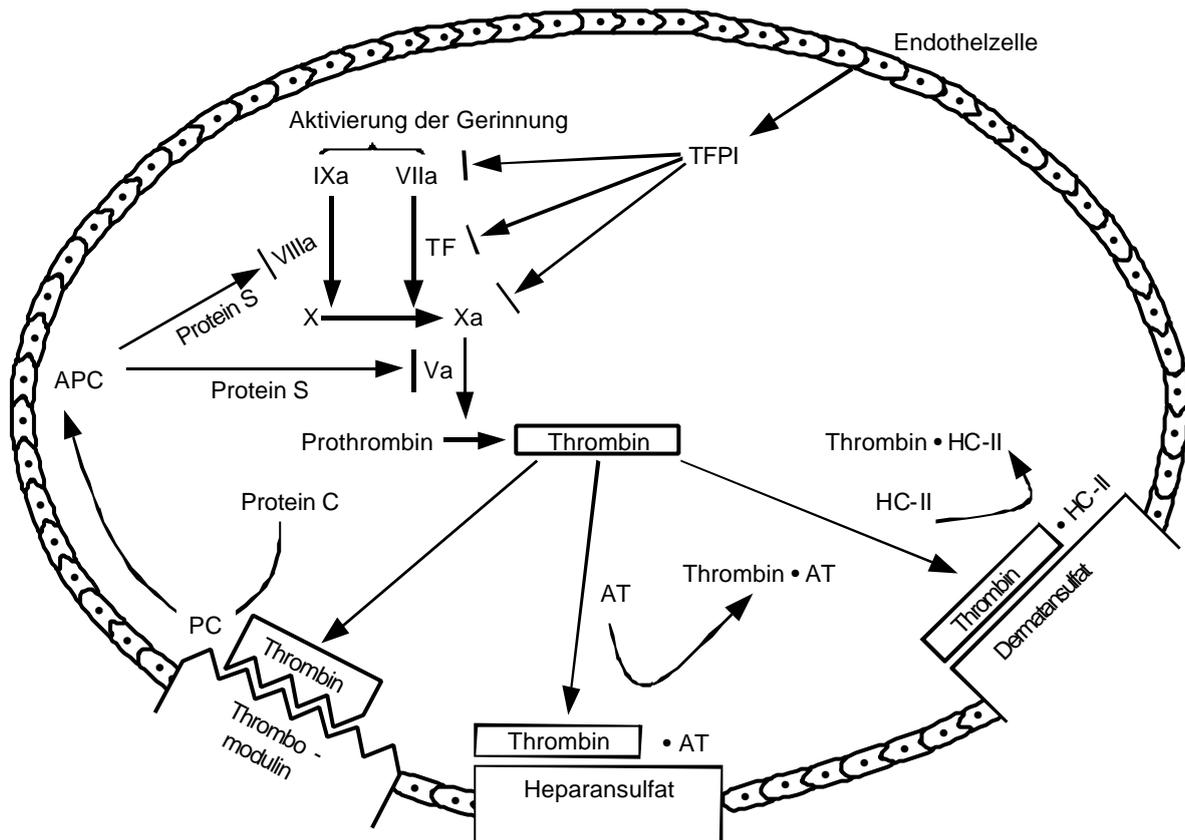
Die plasmatische Gerinnung gipfelt nach einer Gerinnungskaskade in der Bildung eines Fibrinpolymers, das zusammen mit dem Thrombozytenpfropf zum Verschluss einer Gefäßläsion beiträgt. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt über proteolytische Spaltung der plasmatischen Gerinnungs- oder Plasmafaktoren, die im Blut als Proenzyme vorliegen. Während es sich bei den aktivierten Formen von Prothrombin (Faktor II) und den Faktoren VII, IX, X, XI und XII um Serinproteasen handelt, sind die Faktoren V und VIII keine Enzyme, jedoch in ihrer aktivierten Form als Cofaktoren von entscheidender Bedeutung. Aus didaktischen Gründen wurde die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade bis heute in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg unterteilt. Das intrinsische System beginnt mit der Kontaktaktivierung der Gerinnungsfaktoren XII und XI durch negativ geladene subendotheliale Strukturen.

Am Ende der Gerinnungskaskade wird Prothrombin durch Faktor Xa in Gegenwart von Faktor Va, Calcium und einer Phospholipid-Oberfläche aktiviert (Davie et al., 1991; Furie und Furie, 1992). Die proteolytische Spaltung zweier Peptidbrücken durch Faktor Xa bewirkt die Aktivierung des Prothrombins in Thrombin, das seinerseits proteolytisch die Fibrinopeptide A und B des Fibrinogens entfernt und somit die Bildung des Fibringerinnsels einleitet. Außerdem aktiviert Thrombin die Cofaktoren Faktor V und Faktor VIII sowie Faktor XIII. Faktor XIII katalysiert die Quervernetzung von Fibrin und stimuliert die Thrombozytenaggregation (Furie und Furie, 1992). Die Kaskade der plasmatischen Gerinnungsaktivierung mit ihren Inhibitoren zeigt Abb. 2.

**Intrinsischer Weg**

**Abb. 2: Kaskade der plasmatischen Gerinnungsaktivierung mit Inhibitoren** (aus Müller-Berghaus, 1998). Verstärkerschleifen sind als dicke Pfeile und aktivierte Faktoren durch ein angehängtes „a“ gekennzeichnet. KK: Kallikrein, HK: hochmolekulares Kininogen, C1-Inh: C1-Inhibitor, α<sub>1</sub>PI: α<sub>1</sub>-Proteinase-Inhibitor, TF: Tissue Factor, TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor, AT: Antithrombin.

Dem Thrombin werden zusätzlich auch antikoagulatorische Funktionen zugeschrieben. Eine wichtige Rolle spielen dabei zellgebundene Rezeptoren an der Oberfläche endothelialer Strukturen. Hierbei besitzt das konstitutiv auf dem Gefäßendothel exprimierte Thrombomodulin eine wichtige Funktion. Thrombin aktiviert, gebunden an Thrombomodulin und in Gegenwart von Protein S, Protein C. Aktiviertes Protein C (APC) degradiert proteolytisch die aktivierten Faktoren V und VIII, was zu einer Inhibierung des Koagulationsprozesses führt (Esmon, 1983). Weitere Bestandteile des antikoagulatorischen Systems neben Thrombomodulin, Protein C und Protein S sind Antithrombin III, Heparin-Kofaktor II und Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Eine Übersicht der verschiedenen antikoagulatorischen Funktionen der Endothelzelle ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3: Antikoagulatorische Aktivitäten der Endothelzelle** (aus Müller-Berghaus, 1998). Aktivierte Faktoren sind durch ein angehängtes „a“ gekennzeichnet. APC: Aktiviertes Protein C, AT: Antithrombin, HC-II: Heparin-Kofaktor II, TF: Tissue Factor, TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor.

Wird Antithrombin über Heparansulfat an die Endothelzellmembran gebunden, kann es durch Inhibition von Thrombin zur negativen Regulation der Koagulation beitragen (Preissner, 1996). Eine ähnliche Inhibition von Thrombin erfolgt durch Heparin-Kofaktor II (HC-II) an der Endothelzelloberfläche gebunden an Dermatan-sulfat (Briginshaw und Shanberge, 1974; Tollefsen und Blank, 1981; Tollefsen et al., 1983). TFPI schließlich wird von Endothelzellen gebildet, sezerniert und zirkuliert frei im Blut. Durch Bildung eines Komplexes mit Tissue Factor (TF), Faktor VIIa und Faktor Xa wird die Aktivierung des extrinsischen Weges der Gerinnung herunterreguliert (Broze und Miletich, 1987; Broze, 1994; Lindahl et al., 1992). Das komplizierte Zusammenspiel prokoagulatorischer und antikoagulatorischer Faktoren bedingt eine strikte Kontrolle der beteiligten Faktoren.

### ***1.1.2 Das fibrinolytische System***

Das Fibrinolyse-System begrenzt als Gegenspieler der Koagulation die Gerinnungsbildung und baut Fibringerinnsel nach erfolgter Wundheilung ab, um so den Blutfluss wieder herzustellen. Gleichzeitig besitzt es auch Funktionen bei der Degradation der extrazellulären Matrix, z. B. in Phasen des Wachstums und bei der Tumormetastasierung. Das Schlüsselenzym ist Plasmin, das nach Aktivierung des Zymogens Plasminogen durch *Tissue-type Plasminogen Activator* (t-PA) oder *Urine-type Plasminogen Activator* (u-PA) Fibrin spaltet und so zur Lyse des Gerinnsels beiträgt. Plasminogen bewirkt die Spaltung einer breiten Palette an Substraten. Verschiedene Kontrollmechanismen dienen zur Begrenzung der proteolytischen Aktivität auf den Bereich des Fibringerinnsels. So bewirkt der Abbau von Fibrin durch Plasmin eine positive Rückkopplung durch Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen Plasminogen und Fibrin (Bachmann, 1994).

Die intrinsische Aktivierung der Fibrinolyse erfolgt wie beim plasmatischen Gerinnungssystem über die Kontaktaktivierung. Beteiligt sind die Faktoren XIIa, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen (HK; Müller-Berghaus, 1998). Der Synthesort der Serinprotease Plasminogen ist die Leber. Der Aktivator der extrinsischen Fibrinolyse t-PA hingegen wird erst nach Stresseinwirkung von Endothelzellen gebildet und sezerniert (van Hinsbergh, 1988). t-PA bindet über Lysinbindungsstellen an Fibrin, was mit einer Konformationsänderung des t-PA-Moleküls und einer dadurch bedingten erhöhten Bindungsaffinität an Plasminogen einhergeht. Beide Faktoren binden an die Fibrinmatrix unter Bildung eines trimolekularen Komplexes. Auch diese fibrinabhängige Aktivierung führt zu einer Begrenzung der proteolytischen Aktivität auf den Bereich des Fibringerinnsels (Priglinger und Binder, 1998).

Das inaktive Zymogen Pro-u-PA wird von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen oder Tumorzellen gebildet. Pro-u-PA bindet über seine EGF-Domäne an den u-PA-Rezeptor (u-PAR). Das gebundene Zymogen wird dann an der Zelloberfläche über ebenfalls gebundenes Plasminogen/Plasmin in seine aktive Form, u-PA, überführt und aktiviert seinerseits über einen Verstärkermechanismus wiederum Plasminogen. u-PA-Rezeptoren sind vor allem auf adhärennten Zellen an den fokalen Zellkontakten zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix und an Zell-Zellkontakten exprimiert und begrenzen damit die u-PA-vermittelte Fibrinolyse auf bestimmte Zelloberflächen.

Zur Regulation der Fibrinolyse tragen Inhibitoren aus der Familie der Serpine bei.

### ***1.1.3 Thrombophilie***

Mit Thrombophilie wird eine erhöhte Neigung zu Thrombosen bezeichnet. Ursachen hierfür können erworbene oder angeborene Defekte in der Hämostase, dem Fibrinolysesystem oder der Thrombozytenregulation sein. Diese werden auch als thrombophile Diathesen bezeichnet (Pabinger und Lechner, 1998). Vielfach liegt eine angeborene Thromboseneigung vor, die entweder auf dem Defekt eines Gens oder auf der Kombination mehrerer Mutationen beruht. So können z. B. Antithrombin-, Protein C- und Protein S-Mangel durch eine Anzahl verschiedener Mutationen hervorgerufen werden (Lane et al., 1993; Reitsma et al., 1995; Mustafa et al., 1995). Bei Patienten mit APC-Resistenz ist im Gegensatz dazu in mehr als 80 % der Fälle die Faktor V-Leiden Mutation nachweisbar (Bertina et al., 1994).

Der Antithrombin-Mangel gehört zu den angeborenen thrombophilen Diathesen mit Inhibitormangel. Er zeichnet sich durch verminderte Inaktivierung von Thrombin, Faktor Xa, Faktor IXa, Faktor XIa oder Faktor XIIa aus. Diese verringerte Inaktivierung wird verursacht durch Nonsense-Mutationen (Kettenabbruch durch Entstehung eines Stop-Codons) oder Missense-Mutationen (Veränderung einer Aminosäure) und seltener durch Deletionen. Ähnliche genetische Defekte liegen dem Protein C-Mangel zugrunde. Dieser ist gekennzeichnet durch verminderte Inaktivierung von Faktor Va und Faktor VIIIa, während bei Protein S-Mangel eine verminderte Protein C-Aktivität durch verringerte Aktivität des Kofaktors vorliegt.

Die APC-Resistenz oder Faktor V-Leiden Mutation ist verbunden mit einer gestörten Degradation von Faktor Va durch aktiviertes Protein C (APC). Dieser genetisch bedingte Defekt ist die Folge einer Punktmutation an Position 1691 im Faktor V-Gen.

Bei der Dysfibrinogenämie kommt es zu einer verminderten Bindung von Thrombin oder zu einer gestörten Stimulierung der t-PA induzierten Fibrinolyse durch abnormales Fibrin. Ursachen hierfür sind Punktmutationen an unterschiedlichen Stellen des Fibrinogenmoleküls, während der multifaktoriellen Hyperhomocysteinämie verschiedene Mutationen und Polymorphismen von Enzymen zugrundeliegen (Pabinger und Lechner, 1998).

Der G20210A-Polymorphismus im Prothrombingen, mit dem sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, führt zu einer erhöhten Prothrombinkonzentration im Plasma der betroffenen Patienten. Die Punktmutation liegt in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens und führt zu einer erhöhten Thromboseneigung (Poort et al., 1996).

## 1.2 Prothrombin

Prothrombin und seine enzymatisch aktive Form Thrombin spielen eine zentrale Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen. Dazu gehören neben seiner zentralen Funktion in Koagulation und Antikoagulation in der Hämostase auch die Induktion der Thrombozytenaggregation. Prothrombin wirkt außerdem chemotaktisch auf Makrophagen und ist beteiligt an der Regulation der Proliferation von Endothelzellen sowie anderer Zelltypen (Degen und Sun, 1998). Eine Liste der verschiedenen biologischen Funktionen des Prothrombins ist in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1: Funktionen von Prothrombin** (nach Degen und Sun, 1998).

Funktionen	Zellen oder Substrate
Koagulation	Fibrinogen, Faktoren V, VIII und XIII, Thrombozyten
Antikoagulation	Protein C
Gewebereparatur	Fibroblasten
Regulation der Immunantwort	T-Lymphozyten
Atherosklerose	Vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen
Myocardiale Ischämie und Infarkt	Cardiomyozyten, Purkinje-Fasern
Eliminierung der Synapsen in der Entwicklung	Periphere Motorneuronen
Zentrales Nervensystem	Neuronen, Astrozyten
Entzündungen	Monozyten, Makrophagen
Tumorzellmetastasen	Krebszellen

Der Hauptsyntheseort von Prothrombin befindet sich in der Leber (Barnhart, 1960, Jamison und Degen, 1991). Vitamin K wird zur Synthese des Einzelketten-Glycoproteins mit einem Molekulargewicht von 72000 Da (Barnhart, 1960, Mann und Elion, 1980) benötigt. Als Cofaktor einer Carboxylase wirkt Vitamin K im rauen Endoplasmatischen Retikulum, die an posttranslationalen Carboxylierungen von aminoterminalen Glutamatresten zu  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäuren (GLA) beteiligt ist. Die GLA-Reste des Prothrombins sind für seine calciumvermittelte Bindung an Phospholipidmembranen essentiell (Stenflo et al., 1974;

Nelsestuen et al., 1974; Magnusson et al., 1975). In Abwesenheit von Vitamin K ist Prothrombin nicht funktionell (Stenflo und Suttie, 1977).

Die Primärstruktur des humanen und bovinen Prothrombins wurde mittels Proteinsequenzanalyse (Magnusson et al., 1975; Butkowski et al., 1977; Thompson et al., 1977; Walz et al., 1977; Seegers, 1979) bestimmt und aus der cDNA-Sequenz abgeleitet (Degen et al., 1983; MacGillivray und Davie, 1984; MacGillivray et al., 1980).

Prothrombin wird zunächst in der Zelle in seiner Vorläuferform Pre-Pro-Prothrombin synthetisiert. Das Vorläufer-Protein enthält eine Pre-Pro-Sequenz (Aminosäuren -43 bis -1), die für die Sekretion und  $\gamma$ -Carboxylierung des Proteins verantwortlich ist. Diese Sequenz wird anschließend durch eine Signalpeptidase und eine Protease abgespalten.

Das frei im Blut zirkulierende Zymogen Prothrombin besteht aus 579 Aminosäureresten, 8 % Kohlenhydraten und 10 GLA-Resten (Magnusson et al., 1975; Degen et al., 1983; DiScipio et al., 1977). Funktionelle Domänen beinhalten eine GLA-Domäne, zwei Kringle-Strukturen und eine katalytische Domäne. Die Kringle-Domäne ist gekennzeichnet durch eine disulfidreiche, dreischleifige Struktur mit einer internen Homologie, die ca. 80 Aminosäuren umfasst (Magnusson et al., 1975). Kringle-Domänen interagieren mit Substraten, Cofaktoren oder Rezeptoren (Pathy et al., 1984; Pathy, 1985). So vermittelt die zweite Kringle-Struktur des Prothrombins die Bindung an ihren Cofaktor, Faktor Va (Esmon und Jackson, 1974; Kotkow et al., 1995).

Der GLA-Domäne am aminoterminalen Ende des Prothrombins folgen zwei Kringle-Domänen, an die sich carboxyterminal das aktive Zentrum anschließt. Die katalytische Domäne setzt sich aus den drei aktiven Aminosäureresten His-363, Asp-419 und Ser-525 zusammen.

Prothrombin lagert sich in Gegenwart von Calcium an Phospholipidoberflächen an und bildet mit Faktor Xa und Cofaktor Va zusammen den Prothrombinasekomplex. Die Anheftung an die Endothelmembran bewirkt die Beschränkung der folgenden prokoagulatorischen Ereignisse auf den Ort der Gefäßverletzung. Nach Aktivierung durch den Faktor Xa wird das gerinnungsfördernde Thrombin vom Aminoterminal des Proteins freigesetzt. Dabei verbleiben GLA- und Kringle-Domänen an der Zelloberfläche. Das 39 kDa Protein Thrombin besteht aus zwei Polypeptid-Ketten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die A-Kette des humanen Enzyms besteht aus 49 Aminosäuren, während sich die B-Kette aus 259 Aminosäureresten zusammensetzt. Thrombin bindet unter anderem spezifisch an Fibrinogen (Fenton et al., 1988), PAR-1 Thrombinrezeptor (Liu et al., 1991), Thrombomodulin (Tsiang et

al., 1990) und an Inhibitoren wie Hirudin (Markwardt, 1990; Rydel et al., 1990) und Heparin-Cofaktor II (Sheehan et al., 1993).

Die Thrombin-Aminosäuresequenz ist hochkonserviert. Die Regionen um das aktive Zentrum sind in allen bislang untersuchten Spezies identisch. Auch alle Cystein- und Tryptophan-Reste der B-Kette sind konserviert (Banfield und MacGillivray, 1992), was die funktionelle Bedeutung von Prothrombin im Organismus unterstreicht.

Die homozygote Deletion von Prothrombin in Mäusen führt embryonal zu einem partiell letalen Phänotyp: Ungefähr die Hälfte der homozygoten Mäuse stirbt während der Embryonalentwicklung, verursacht durch eine nicht intakte Dottersackmembran und damit verbundenen Blutungen. Die andere Hälfte stirbt innerhalb weniger Stunden nach der Geburt aufgrund von Blutungen (Sun et al., 1998).

### **1.2.1 Genstruktur**

Die komplette cDNA des humanen Prothrombingens wurde 1983 zuerst von Degen et al. veröffentlicht. Die Aufklärung der Genstruktur erfolgte 1987 von Degen und Davie. Das komplette Gen umfaßt 20241 bp vom Transkriptionsstartpunkt bis zur Polyadenylierungsstelle, bestehend aus 14 Exons und 13 Introns. Auffällig ist der hohe Anteil an repetitiven Sequenzen in den Introns, wobei diese 50 % des gesamten Gens ausmachen (Degen und Davie, 1987; Bancroft et al., 1990). Dazu gehören 41 Alu-Sequenzen, eingerahmt durch 5 bis 17 bp direkte Sequenzwiederholungen, die über das gesamte Prothrombingen verteilt sind. Auch andere repetitive Elemente, wie zwei Kopien partieller *Kpn* I-Sequenzen und einige Kopien mittelrepetitiver Sequenzen, sind Bestandteile des Gens (Degen und Davie, 1987; Degen, 1992). Durch Vergleich der Prothrombingensequenz mit Sequenzen der Datenbank GenBank wurden zusätzlich Homologien zweier Prothrombinregionen mit Regionen des humanen Gens für Adenosin-Desaminase gefunden (Degen, 1992).

Das humane Prothrombingen wurde auf Chromosom 11, nahe des Centromers, lokalisiert (Royle et al., 1987).

### **1.2.2 Regulation des Prothrombingens**

Der Transkriptionsstart des humanen Prothrombingens wurde einer Region 3 bis 38 bp stromaufwärts des Methionin-Startcodons zugeschrieben (Bancroft et al., 1990; Chow et al., 1991). Die Stelle, die die höchste Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz für Transkriptionsstartstellen aufweist, befindet sich 31 bp vor dem Translationsstart und wurde

mit +1 bezeichnet (Bancroft et al., 1990). Das Gen besitzt weder eine klassische TATA-Box noch eine CCAAT-Box.

Aufgrund der leberspezifischen Expression des Prothrombins (Barnhart, 1960; Jamison und Degen, 1991) sollten *cis*-regulatorische Elemente Einfluss auf die gewebespezifische Expression nehmen. DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die die Expression von leberspezifischen Proteinen steuern, wurden 1987 von Maniatis et al. und 1989 von Mitchell und Tijan beschrieben. Zu den *trans*-wirksamen Transkriptionsfaktoren gehören C/EBP (*CCAAT enhancer binding protein*), HNF- (*hepatocyte-specific nuclear factor*) 1, HNF-3A und die HNF-4-Proteinfamilie (DiSimone und Cortese, 1992).

Zur Aufklärung der wichtigsten *cis*-wirksamen Elemente in der 5'-Region des Prothrombingens wurden Chloramphenicol-Acetyltransferase- oder Wachstumshormon-Reportergenkonstrukte hergestellt, die unterschiedlich lange Fragmente aus der 5'-flankierenden Prothrombingensequenz enthielten (Bancroft et al., 1990; Chow et al., 1991; Bancroft et al., 1992). Diese Konstrukte wurden in die Lebercarcinomzelllinie HepG2, die nachweislich Prothrombin exprimiert (Fair und Bahnak, 1984), sowie andere Zelllinien transfiziert. Für das humane Gen konnte ein für die leberspezifische Expression essentielles, *cis*-wirksames Element an Position -919 bis -790 identifiziert werden (Bancroft et al., 1992). Nach Deletion dieser Region war weder in Leberzellen noch in anderen Zelllinien eine Expression des Reportergens detektierbar.

Mit Hilfe von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) und *Desoxyribonuclease I Footprinting* Analysen konnten 1991 Chow et al. und 1992 Bancroft et al. in Kernextrakten aus HepG2-Zellen verschiedene Proteine nachweisen, die in diesem Sequenzbereich an die DNA binden. Konkurrenz mit HNF-1- (*hepatocyte nuclear factor-1*) spezifischen Oligonukleotiden inhibierte die Bildung einiger dieser DNA-Proteinkomplexe. Zusätzlich wies eine Region zwischen -887 und -875 eine sehr hohe Ähnlichkeit zur Konsensussequenz der HNF-1-Bindungsstelle auf (Chow et al., 1991; Bancroft et al., 1992). Eine Beteiligung von HNF-1 an der Regulation der Expression ist bis heute nicht zweifelsfrei geklärt. Der Transkriptionsfaktor wurde aber in Zusammenhang mit der leberspezifischen Expression anderer Gene beschrieben (Courtois et al., 1988).

Proteinbindende Eigenschaften konnten auch für ein zweites Sequenzmotiv 5'-CCTCCC-3' (Position -850 bis -845) nachgewiesen werden. Es kommt als potentieller Enhancer der Transkription auch bei anderen leberspezifischen Genen vor (Chow et al., 1991).

Ein zusätzlicher DNA-Proteinkomplex im Bereich -919 bis -790 des Prothrombingens wurde sowohl mit HepG2 als auch mit HeLa-Kernextrakten in *DNase Footprints* gefunden. Dies

weist auf eine weitere, nicht-leberspezifische regulatorische Region hin (Bancroft et al., 1992).

Homologievergleiche mit dem bovinen Prothrombingen führten zur Identifizierung von zwei konservierten Regionen (Bancroft et al., 1990; Irwin et al., 1988). Es handelt sich um die Bereiche von -717 bis -581 und -108 bis -1 im humanen Gen, die eine Identität von 69 % bzw. 79 % zu den Regionen von -580 bis -443 und -110 bis -1 im bovinen Gen aufweisen. Obwohl diesen Sequenzabschnitten noch keine bekannte Funktion zugeordnet werden konnte, spricht der Grad der Konservierung für eine Beteiligung an der Genregulation. Besonders der Bereich direkt vor dem Transkriptionsstart von -110 bis -1 könnte potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten, die an der Initiation der Transkription und der basalen Promotoraktivität beteiligt sind.

Durch einen Vergleich mit der murinen Prothrombin 5'-flankierenden Sequenz konnten zwei konservierte Regionen identifiziert werden (Degen und Sun, 1998). Dazu gehört der Bereich der potentiellen HNF-1-Bindungsstelle (Nukleotide -921 bis -844), der eine 70 %ige Identität zur murinen Sequenz aufweist, und der Bereich vor dem Transkriptionsstart, der zu 79 % mit den murinen Sequenzen übereinstimmt.

Zu den wichtigsten, bisher identifizierten regulatorischen Elementen des Prothrombingens gehört demnach die potentielle Promotorregion, die einen Bereich von ca. 100 bp vor dem Transkriptionsstart umfaßt. Die zweite Region von Position -717 bis -581 weist eine große Homologie mit dem bovinen Prothrombingen auf. Bislang konnte noch keine regulatorische Funktion nachgewiesen werden. Die dritte Region im Bereich der Nukleotide -919 bis -790 umfaßt vermutlich zwei regulatorische Elemente. Zum ersten eine potentielle HNF-1-Bindungsstelle, verantwortlich für die leberspezifische Prothrombinexpression, und zum Zweiten eine nicht-gewebespezifische Proteinbindungsstelle, bei der es sich um ein Enhancer-Element handeln könnte.

### ***1.2.3 Die G20210A-Mutation im Prothrombingen***

Auf der Basis von populationsgenetischen Untersuchungen wurde eine G-A-Punktmutation in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des Prothrombingens als ein unabhängiger genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer Thrombophilie beschrieben (Poort et al., 1996). Möglicherweise ist der bei Mutationsträgern im Vergleich mit einem Kontrollkollektiv erhöhte Prothrombinplasmaspiegel für die Thromboseneigung verantwortlich.

Eine Vielzahl von Untersuchungen der Prävalenz der Mutation in verschiedenen Patientenkollektiven und Bevölkerungsgruppen sind bisher veröffentlicht worden. Der

G20210A-Polymorphismus ist der häufigste Risikofaktor für venöse Thrombosen in der spanischen Bevölkerung (Souto et al., 1998). Die Literaturübersicht in Tab. 2 zeigt einen Vergleich der Prävalenz der Prothrombinmutation bei Patienten mit einer Vorgeschichte an venöser Thrombose mit einem Kontrollkollektiv. Das relative Thromboserisiko für Patienten ist in allen Fällen erhöht.

**Tab. 2: Prävalenz der Prothrombinmutation.** Der Prozentsatz der Patienten mit einer Vorgeschichte an venöser Thrombose, die eine G20210A-Mutation tragen, wurde bestimmt und mit dem Prozentsatz der Mutationsträger eines Kontrollkollektivs ohne Vorgeschichte an venöser Thrombose verglichen. Daraus konnte von den Autoren das relative Thromboserisiko berechnet werden. Dieses relative Thromboserisiko bezeichnet das für Mutationsträger erhöhte Risiko, an einer Thrombose zu erkranken. k. A.: keine Angaben.

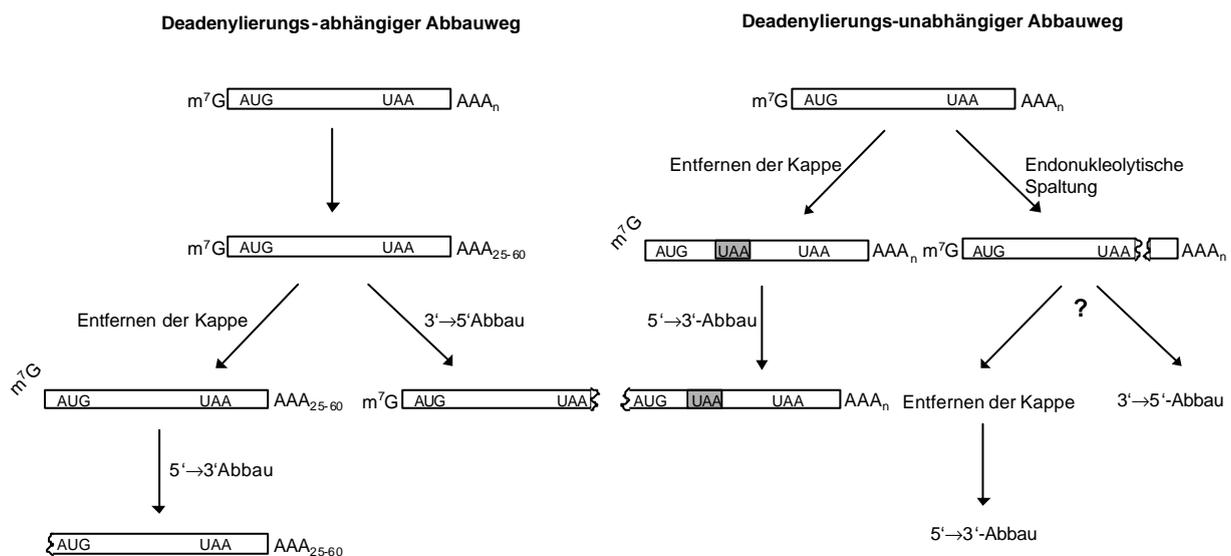
Referenz	Jahr	Patienten	Kontrollen	rel. Thromboserisiko
Arruda et al.	1997	4,3 %	0,7 %	6,6
Brown et al.	1997	5,0 %	2,6 %	2,0
Cumming et al.	1997	5,5 %	1,2 %	5,4
Ferraresi et al.	1997	16,0 %	4,0 %	k. A.
Makris et al.	1997	7,9 %	0,7 %	k. A.
Poort et al.	1996	6,2 %	2,3 %	2,8
Souto et al.	1998	17,2 %	6,5 %	3,1
Tosetto et al.	1999	4,3 %	3,4 %	1,3

Die Mutation G20210A liegt am 3'-Ende des 3'-untranslatierten Bereichs an der Polyadenylierungsstelle des Prothrombingens und betrifft damit das letzte Nukleotid der mRNA (Degen und Davie, 1987). Die Lage der Mutation lässt darauf schließen, dass die Struktur des Proteins nicht beeinflusst wird. Da bei Mutationsträgern die Prothrombin-Konzentration im Plasma erhöht ist, wird eine verlängerte Halbwertszeit der 20210A Prothrombin-mRNA diskutiert. Ebenso wäre es möglich, dass die Mutation die Transkriptions- oder Translationseffizienz verbessert oder zu einer erhöhten Prozessierungsrate der Prä-mRNA am 3'-Ende führt. Mutationen, die zu einer vermehrten Genexpression führen, sind bislang wenig bekannt. Der molekulare Mechanismus, der der

Erhöhung des Plasma-Prothrombinspiegels bei heterozygoten und homozygoten Trägern der Mutation zugrunde liegt, ist bis heute noch nicht vollständig untersucht.

### 1.3 mRNA-Stabilität in Eukaryoten

Die Halbwertszeiten verschiedener *messenger* RNAs variieren zwischen wenigen Minuten und mehreren Tagen. Damit ist die Stabilität einer mRNA ein wichtiges Kriterium für die Genregulation und ist somit für die Höhe der Expression ebenso entscheidend wie die Regulation der Transkription. Regulatorische Elemente in der 3'-UTR, aber auch in der kodierenden Region der mRNA, sowie die Länge des Poly A-Endes entscheiden über die mRNA-Stabilität. Der Abbau einer mRNA beginnt meist mit der Verkürzung des Poly A-Endes, der Deadenylierung, auf eine Länge von 25 bis 60 Adenosin-Resten bei Säugern (Brown und Sachs, 1998; Abb. 4).



**Abb. 4: Abbauwege der mRNA in Eukaryoten** (nach Beelman und Parker, 1995).

Anschließend erfolgt der Abbau vom 5'-, 3'-Ende oder von internen Schnittstellen aus. Das Poly A-Ende liegt assoziiert mit Poly A-Bindeproteinen (PABP) vor, die die mRNA vor nichtspezifischer 3'→5'-Exonukleaseaktivität schützen (Abb. 6a). Die Deadenylierung führt in der Regel zunächst zur Entfernung der 5'-Kappe, entweder durch indirekte Wirkung nach Veränderung der subzellulären Lokalisation oder durch direkte Wirkung nach Interaktionen zwischen 5'- und 3'-Ende und damit Bildung einer mRNP- (mRNA-Proteinkomplex)

Struktur. Nach Verkürzung des Poly A-Endes können Poly A-Bindeproteine nicht mehr binden, was dann zur Zerstörung des mRNP-Komplexes führt.

Die 5'-Methylguanosin-Kappe wird durch den Translationsinitiationskomplex eIF4F gebunden, bestehend aus dem *cap*-Bindeprotein eIF4E, dem Translations-Initiationsfaktor eIF4G und dem Protein eIF4A (McCarthy, 1998; Pestova und Hellen, 1999; Mitchell und Tollervey, 2000). eIF4G interagiert mit eIF3 und rekrutiert damit die 40 S ribosomale Untereinheit. eIF4G bindet auch das Poly A-Bindeprotein (Tarun und Sachs, 1996; Wells et al., 1998; Imataka et al., 1998) und formt einen ternären Komplex mit dem *cap*-Bindeprotein eIF4E (Gingra et al., 1999). Dieser Komplex zirkularisiert die mRNA *in vitro* (Wells et al., 1998), fördert die Translation und könnte gleichzeitig die mRNA stabilisieren, indem er die Deadenylierung und die Entfernung der 5'-Kappe verhindert (Gao et al., 2000 und 2001; Dehlin et al., 2000; Wilusz et al., 2001). Damit ist die Regulation der mRNA-Degradation mit der Initiation der Translation verbunden (Linz et al., 1997; Welch und Jacobson, 1999, Michel et al., 2000).

Die Deadenylierungs-unabhängige Entfernung der 5'-Kappe wird als mRNA „Surveillance“ bezeichnet. Sie spielt eine Rolle bei der schnellen Degradation aberranter Transkripte, d. h. mRNAs mit frühen Nonsense-Codons, nicht gespleißten Introns oder extrem langen 3'-Bereichen. Mit dieser Überwachungsfunktion wird die Expression verkürzter Proteine verhindert (Culbertson, 1999; Czaplinski et al., 1999; Hilleren und Parker, 1999).

Der Abbau durch endonukleolytische Spaltung erfolgt bei einigen mRNAs über Endonuklease-Schnittstellen und unabhängig von Deadenylierung oder Entfernung der 5'-Kappe. Bei der  $\alpha$ -Globin-, Transferrin-Rezeptor- (TR) und der *Xenopus Xlhbox2B*-mRNA z. B. ist diese in der 3'-UTR lokalisiert (Wang und Kiledjian, 2000; Binder et al., 1994; Brown et al., 1993). Bei der *c-myc*-mRNA befindet sie sich dagegen in der kodierenden Region (Bernstein et al., 1992). Schutzfaktoren können hierbei durch Maskierung der Schnittstelle oder durch direkte Regulation der Endonuklease-Aktivität die Geschwindigkeit des Abbaus modulieren.

### **1.3.1 Regulatorische mRNA-Sequenzen**

Bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression sind die untranslatierten Regionen einer mRNA von großer Bedeutung. Sie sind beteiligt an der Modulation des mRNA-Transports vom Nukleus in das Cytoplasma, an der Translationseffizienz (van der Welden und Thomas, 1999), an der subzellulären Lokalisation der mRNA (Jansen, 2001) und an der Regulation ihrer Stabilität (Bashirullah et al., 2001). Inzwischen ist bekannt, dass

Mutationen in der 3'-untranslatierten Region zu Erkrankungen führen können (Conne et al., 2000).

Dabei erfolgt die Regulation über untranslatierte Regionen durch *cis*-regulatorische Sequenzmotive, an die Proteine binden, oder aber durch Sekundärstrukturen. Diese spielen bei der Regulation auf RNA-Ebene eine größere Rolle als bei der Regulation auf DNA-Ebene, bei der die Primärstruktur im Vordergrund steht (Mignone et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, dass durch Bindung von komplementären nicht-kodierenden RNA-Molekülen an Sequenzelemente in einigen untranslatierten Regionen eine Modulation der Genexpression erfolgt (Sweeney et al., 1996). Repetitive Elemente können in 5'-untranslatierten Regionen einiger mRNAs die Translationseffizienz der betreffenden mRNA beeinflussen (Timchenko, 1999).

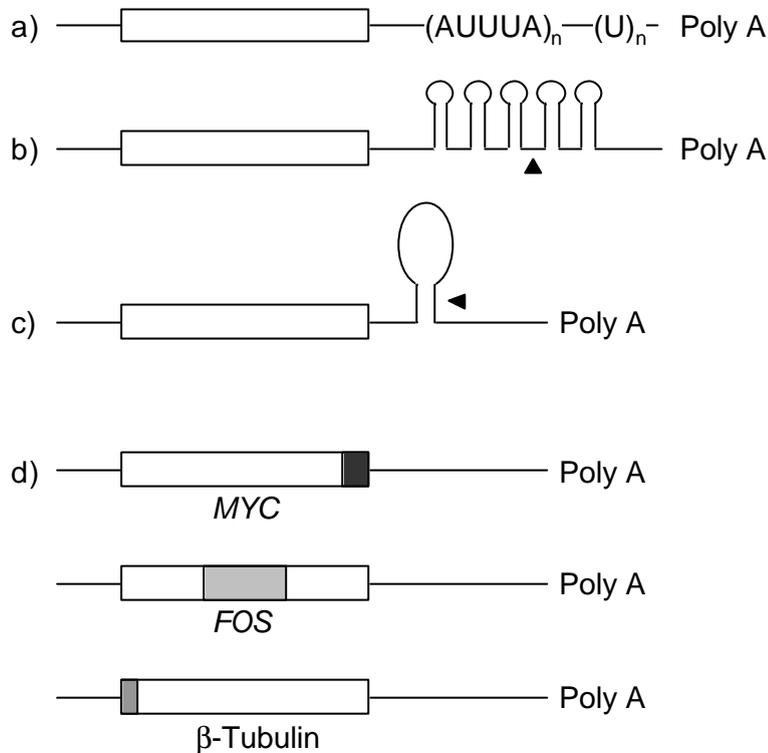
Die Länge der 3'-untranslatierten Regionen ist, auch innerhalb einer Spezies, sehr variabel und rangiert zwischen 12 und mehreren tausend Nukleotiden (Pesole et al., 2001). Außerdem können untranslatierte Regionen eines Gens durch unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte, Polyadenylierungsstellen oder alternatives Splicing, abhängig vom Gewebe und dem Entwicklungs- oder Krankheitsstadium, variieren (Grabowski und Black, 2001).

Zu den bisher bekannten *cis*-regulatorischen Elementen, die die Abbaurate einer mRNA beeinflussen, gehören die AU-reichen Elemente (AREs, Abb. 5a). Sie sind in der 3'-untranslatierten Region lokalisiert und destabilisieren die betreffende mRNA. Die Einteilung erfolgt in drei Klassen (Chen und Shuy, 1995; Mignone et al., 2002). Die Klassen I und II sind charakterisiert durch mehrere Kopien des Pentanukleotids AUUUA, das bei Klasse III AREs nicht auftritt (Peng et al., 1996).

Klasse I AREs, die hauptsächlich bei nukleären Transkriptionsfaktoren, z. B. *c-fos* und *c-myc*, aber auch bei Cytokinen wie Interleukin-4 und -6 vorkommen, kontrollieren die cytoplasmatische Deadenylierung durch gleichmäßige Degradation des Poly A-Endes bis zu einem Rest von 30 bis 60 Nukleotiden. Im Anschluss daran erfolgt die komplette Degradation der mRNA. Strukturelle Merkmale sind eine oder mehrere Kopien des Pentanukleotid-Sequenzmotivs AUUUA in unmittelbarer Nachbarschaft einer U-reichen Region.

Klasse II AREs vermitteln dagegen eine asynchrone cytoplasmatische Deadenylierung, d. h. verschiedene Transkripte werden unterschiedlich schnell degradiert. Hierbei wird das Poly A-Ende komplett abgebaut. Dieses Sequenzmotiv ist charakterisiert durch Tandem Reiterationen des AUUUA-Pentamers und einer stromaufwärts gelegenen AU-reichen Region. Klasse II AREs wurden z. B. für die Cytokine GM-CSF, Interleukin-2, *Tumor necrosis factor a* und Interferon- $\alpha$  beschrieben (Lagnado et al., 1994; Mignone et al., 2002).

Klasse III AREs enthalten im Gegensatz zu Klasse I und II AREs kein AUUUA-Motiv. Sie signalisieren die Degradation der mRNA, z. B. die von *c-jun*, über ein U-reiches Element (Peng et al., 1996).

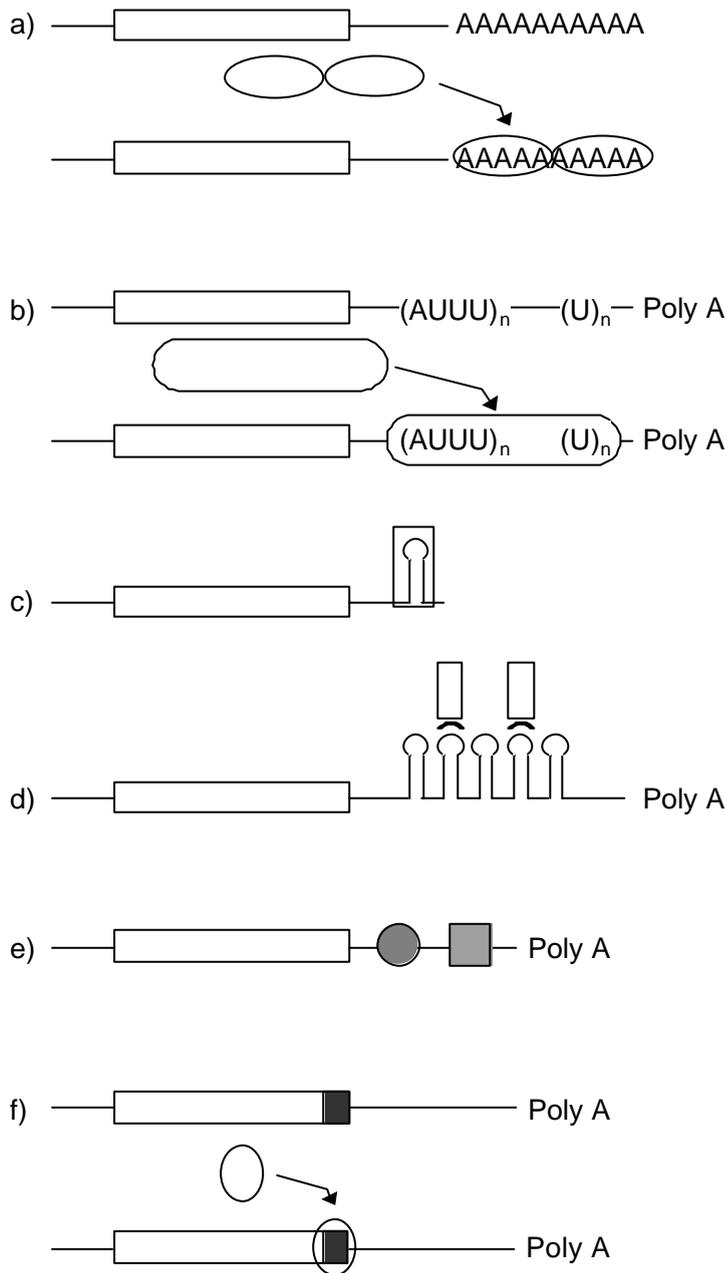


**Abb. 5: Regulatorische Sequenzen und Strukturen, die die Halbwertszeit einer eukaryotischen mRNA beeinflussen** (Darstellung nach Ross, 1996).

- AU- und U-reiche Regionen (AREs) destabilisieren die mRNA (z. B. *c-fos*- und *c-myc*-mRNA). In Transfektionsexperimenten destabilisieren AREs die  $\beta$ -Globin-mRNA (Shaw und Kamen, 1986).
- Stem-Loop-Elemente in der 3'-UTR bieten Bindungsstellen für regulatorische Proteine (z. B. Transferrin-Rezeptor-, Histon-mRNA). Die Endonuklease-Schnittstelle der Transferrin-Rezeptor-mRNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.
- Stem-Loop-Regionen dienen als endonukleolytische Schnittstellen (z. B. *insulin-like growth factor II*-mRNA).
- Stabilitätsdeterminanten in der kodierenden Region offerieren Proteinbindungsstellen.

Als regulatorische Proteine, die an AU- und U-reiche Regionen binden und zur Modulation der Degradation der betreffenden mRNA beitragen, wurden hnRNP D (AUF1; Zhang et al., 1993) und HuR (Ma et al., 1996; Myer et al., 1997) identifiziert (Abb. 6b). HnRNP D bindet sowohl an DNA (Dempsey et al., 1998a) als auch an RNA (Swanson und Dreyfuss, 1988) und besteht aus vier Isoformen p37, p40, p42 und p45 (Dempsey et al., 1998b). Alle Isoformen enthalten zwei RNA-Erkennungsmotive (*RNA recognition motifs*, RRM) und sind in Nukleus und Cytoplasma lokalisiert (Zhang et al., 1993). Überexpression von hnRNP D führt

in verschiedenen Zellsystemen zu einer erhöhten AUUUA-vermittelten mRNA-Degradation (Loflin et al., 1999). Dabei ist die Modulation der Degradation an die zelluläre Lokalisation des hnRNP D gekoppelt: Hitzeschock, Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges oder Inaktivierung des *El ubiquitinating enzyme* resultieren in der Translokation des hnRNP D in den Nukleus von HeLa-Zellen (Larota et al., 1999).



**Abb. 6: mRNA-bindende Proteine** (Darstellung nach Ross, 1996).

- a) Poly A-Bindeprotein (PABP) schützt vor Degradation.
- b) HnRNP D und HuR binden an AU-reiche Regionen, was zu Destabilisierung bzw. Stabilisierung der mRNA führt.
- c) Protein bindet an Stem-Loop-Struktur der Histon-mRNA und beeinflusst mRNA-Transport, Translation und Abbaurate.

- d) IRE-Bindeproteine stabilisieren die Transferrin-Rezeptor-mRNA durch Bindung an *iron response elements* (IREs) und Maskierung der Endonuklease-Schnittstelle.
- e) Zwei Proteinbindungsstellen in der 3'-UTR der Ribonukleotid-Reduktase 2-mRNA beeinflussen die Stabilität der mRNA.
- f) Protein schützt *myc*-mRNA vor Abbau durch Bindung in der kodierenden Region.

HuR wird ubiquitär exprimiert und gehört zur ELAV- (*embryonic lethal abnormal vision*) Familie RNA-bindender Proteine (Ma et al., 1996; Good, 1995). Im Gegensatz zu hnRNP D stabilisiert eine Überexpression von HuR nach transienter Transfektion mRNA-Transkripte mit Klasse I und II AREs und zu einem geringeren Prozentsatz auch Klasse III AREs (Fan und Steitz, 1998a; Peng et al., 1998). Für eine mRNA-stabilisierende Funktion von HuR spricht auch, dass *antisense* HuR-RNA den Abbau ARE-tragender Transkripte beschleunigt (Wang et al., 2000a; Wang et al., 2000b). HuR besitzt wie andere Proteine der Hu-Familie drei klassische RNA-Erkennungsmotive (RRMs). Im Falle von HuD scheint die Erkennung des ARE-Sequenzmotivs durch die beiden ersten RRM's zu erfolgen, während das dritte vermutlich an das Poly A-Ende der mRNA bindet (Ma et al., 1997). Auch für HuR wurde eine Kolokalisation in Nukleus und Cytoplasma beschrieben. Dabei zeichnet eine neue *Shuttling*-Sequenz für den Transport zwischen Kern und Cytoplasma verantwortlich, die zwischen zweitem und drittem RNA-Erkennungsmotiv gelegen ist und als HNS bezeichnet wird (Fan und Steitz, 1998a; Fan und Steitz, 1998b).

Eine von Deadenylierung und Entfernung der 5'-Kappe unabhängige Degradation wurde für die Transferrin-Rezeptor-mRNA beschrieben. Der Abbau erfolgt endonukleolytisch in der 3'-UTR an einer sequenzspezifischen Schnittstelle (Binder et al., 1994; Abb. 5b). In unmittelbarer Nähe der Schnittstelle sind Sekundärstrukturen (*stem-loop structures*) lokalisiert, die als *iron-responsive elements* (IREs) bezeichnet werden und reversibel das IRE-Bindeprotein binden (Abb. 6d). Bei Eisenmangel maskieren IRE-Bindeproteine das Destabilisierungselement, was zu einer Erhöhung der Halbwertszeit der Transferrin-Rezeptor-mRNA führt.

Sequenzbereiche innerhalb der kodierenden Region können ebenfalls an der Regulation der Stabilität einer mRNA beteiligt sein.

---

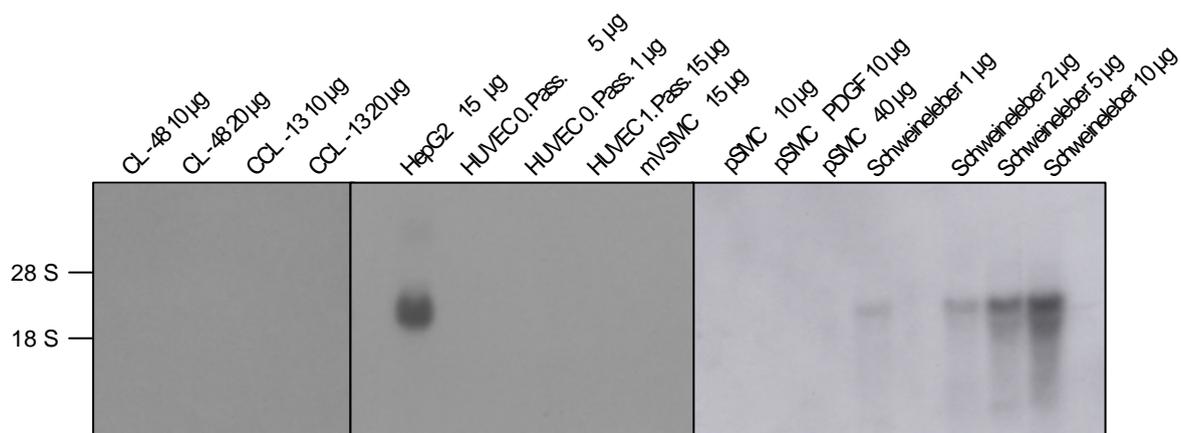
## 1.4 Zielsetzung

Der G20210A Prothrombin-Polymorphismus ist bei Trägern der Mutation mit einer erhöhten Prothrombinkonzentration im Plasma verbunden. Die Mutation ist in der 3'-untranslatierten Region lokalisiert. Da die Struktur des Proteins demnach nicht durch die Mutation beeinflusst wird, könnten die erhöhten Plasmaspiegel kausal mit einer erhöhten mRNA-Stabilität, Transkriptionseffizienz, Translationsrate oder einer verbesserten Prozessierung des Transkripts in Zusammenhang stehen. Der molekulare Mechanismus, der zur Erhöhung des Plasma-Prothrombinspiegels bei heterozygoten und homozygoten Trägern der Mutation führt, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den molekularen Zusammenhang zwischen erhöhter Prothrombinkonzentration und G20210A-Mutation aufzuklären. Zur Untersuchung des Einflusses der G20210A-Punktmutation auf die Halbwertszeit bzw. Stabilität der mRNA sollte die 3'-untranslatierte Region des Prothrombingens in ein Reportergensystem inseriert und stabil in einer Hepatozyten-Zelllinie exprimiert werden. Die Halbwertszeiten der Wildtyp- und G20210A-mRNA sollten verglichen werden, und ferner sollte die Halbwertszeit des endogenen Prothrombins und des rekombinanten Proteins in Hepatozyten und anderen Zelllinien ermittelt werden. Außerdem sollte die transkriptionswirksame Aktivität des Prothrombin 3'-UTR-Fragments in einem geeigneten Reportergensystem getestet werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Expression von Prothrombin in Säugerzellen

Die Expression von Prothrombin wurde sowohl in den etablierten Leber-Zelllinien HepG2, CL-48 und CCL-13, als auch in verschiedenen primären Zellen und als Positivkontrolle in Schweineleber mittels Northern Blot Analyse untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus humanen HepG2-Zellen, Endothelzellen (HUVEC), vaskulären glatten Muskelzellen aus Maus und Schwein, sowie aus Schweineleber präpariert. Nach Auftrennung der RNA in einem denaturierenden Agarosegel und Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten, humanen Prothrombin-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Als Hybridisierungssonde wurde ein 1046 bp großes *Sst* I-Restriktionsfragment der humanen Prothrombin-cDNA (Nukleotidposition 1 bis 1046, Acc. No. J00307) eingesetzt.



**Abb. 7: Expression von Prothrombin in verschiedenen Säugerzellen und Geweben.** Gesamt-RNA wurde aus den Leber-Zelllinien HepG2, CL-48, CCL-13 und verschiedenen primären Zellen (HUVEC, mVSMC: vaskuläre glatte Muskelzellen aus Maus, pSMC: glatte Muskelzellen aus Schweinearterie) sowie aus Schweineleber isoliert. Die in der Abbildung angegebenen RNA-Mengen wurden in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten 1 kb Prothrombin-cDNA-Sonde (*Sst* I-5'-Restriktionsfragment). Die Expositionszeit betrug 16 h mit einer Signalverstärkerfolie. PDGF: Stimulation der glatten Muskelzellen mit *platelet derived growth factor*-AB (10 ng/ml).

Abb. 7 zeigt wie erwartet eine hohe Prothrombinexpression in der leberspezifischen Zelllinie HepG2 und in Schweineleber. Aufgrund der großen Homologie des Prothrombins in verschiedenen Spezies hybridisiert die humane Sonde auch mit Prothrombin-mRNA aus Schwein. Keine Expression von Prothrombin konnte dagegen in den Leberzelllinien CL-48,

CCL-13 und SK-HEP-1 (Daten nicht gezeigt), in primären Zellen wie humanen Endothelzellen und in glatten Muskelzellen aus Maus und Schwein nachgewiesen werden. Für die Untersuchung der Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA und regulatorischer Elemente des Prothrombingens wurde deshalb die Zelllinie HepG2 verwendet.

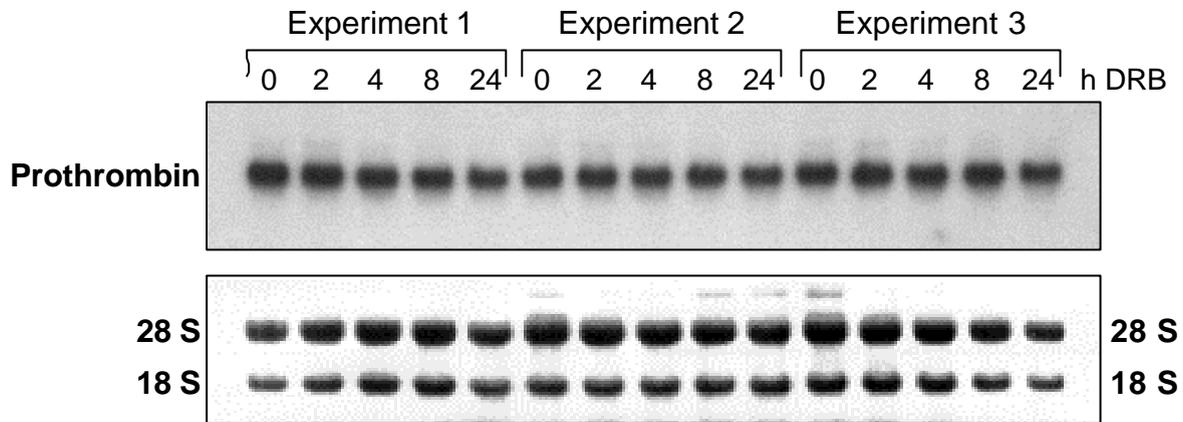
## **2.2 Bestimmung der Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA**

Die Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA wurde in der humanen Lebercarcinomzelllinie HepG2 (Aden et al., 1979; Knowles et al., 1980) und in primären Hepatozyten, isoliert aus Wistar-Ratten, bestimmt. Die Expression von Prothrombin in der humanen Leberzelllinie HepG2 wurde 1984 von Fair und Bahnak beschrieben.

### **2.2.1 Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in HepG2-Zellen**

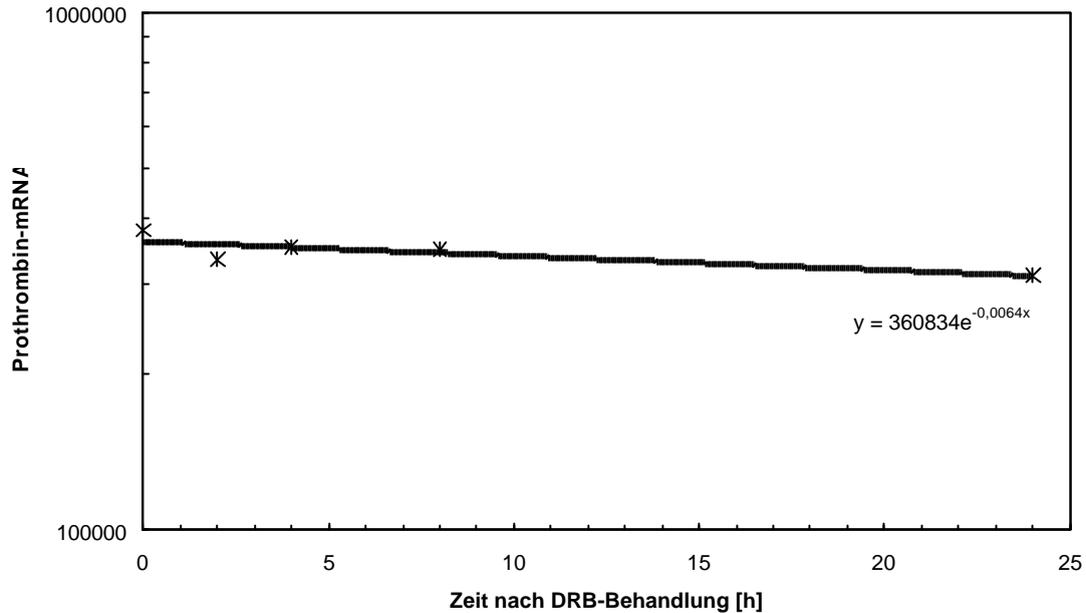
Die Stabilität einer spezifischen mRNA wurde mit der *RNA synthesis inhibitor-chase method* (Egyhazi, 1974 und 1976; Sehgal und Tamm, 1978) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Inhibition der RNA-Transkription durch unterschiedliche Inhibitoren. Verwendet wurden Actinomycin D, das die gesamte RNA-Synthese in der Zelle durch Interkalierung in die DNA blockiert, oder 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Benzimidazol (DRB), ein Analogon von Adenosin, das selektiv und reversibel die Synthese heterogener, nukleärer RNA, ein Vorläufer cytoplasmatischer mRNA, durch Blockierung der RNA-Polymerase II hemmt. Die Abbaugeschwindigkeit bzw. die Halbwertszeit der mRNA kann dann durch Quantifizierung der Transkriptmenge über einen bestimmten Zeitraum hinweg bestimmt werden, da keine neue RNA synthetisiert wird. Die Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA in der humanen Leberzelllinie HepG2 wurde nach Auswertung von acht Experimenten mit  $53,9 \pm 14,6$  h bestimmt. Dazu wurden HepG2-Zellen drei bis vier Tage in RPMI-Vollmedium, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 40 U/ml Penicillin beziehungsweise 40 mg/ml Streptomycin, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 60 mm-Gewebekulturschalen kultiviert. Die Inhibition der Transkription erfolgte wahlweise durch Einwirkung von Actinomycin D oder DRB über 24 h. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,5 ml D<sup>+</sup>-Lösung (Chomzcinsky und Sacchi, 1987) lysiert und die RNA präpariert. Zur Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit von Prothrombin wurden je 10  $\mu$ g Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarosegel für 1 ½ h bei 70 V aufgetrennt, auf eine positiv geladene

Nylonmembran transferiert und mit einer 1 kb-Prothrombin-cDNA-Sonde hybridisiert (1 kb 5'-Sst I-Restriktionsfragment der humanen Prothrombin-cDNA, isoliert aus dem Plasmid pBS-Prothr.-cDNA). Abb. 8 zeigt exemplarisch drei voneinander unabhängige Experimente.



**Abb. 8: Northern Blot Analyse der Prothrombin-Expression in HepG2-Zellen nach DRB-Behandlung.** Je 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit DRB aus HepG2-Zellen isoliert, in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Prothrombin-Sonde hybridisiert. Die Expositionszeit betrug 16 h mit einer Signalverstärkerfolie. Die 28 S und 18 S rRNA-Banden wurden zur Überprüfung des gleichmäßigen Auftrags mit Methylenblau nach dem RNA-Transfer auf der Membran angefärbt.

Nach 16-stündiger Exposition des Filters mit einem PhosphorImager-Screen erfolgte die Quantifizierung im PhosphorImager. Die Rohdaten wurden in Abhängigkeit von der Dauer der Actinomycin D bzw. DRB-Behandlung halblogarithmisch in einem Diagramm aufgetragen und die exponentielle Regression  $N = N_0 \cdot e^{-I t}$  bestimmt (Abb. 9).



**Abb. 9: Bestimmung der exponentiellen Regression zur Berechnung der Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in HepG2-Zellen.** HepG2-Zellen wurden für 24 h mit DRB behandelt und die Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten danach präpariert. Die spezifische Prothrombin-mRNA-Menge wurde nach Northern Blot Analyse im PhosphorImager quantifiziert. Die Rohdaten wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Dauer der DRB-Behandlung im Diagramm aufgetragen. Die exponentielle Regression  $y = 360834e^{-0,0064x}$  wurde in EXCEL bestimmt.

Die Halbwertszeit wurde berechnet nach  $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{I}$ . Die Halbwertszeiten der verschiedenen

Versuche wurden gemittelt und die Standardabweichung  $s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 \cdot (\sum x)^2}{n \cdot (n-1)}}$  berechnet.

### 2.2.2 Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in primären Rattenleberzellen

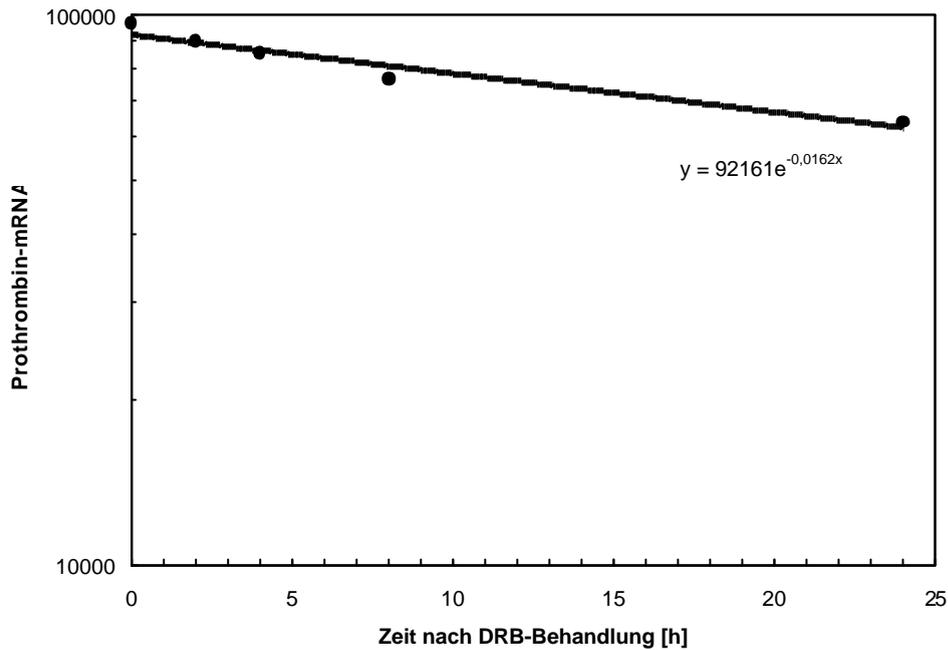
Die Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA in primären Hepatozyten betrug nach Auswertung von fünf DRB-Versuchen  $49,1 \pm 11,1$  h. Dazu wurden aus zwei Wistar-Ratten primäre Hepatozyten isoliert, einen Tag in M199-Medium, versetzt mit 3 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,5 nM Insulin und 5 nM Dexamethason bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für 24 h mit DRB behandelt, um die Transkription zu hemmen. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und mit 0,5 ml Trireagenz lysiert. Zur Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit von Prothrombin wurden je 10 µg Gesamt-RNA in einem Triethanolamingel 1 ½ h bei 70 V aufgetrennt, auf eine positiv

geladene Nylonmembran transferiert und mit einer 1 kb-Prothrombin-cDNA-Sonde hybridisiert (1 kb 5'-*Sst* I-Restriktionsfragment der humanen Prothrombin-cDNA aus pBS-Proth.-cDNA). Abb. 10 zeigt exemplarisch Filterfärbung und Northern Blot Hybridisierung dreier unabhängiger Experimente.



**Abb. 10: Northern Blot Analyse der Prothrombin-Expression in primären Rattenleberzellen nach DRB-Behandlung.** Je 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit DRB aus primären Hepatozyten isoliert, in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Prothrombin-Sonde hybridisiert. Die Expositionszeit betrug 16 h mit einer Signalverstärkerfolie. Die 28 S und 18 S rRNA-Banden wurden mit Methylblau nach dem RNA-Transfer auf der Membran angefärbt.

Die Quantifizierung erfolgte nach 16-stündiger Exposition des Filters mit einem PhosphorImager-Screen im PhosphorImager. Die Rohdaten wurden in Abhängigkeit der DRB-Behandlungsdauer halblogarithmisch in einem Diagramm aufgetragen und die exponentielle Regression  $N = N_0 \cdot e^{-I t}$  bestimmt.



**Abb. 11: Bestimmung der exponentiellen Regression zur Berechnung der Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in Hepatozyten.** Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit DRB behandelt und die Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert. Die spezifische Prothrombin-mRNA-Menge wurde nach Northern Blot Analyse im PhosphorImager quantifiziert und die Rohdaten halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Dauer der DRB-Behandlung im Diagramm aufgetragen. Die exponentielle Regression  $y = 92161e^{-0,0162x}$  wurde bestimmt.

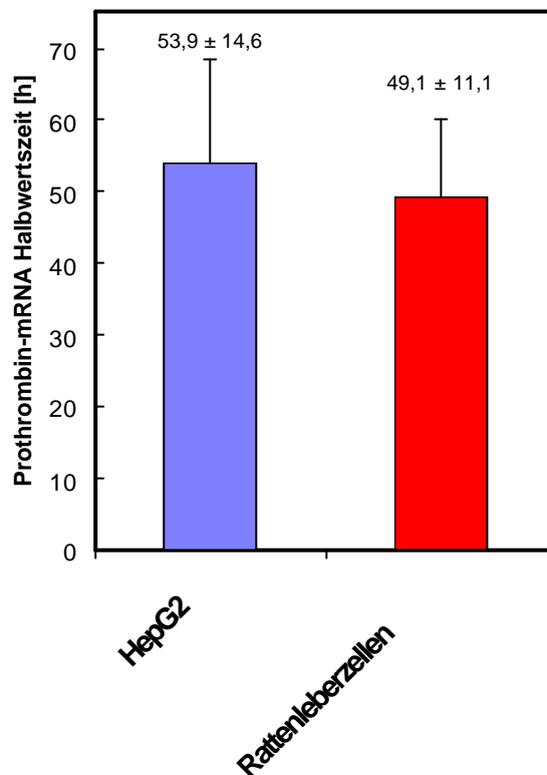
Die Halbwertszeit  $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{I}$  wurde bestimmt. Anschließend wurden die Halbwertszeiten von fünf voneinander unabhängigen DRB-Versuchen gemittelt und die Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 \cdot (\sum x)^2}{n \cdot (n-1)}} \text{ berechnet.}$$

### 2.2.3 Vergleich der Halbwertszeiten der endogenen Prothrombin-mRNA aus HepG2 und Rattenleberzellen

Die endogene Prothrombin-mRNA-Halbwertszeit in der Zelllinie HepG2 wurde in acht voneinander unabhängigen *RNA synthesis inhibitor-chase* Versuchen, wahlweise entweder durch Inhibition der RNA-Synthese mittels Actinomycin D oder DRB, ermittelt. Im Vergleich dazu wurde die Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA auch in einem primären Zellkultursystem bestimmt. Dazu wurden Hepatozyten aus Ratten isoliert, mit DRB behandelt

und die RNA zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert. Durch Quantifizierung der Signale nach Northern Blot Hybridisierung konnte die Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA in fünf voneinander unabhängigen Versuchen nach exponentieller Regression bestimmt werden. Anschließend wurde jeweils ein Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 grafisch dargestellt. Die Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA betrug  $53,9 \pm 14,6$  h in der humanen Lebercarcinomzelllinie HepG2 und  $49,1 \pm 11,1$  h in primären Rattenleberzellen. Die Mittelwerte beider Versuchsreihen weichen nicht signifikant voneinander ab, was die Berechnung des zweiseitigen Student'schen t-Tests ( $p = 0,55$ ) in EXCEL zeigt.



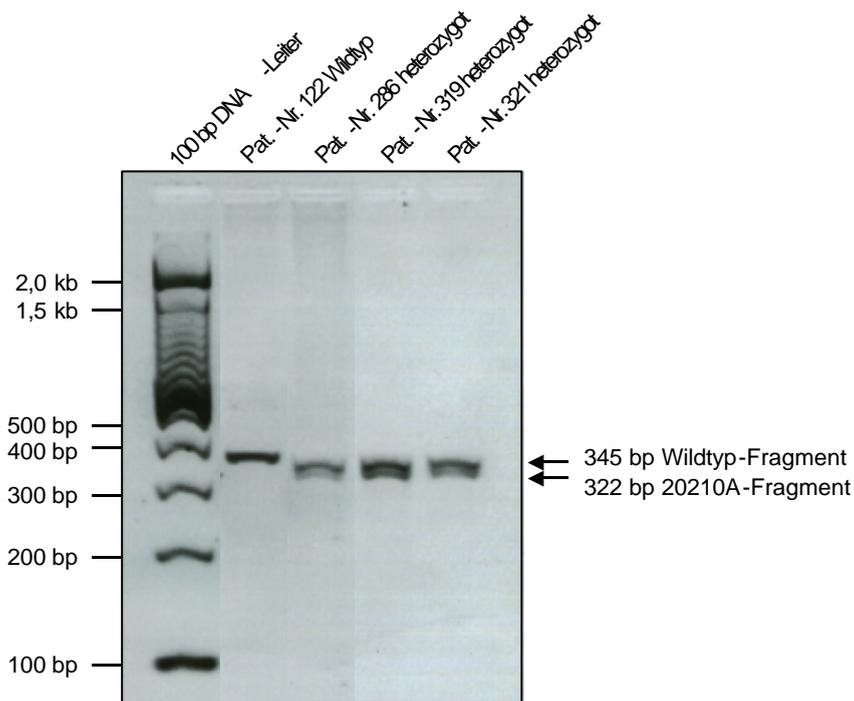
**Abb. 12: Vergleich der Prothrombin-mRNA-Halbwertszeiten.** HepG2-Zellen und primäre Hepatozyten wurden über 24 h mit 20  $\mu\text{g/ml}$  DRB bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$  Actinomycin D behandelt, um die RNA-Transkription zu hemmen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inhibition wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA präpariert. In der Northern Blot Analyse wurde die Prothrombin-mRNA quantifiziert und durch Regression die Halbwertszeit berechnet. Zur Bestimmung der Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA in HepG2-Zellen und Ratten-Hepatozyten wurden acht bzw. fünf Versuche gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die Werte sind im Diagramm angegeben.

## 2.3 Analyse der mRNA-Halbwertszeit von $\beta$ -Globin-Prothrombin-Reporterkonstrukten

### 2.3.1 Klonierung von Prothrombin-Reporterkonstrukten

Zur Untersuchung des Einflusses der Prothrombin 3'-Region und der G20210A-Mutation in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens auf die mRNA-Halbwertszeit wurde die bis jetzt bekannte 3'-untranslatierte und flankierende Region des Gens (Acc. No. M17262) in ein  $\beta$ -Globinreporterplasmid inseriert. Der Vektor pCMV $\beta$ *Xho* (Nanbu et al., 1994) trägt den CMV-Promotor sowie die 5'-untranslatierte Region, Exons 1 bis 3, Intron 2 und die 3'-untranslatierte Region des Kaninchen  $\beta$ -Globingens. Zusätzlich enthielt der Vektor eine durch Punktmutation kreierte *Xho* I-Klonierungsstelle 22 bp vor dem Polyadenylierungssignal AATAAA des  $\beta$ -Globingens (Proudfoot und Brownlee, 1976; Proudfoot, 1991).

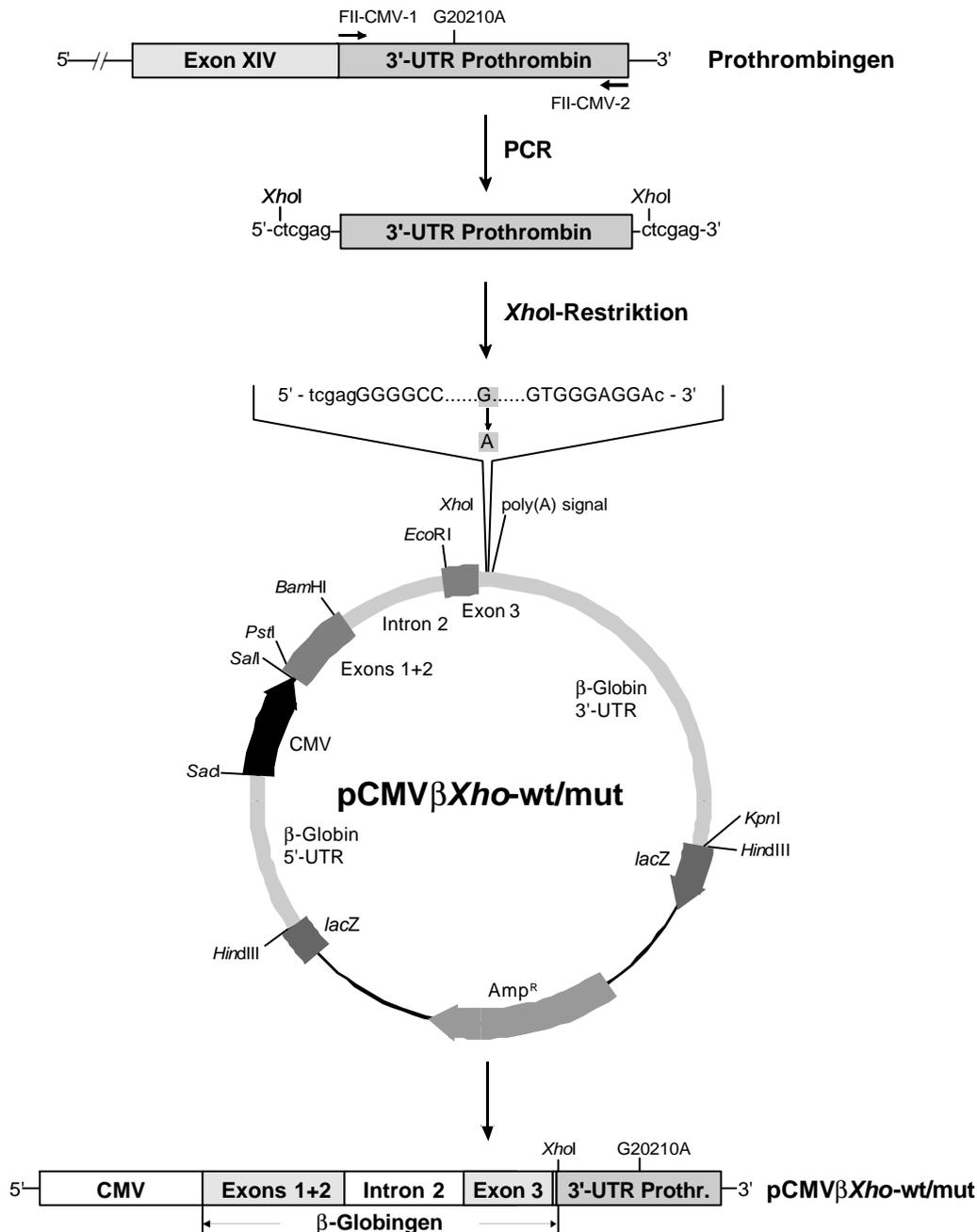
Als Template für die Amplifikation der 3'-Region des Prothrombingens wurde genomische DNA aus Blut von Patienten isoliert, die bezüglich der G20210A-Mutation heterozygot waren. Diese DNA wurde durch Amplifikation eines 345 bp Prothrombinfragments mit den Oligonukleotiden FII-1 und FII-2 (Poort et al., 1996) auf die G20210A-Mutation überprüft. Mit dem Primer FII-2 wurde durch Transition C→T an Position 20214 eine *Hind* III-Restriktionsstelle in das PCR-Fragment eingeführt, falls der Patient die G20210A-Mutation trug. Durch anschließende Restriktion der PCR-Produkte mit *Hind* III und Analyse der Fragmente im Agarosegel konnten Wildtyp-Prothrombin (345 bp Fragment), heterozygote Patienten (345 bp und 322 bp Fragmente) und homozygote Patienten (322 bp Fragment) identifiziert werden (Abb. 13).



**Abb. 13: Bestimmung des G20210A-Genotyps aus Patienten-DNA.** Ein 345 bp Prothrombinfragment wurde mit den Oligonukleotiden FII-1 und FII-2 aus genomischer DNA von Patienten amplifiziert. Die Fragmente wurden einer *Hind* III-Restriktion unterzogen und in einem 2,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Der Wildtyp zeigt ein 345 bp Fragment (Patient-Nr. 122). Bei heterozygoten Patienten lassen sich zwei Fragmente bei 345 bp und 322 bp identifizieren (Pat.-Nr. 286, 319 und 321).

Eine 240 bp 3'-untranslatierte und flankierende Region des Prothrombingens (Position 20114, direkt nach dem Stopcodon, bis 20353, Acc. No. M17262) wurde aus der genomischen DNA heterozygoter Patienten mit dem Primerpaar FII-CMV-1 (Pos. 20114 bis 20134 des Prothrombingens und *Xho* I-Restriktionsschnittstelle) und FII-CMV-2 (Pos. 20353 bis 20333 und *Xho* I-Schnittstelle) amplifiziert, einer *Xho* I-Restriktion unterzogen und in den linearisierten Vektor pCMV $\beta$ *Xho* inseriert (Abb. 14). DH5 $\alpha$ -Zellen wurden transfiziert und die Plasmid-DNA aus verschiedenen Klonen präpariert. Die durch Restriktion mit *Xho* I als positiv identifizierten Klone wurden auf Wildtyp und G20210A-Polymorphismus überprüft. Dazu wurde eine PCR mit dem Primerpaar FII-CMV-1 und FII-2 durchgeführt. Mit dem Primer FII-2 wurde durch Transition C $\rightarrow$ T an Position 20214 eine *Hind* III-Restriktionsstelle in das PCR-Fragment eingeführt, falls das Plasmid die G20210A-Mutation trug. Durch anschließende Restriktion der PCR-Produkte mit *Hind* III und Agarosegelanalyse konnten Wildtyp-Klone (129 bp Fragment) pCMV $\beta$ *Xho*-wt und G20210A-Klone (106 bp Fragment)

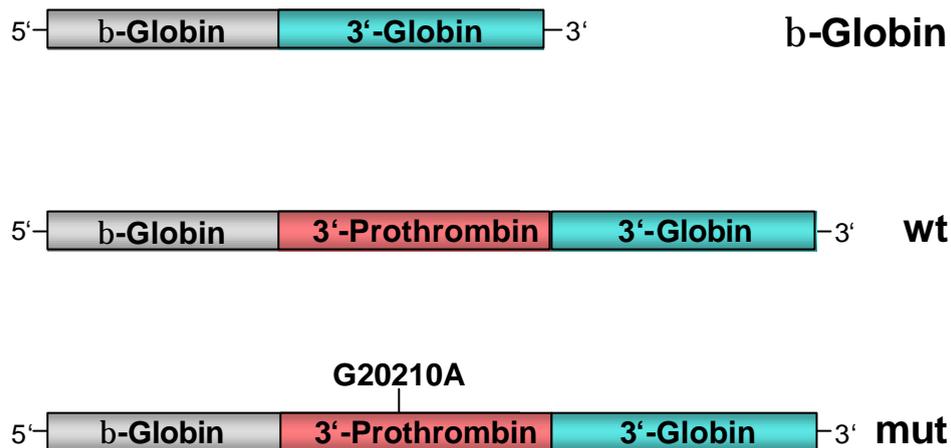
pCMV $\beta$ Xho-mut identifiziert werden. Zuletzt wurde die korrekte Basenfolge mittels Sequenzierung bestätigt.



**Abb. 14: Herstellung von Prothrombin-Reportergenkonstrukten.** Aus genomischer DNA heterozygoter Patienten (G20210A-Mutation) wurde mittels PCR die 3'-UTR und 3'-flankierende Sequenzen des Prothrombingens amplifiziert. Teile der Prothrombingensequenz sind in Großbuchstaben, Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme in Kleinbuchstaben dargestellt. Nach Xho I-Restriktion wurden Wildtyp- und G20210A-Fragmente in die Xho I-Schnittstelle des Vektors pCMV $\beta$ Xho inseriert. Im unteren Teil der Abbildung ist eine schematische Abbildung der entstandenen Konstrukte dargestellt. CMV: Cytomegalovirus-promotor.

### 2.3.2 Stabile Expression von *b*-Globinreporterkonstrukten in HepG2-Zellen

Für die Transfektion von HepG2-Zellen wurde ein Laborstamm verwendet, der keine endogene Prothrombin-Expression aufwies. Die verschiedenen  $\beta$ -Globinkonstrukte (Abb. 15) wurden zunächst durch *Kpn* I-Restriktion linearisiert und mittels Lipofectin-Transfektion oder Elektroporation zusammen mit dem Vektor pSV2*neo* in HepG2-Zellen cotransfiziert (Kap. 5.5).



**Abb. 15: *b*-Globinreportergenkonstrukte.** Die in Transfektionsexperimenten untersuchten  $\beta$ -Globinkonstrukte sind schematisch dargestellt. wt: Reporter-genkonstrukt mit Wildtyp 3'-Prothrombinregion, mut: Reporter-genkonstrukt mit G20210A 3'-Prothrombinregion.

Als Kontrolle dienten Konstrukte mit der 3'-Prothrombinregion in 3'→5'-Orientierung (wt-f und mut-f) transfiziert. Nach Kultivierung der Zellen in G418-haltigem Selektionsmedium wurden jeweils 60 bis 500 Klone vereinigt. Die Analyse eines Pools aus vielen stabil transfizierten Klonen bietet den Vorteil, dass der Einfluss, den Insertionsort und Anzahl der ins Genom integrierten Konstrukte auf die Expressionshöhe des rekombinanten Proteins haben, minimiert wird. Für jedes Reporterplasmid wurden so drei stabil transfizierte Mischklone angelegt. Die Zellen wurden unter Selektionsdruck weiter passagiert, die genomische DNA isoliert und mittels PCR auf die Insertion des entsprechenden Reporterhybrids getestet.

### 2.3.3 Vergleich der Transkriptmengen von Wildtyp und Mutante

Zunächst wurden die Transkriptmengen der 20210G- und der 20210A-Hybrid-mRNA verglichen. Drei voneinander unabhängige Populationen an stabil transfizierten Klonen wurden pro Konstrukt untersucht. Für jeden Mischklon wurden mindestens 60 Klone

vereinigt. Je 10 µg Gesamt-RNA aus den stabil transfizierten Zellen wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und der Filter mit einer <sup>32</sup>P-markierten Kaninchen β-Globin-spezifischen cDNA-Sonde aus pGEM-glo1 (Vakalopoulou et al., 1991) hybridisiert. Diese Sonde hybridisierte nicht mit der humanen β-Globin-mRNA der Zellen. Dabei wurden jeweils ein Wildtyp- und ein 20210A-Transfektionspool zusammen auf einem Filter analysiert. Ein Quervergleich ist aufgrund unterschiedlicher Hybridisierungsbedingungen nicht möglich. Die Signale wurden schließlich im PhosphorImager quantifiziert und miteinander verglichen. Eine Gegenüberstellung der Werte zeigt Tab. 3.

**Tab. 3: Vergleich der Expression von b-Globin 20210G/A-Prothrombin-Hybriden.** Angegeben sind die Hintergrund-korrigierten Rohdaten des PhosphorImagers. wt: 20210G 3'-Prothrombinregion; mut: 20210A 3'-Prothrombinregion; wt/mut: Quotient aus wt und mut.

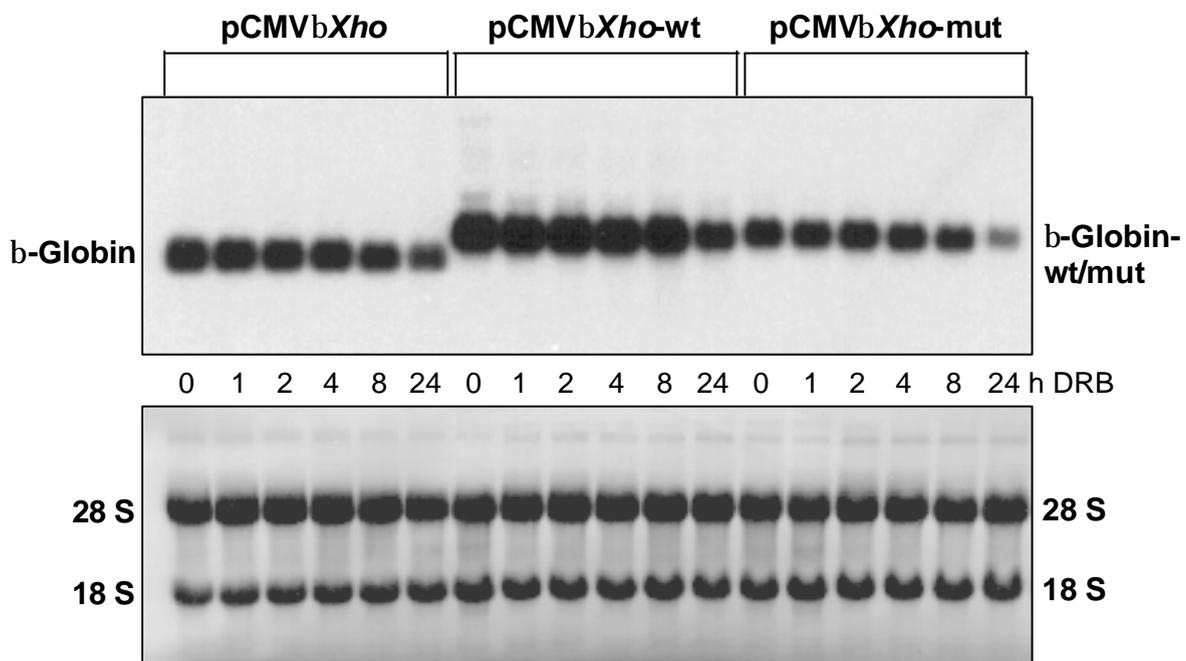
Transfektion	wt	mut	wt/mut
1	1564293	500865	3,1
2	529750	439358	1,2
3	192405	182857	1,1

Die Analyse der Transkriptmengen ergab keinen Hinweis auf eine durch die 20210A-Variante verlängerte Halbwertszeit oder erhöhte Transkription der β-Globin-Hybride. Allerdings ist die absolute Menge an gebildeter mRNA abhängig von Anzahl der ins Genom integrierten Klone, dem Insertionsort und der Anzahl der vereinigten Klone. Die Unterschiede in der Expressionshöhe lassen sich vermutlich darauf zurückführen.

### **2.3.4 Bestimmung der Halbwertszeit der Hybrid-mRNA**

Stabil transfizierte HepG2-Zellen wurden hinsichtlich der Stabilität der Prothrombin mRNA untersucht. Für die Bestimmung der Halbwertszeit der β-Globin-Prothrombin Hybrid-mRNA wurden jeweils drei Zellpopulationen zur Inhibierung der Transkription während eines Zeitraumes von 0, 1, 2, 4, 8 und 24 h mit DRB behandelt und die RNA präpariert. Die RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und der Filter mit einer <sup>32</sup>P-markierten Kaninchen β-Globin-spezifischen cDNA-Sonde aus pGEM-glo1 hybridisiert. Die Sonde hybridisierte nicht mit der humanen β-Globin-mRNA der

Zellen. Abb. 16 zeigt exemplarisch die Northern Blot Analyse dreier verschiedener Experimente. Daraus ist ersichtlich, dass die  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybridtranskripte gegenüber dem  $\beta$ -Globintranskript um ca. 240 bp verlängert sind. Weiterhin sind die absoluten Mengen an Wildtyp-mRNA (pCMV $\beta$ Xho-wt) um den Faktor 3,1 höher als bei der Mutante (pCMV $\beta$ Xho-mut; vergl. Tab. 3, Transfektion 1). Die Signale wurden im PhosphorImager quantifiziert und die Rohdaten halblogarithmisch in Abhängigkeit der DRB-Behandlungsdauer in einem Diagramm aufgetragen. Nach der Bestimmung der exponentiellen Regression  $N = N_0 \cdot e^{-I t}$  in EXCEL wurde die Halbwertszeit der mRNA-Hybride bestimmt nach  $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{I}$ .



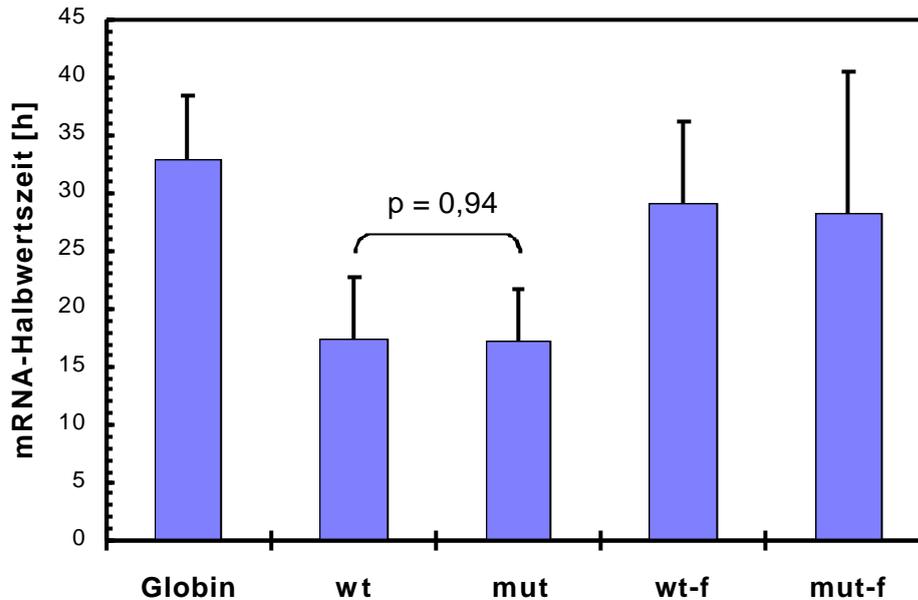
**Abb. 16: Northern Blot Analyse der  $\beta$ -Globin-Hybrid-mRNA.** Je 10  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung von stabil mit  $\beta$ -Globinreportergenkonstrukten transfizierten HepG2-Zellen mit DRB isoliert, in einem 1,5%igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer  $^{32}$ P-markierten  $\beta$ -Globin-Sonde (320 bp *Hind* III/*Bam*HI-Restriktionsfragment der Kaninchen  $\beta$ -Globin-cDNA aus pGEM-glo1) hybridisiert. Die Expositionszeit mit einer Signalverstärkerfolie betrug 16 h. Die 28 S und 18 S rRNA wurde mit Methylenblau nach dem RNA-Transfer auf der Membran angefärbt, um gleiche Auftragsmengen sicherzustellen.

Insgesamt wurde die Halbwertszeit der  $\beta$ -Globin-Hybride aus fünf bis sechs Experimenten in je drei stabil transfizierten Mischklonen aus 60 bis 500 Klonen gemittelt und die Standardabweichung berechnet (Tab. 4).

**Tab. 4: Halbwertszeiten der  $\beta$ -Globin-mRNA-Hybride.** Die Anzahl der voneinander unabhängigen DRB-Versuche ist unter n aufgelistet. Für jedes Reporterkonstrukt wurden drei verschiedene Transfektionen ein- bis zweimal untersucht.

<b><math>\beta</math>-Globin-mRNA</b>	<b>Halbwertszeit</b>	<b>n</b>
$\beta$ -Globin	$32,8 \pm 5,7$ h	5
wt	$17,4 \pm 5,3$ h	6
mut	$17,2 \pm 4,5$ h	6
wt-f	$29,1 \pm 7,1$ h	5
mut-f	$28,2 \pm 12,2$ h	5

Für die mRNA-Halbwertszeit der Kaninchen  $\beta$ -Globin-mRNA in HepG2-Zellen ergab sich ein Wert von  $32,8 \pm 5,7$  h. Nach Insertion der Prothrombin 3'-Region verringerte sich die Halbwertszeit der Hybrid-mRNA deutlich auf  $17,4 \pm 5,3$  h (wt) bzw.  $17,2 \pm 4,5$  h. Damit scheint diese Region relevante regulatorische Elemente zu enthalten. Die Halbwertszeiten der Kontrollkonstrukte, die die 3'-Prothrombinregion in 3'→5'-Orientierung enthielten (wt-f und mut-f) lagen dagegen deutlich höher ( $29,1 \pm 7,1$  h bzw.  $28,2 \pm 12,2$  h). Die Werte aus Tab. 4 sind in Abb. 17 als Balkendiagramm grafisch dargestellt.



**Abb. 17: Vergleich der Halbwertszeiten der  $\beta$ -Globin-Hybrid-mRNA.** Globin: Transfektion von HepG2-Zellen mit dem Vektor pCMV $\beta$ Xho, wt: pCMV $\beta$ Xho + 240 bp Wildtyp 3'-Prothrombin, mut: pCMV $\beta$ Xho + 240 bp G20210A 3'-Prothrombin, wt-f: pCMV $\beta$ Xho + 240 bp Wildtyp 3'-Prothrombin, 3'→5'-Orientierung, mut-f: pCMV $\beta$ Xho + 240 bp G20210A 3'-Prothrombin, 3'→5'-Orientierung. Der Wert  $p = 0,94$  wurde mit dem zweiseitigen Student'schen T-Test in EXCEL berechnet.

Nach dem zweiseitigen Student'schen t-Test weichen die Halbwertszeiten von Wildtyp (wt) und G20210A (mut)  $\beta$ -Globin-Prothrombin-mRNA nicht signifikant voneinander ab ( $p = 0,94$ ). Die Mutation trägt damit nicht wie erwartet zu einer verlängerten Halbwertszeit der Reporterengenkonstrukte in diesem Expressionssystem bei. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede zwischen Wildtyp und  $\beta$ -Globin-Ausgangsvektor sowie den Kontrollkonstrukten wt-f (enthält die Prothrombin 3'-Region in falscher Orientierung) und mut-f (enthält die G20210A 3'-Region in falscher Orientierung) signifikant (Tab. 5).

Vergleich	p (t-Test)
$\beta$ -Globin - wt	0,0073*
$\beta$ -Globin - mut	0,0007*
$\beta$ -Globin - wt-f	0,3883
$\beta$ -Globin - mut-f	0,4716
wt - mut	0,9366
wt - wt-f	0,0125*
mut - mut-f	0,0682
wt-f - mut-f	0,8992

**Tab. 5: Vergleich der Halbwertszeiten der  $\beta$ -Globinreporterkonstrukte.** Der Wert p wurde mit dem zweiseitigen Student'schen t-Test in EXCEL berechnet. Signifikante Abweichungen ( $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

### 2.3.5 Überprüfung des 3'-Endes der $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybride

Obwohl der 3'-untranslatierte Bereich von  $\beta$ -Globin und Prothrombin jeweils ca. 100 Basenpaare umfaßt, zeigte die Northern Blot Analyse in Abb. 16 ein um ca. 240 Basenpaare größeres Transkript im Falle der  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybride. Dies legte die Vermutung nahe, dass für die Prozessierung am 3'-Ende der Hybrid-mRNA nicht das Poly A-Signal der 3'-Prothrombinregion maßgeblich war, sondern das im Vektor weiter 3'-gelegene Poly A-Signal des Kaninchen  $\beta$ -Globingens. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden sowohl Wildtyp- als auch 20210A-mRNA-Hybride revers transkribiert und die Prozessierung am 3'-Ende durch Sequenzierung der cDNA untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus stabil mit den  $\beta$ -Globinkonstrukten transfizierten Zellpopulationen zunächst einer DNase I-Behandlung unterzogen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Phenol-Chloroform extrahiert und durch Fällung konzentriert. Mittels RT-PCR wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben, die dann spezifisch mit einem Oligo-dT-Primer sowie einem spezifischen  $\beta$ -Globinprimer, komplementär zu einer Sequenz 110 bis 90 bp vor der *Xho* I-Stelle des Vektors pCMV $\beta$ *Xho*, für die  $\beta$ -Globin bzw.  $\beta$ -Globin-Prothrombin 3'-Region amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 inseriert und der daraus resultierende Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-3'- $\beta$ Glo-Prothr. sequenziert.

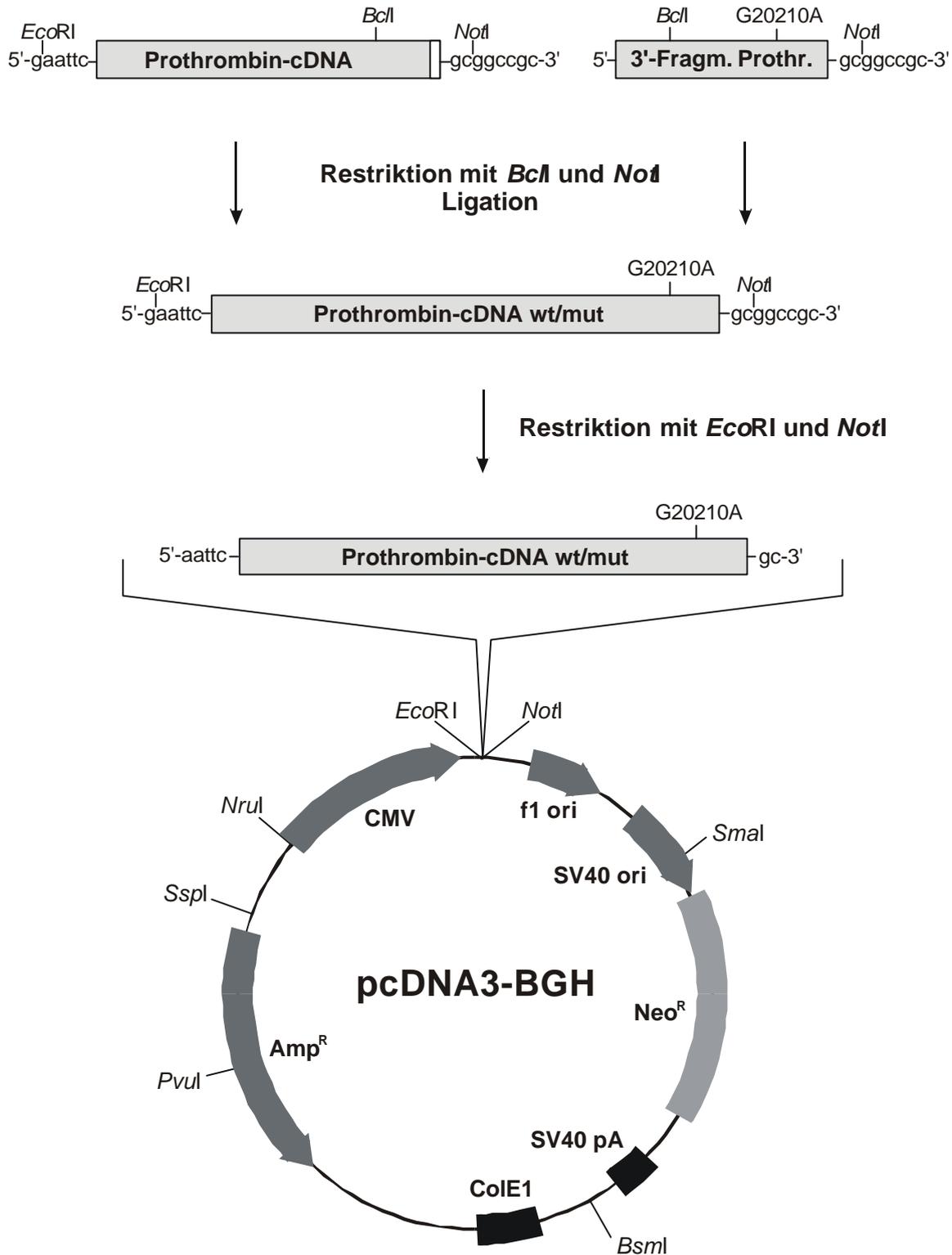


## 2.4 Überexpression von Prothrombin in HepG2- und COS-1-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des Prothrombin 3'-Bereiches und des Einflusses der G20210A-Mutation auf die Halbwertszeit der rekombinanten Prothrombin-mRNA und auf die Proteinmenge wurde ein überexprimierendes Zellsystem etabliert. Der Vergleich der Halbwertszeiten von Wildtyp-Prothrombin und G20210A-Prothrombin mRNA wurde nach stabiler Überexpression in den Zelllinien HepG2 und COS-1 durchgeführt. Die Klonierung der humanen Prothrombin-cDNA (Basenpaare 1 bis 1947) erfolgte nach Entfernung der 3'-untranslatierten Region des Vektors und Einfügen der Wildtyp 3'-Region sowie der Prothrombin 3'-Region mit der G20210A-Transition in den episomal replizierenden Expressionsvektor pcDNA3. Für die Transfektion von HepG2-Zellen wurde erneut ein Laborstamm verwendet, der keine endogene Prothrombin-Expression aufwies.

### 2.4.1 Klonierung der Prothrombin-cDNA in einen Expressionsvektor

Der Expressionsvektor pcDNA3 enthält neben den für die Replikation und Klonierung in *E. coli* notwendigen Sequenzen einen SV40-Replikationsursprung für die episomale Replikation in eukaryotischen Zellen. Neomycinresistenz ermöglichte die Selektion mit G418. Für die Initiation der Expression trägt der Vektor den CMV-Promotor sowie für die Stabilisierung der rekombinanten mRNA eine BGH poly A-Region mit Poly A-Signal. Um einen Einfluss der synthetischen Poly A-Region des Vektors auf die Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA zu vermeiden, wurde die BGH poly A-Region durch Restriktion mit *Xho* I und *Bbs* I entfernt, die 5'-überhängenden Enden des Vektors wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, und der Vektor pcDNA3-BGH wurde durch Ligation der glatten Enden zirkularisiert. Die 1,9 kb-Prothrombin-cDNA lag nach Umklonierung aus M13mp18 in die *Eco*R I-Stelle von pBluescript II SK<sup>+</sup> in dem Vektor pBS-Prothr.-cDNA vor. Die Klonierungsstrategie der Prothrombin-cDNA durch Insertion der 1,9 kb-Prothrombin-cDNA in pcDNA3-BGH und Einfügen der G20210A-Mutation sowie der 3'-flankierenden Sequenz ist in Abb. 19 dargestellt und wird im Folgenden erläutert.



**Abb. 19: Herstellung von Prothrombin-Expressionsvektoren.**

**Klonierungsstrategie:**

1. Die Prothrombin-cDNA lag in 3'→5'-Orientierung in pBS-Prothr.-cDNA in der Klonierungsstelle *EcoR* I vor. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus dem

Bakterienstamm SCS110 (*dam*<sup>-</sup>, *dcm*<sup>-</sup>), da Methylierungen in anderen Bakterienstämmen die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Bcl* I schützen.

2. Durch Restriktion mit *Bcl* I (unmittelbar vor dem Stop-Codon der Prothrombin-cDNA gelegen, Position 1833; Gen: Pos. 20095) und *Not* I wurde ein 170 bp Prothrombin-Fragment inklusive G20210A-Position, Poly A-Ende und 3'-*EcoR* I-Stelle des Vektors ausgeschnitten.
3. Der resultierende Vektor enthielt das verbliebene 1,8 kb Prothrombin-cDNA-Fragment mit den Klonierungsstellen *EcoR* I und *Not* I.
4. Für die Amplifikation der 3'-untranslatierten und flankierenden Region mittels PCR wurden als Template genomische DNA aus heterozygoten Patienten und die Primer FII-1 (Poort et al., 1996) und FII-pcDNA3 eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt umspannte Position 19889 in Intron M bis 20354 in der 3'-flankierenden Region des Prothrombingens. Dies entsprach einem 465 bp Prothrombin-Fragment zuzüglich 8 bp *Not* I-Stelle und 8 bp flankierender Sequenz aus Primer FII-pcDNA3.
5. Nach Restriktion des PCR-Produktes mit *Not* I und *Bcl* I und Gelreinigung entstanden ein 207 bp 5'-Fragment und das gewünschte 258 bp 3'-Fragment mit 3'-Region des Prothrombingens. Da für die PCR genomische DNA, isoliert aus heterozygoten Trägern der G20210A-Mutation, eingesetzt wurde, sollten die PCR-Produkte zu gleichen Teilen aus Wildtyp-Prothrombin 3'-Region (wt) und aus 3'-Region mit G20210A-Transition (mut) bestehen.
6. Anschließend erfolgte die Ligation von pBS-Prothr.-cDNA/*Bcl* I/*Not* I mit dem 258 bp PCR-Fragment (wt und mut).
7. Kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und die resultierenden Klone nach Plasmidpräparation durch Restriktion mit *Not* I und *Bam*H I analysiert. Bei erfolgreicher Klonierung wurde ein 494 bp Restriktionsfragment im Agarosegel detektiert; enthielt der Vektor nicht das 258 bp PCR-Produkt, so entstanden ein 23 bp *Not* I-*Bam*H I- und ein 391 bp *Bam*H I- Restriktionsfragment.
8. Die als positiv identifizierten Klone wurden auf Wildtyp und G20210A-Polymorphismus überprüft. Dazu wurde eine PCR mit dem Primerpaar FII-4 und FII-5 (Makris et al., 1997) durchgeführt. Mit dem Primer FII-5 wurde durch Transition C  $\rightarrow$  T an Position 20214 eine *Hind* III-Restriktionsstelle in das PCR-Fragment eingeführt, falls das Plasmid die G20210A-Mutation trug. Durch anschließende Restriktion der PCR-Produkte mit

*Hind* III und Agarosegelanalyse konnten Wildtyp (142 bp-Fragment) pBS-Prothr.-wt und G20210A-Klone (118 bp Fragment) pBS-Prothr.-mut identifiziert werden.

9. Für die Umklonierung der Prothrombin-cDNA inklusive 3'-flankierender Sequenzen in pcDNA3-BGH wurden zunächst die Plasmide pcDNA3-BGH, pBS-Prothr.-wt und -mut präpariert.
10. Nach Restriktion von pcDNA3-BGH und pBS-Prothr.-wt/mut mit *EcoR* I und *Not* I, erfolgte die Gelreinigung des linearisierten Vektors pcDNA3-BGH und der 2 kb Inserts aus pBS-Prothr.-wt/-mut.
11. Die erfolgreiche Ligation von pcDNA3-BGH/*EcoR* I/*Not* I mit den 2 kb-Prothrombin-wt/-mut-Fragmenten wurde nach Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen durch Restriktion der Plasmid-DNA mit *Bam*H I überprüft.
12. Mittels PCR mit dem Primerpaar FII-4 und FII-5 (Makris et al., 1997), Restriktion mit *Hind* III und anschließender Sequenzierung konnten die Prothrombinkonstrukte pcDNA3-BGH-wt und pcDNA3-BGH-mut verifiziert werden.

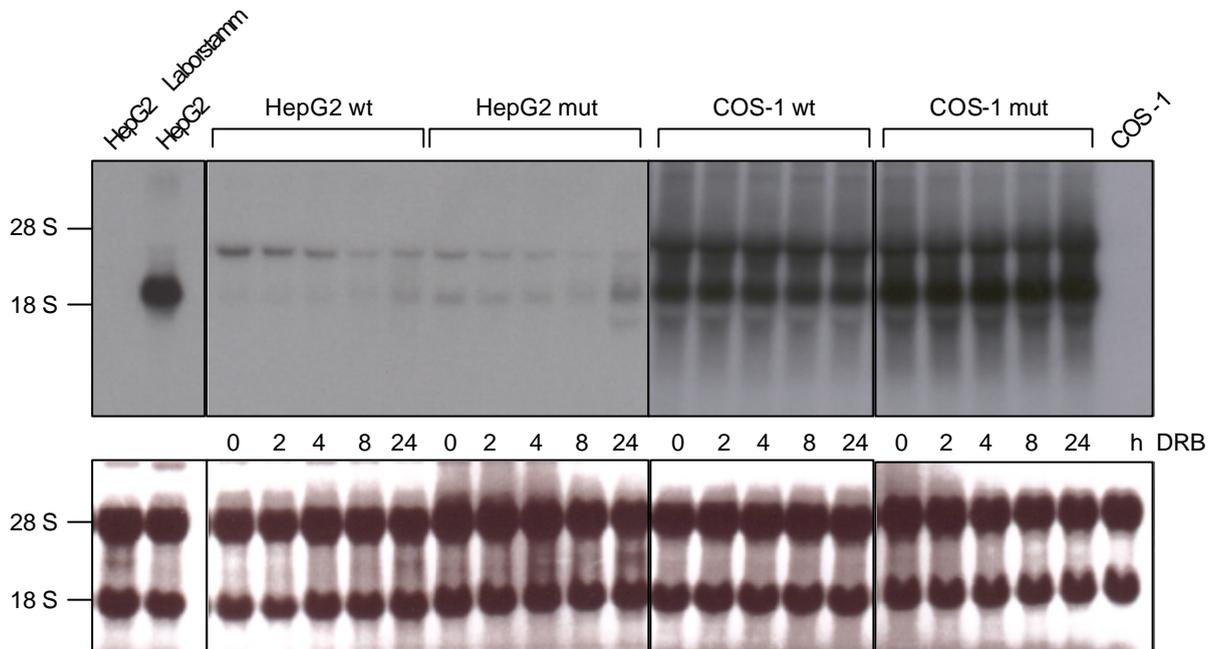
#### **2.4.2 Untersuchung der Halbwertszeit der rekombinanten Prothrombin-mRNA**

Für die Überexpression von Wildtyp- und G20210A-Prothrombin in der Leberzelllinie HepG2 und in der Affennierenzelllinie COS-1 wurden die Plasmide pcDNA3-BGH-wt und pcDNA3-BGH-mut durch Restriktion mit *Ssp* I linearisiert. Nach Lipofectin-Transfektion und Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium wurden 500 bis 2000 Klone vereinigt und die so entstandene Population hinsichtlich der Stabilität der Prothrombin mRNA untersucht. Die Vereinigung vieler Klone, die den Expressionsvektor tragen, minimiert den Einfluss, den Insertionsort und die Anzahl der ins Genom integrierten Konstrukte auf Expressionshöhe des rekombinanten Proteins haben.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion, wurde genomische DNA aus den Zellen präpariert und eine PCR mit dem Primerpaar FII-4 und FII-5 durchgeführt. Durch Restriktion der PCR-Produkte mit *Hind* III und anschließende Agarosegelanalyse konnten Wildtyp (142 bp-Fragment) und G20210A-Zelllinien (118 bp Fragment) unterschieden werden.

Für die Bestimmung der Halbwertszeit der rekombinanten Prothrombin-mRNA wurden jeweils zwei stabil transfizierte HepG2- und COS-1-Zelllinien zur Hemmung der Transkription über 0, 2, 4, 8 und 24 h mit DRB behandelt und anschließend die RNA

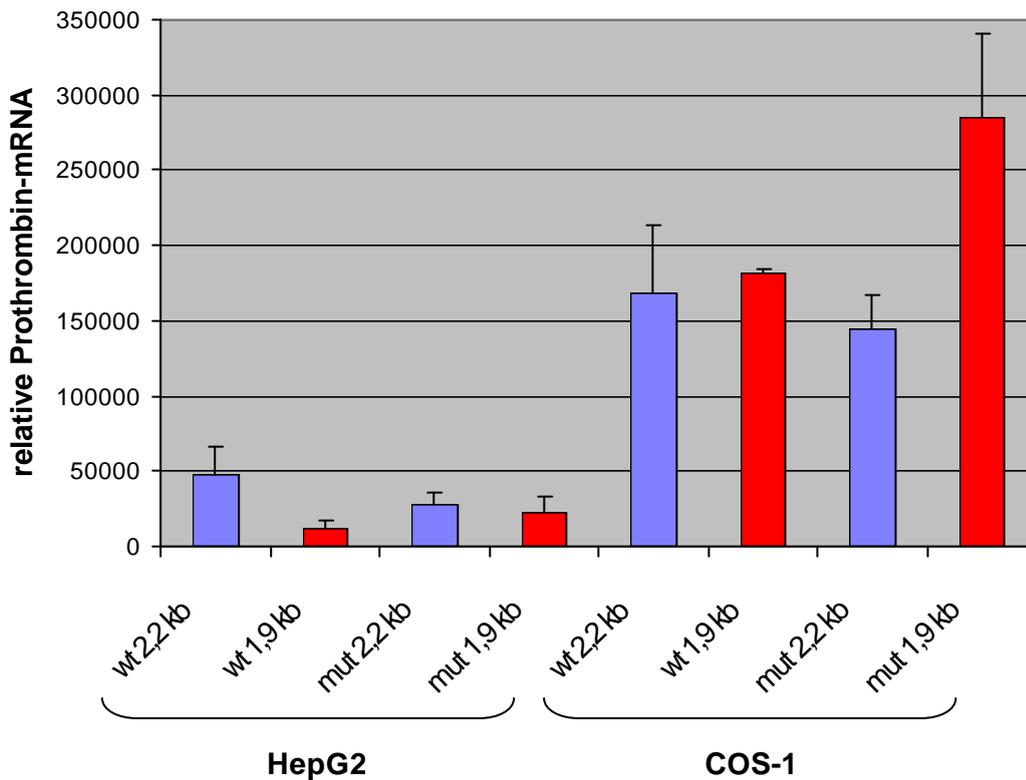
präpariert. Die RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und der Filter mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Prothrombin-spezifischen cDNA-Sonde (1 kb 5'-*Sst* I-Restriktionsfragment der humanen Prothrombin-cDNA aus pBS-Prothr.-cDNA) hybridisiert.



**Abb. 20: Stabile Expression der rekombinanten Prothrombin-cDNA in HepG2- und COS-1-Zellen.** Je 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus stabil mit der Wildtyp- sowie mit der G20210A-Prothrombin-cDNA transfizierten HepG2-Zellen ohne endogene Prothrombinexpression bzw. COS-1-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit DRB isoliert. Zusätzlich wurden je 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus dem untransfizierten HepG2-Laborstamm, HepG2- und COS-1-Zellen in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Prothrombin-Sonde hybridisiert. Die Expositionszeit betrug 16 h mit einer Signalverstärkerfolie. Die 28 S und 18 S rRNA-Banden wurden mit Methylenblau nach dem RNA-Transfer auf der Membran angefärbt. HepG2 wt/mut: stabil mit der Wildtyp/G20210A-Prothrombin-cDNA transfizierter HepG2-Laborstamm ohne endogene Prothrombinexpression, COS-1 wt/mut: stabil mit der Wildtyp/G20210A-Prothrombin-cDNA transfizierte COS-1-Zellen.

Wie Abb. 20 zeigt, konnte im Northern Blot das erwartete 1,9 kb Prothrombin-Transkript sowohl in stabil transfizierten HepG2- als auch COS-1-Zellen nachgewiesen werden. Die Größe dieses Transkripts entspricht derjenigen der endogenen Prothrombin-mRNA aus HepG2-Zellen (Abb. 20, Spur 2). Der für die rekombinante Expression von Prothrombin benutzte HepG2-Laborstamm und die Affenierenzelllinie COS-1 zeigen keine endogene Prothrombinexpression. Auffallend ist aber ein ca. 300 bp größeres Transkript, das in beiden transfizierten Zelllinien detektiert wird. Für das Vorhandensein mehrerer Transkripte könnte

eine unvollständige oder inkorrekte Prozessierung der rekombinanten mRNA die Ursache sein. Die Doppelbande erscheint sowohl bei Wildtyp Prothrombin-mRNA als auch bei der mutierten mRNA. Sowohl bei transfizierten HepG2 als auch COS-1-Zellen weisen die Transkripte eine Größe von ca. 1,9 kb und 2,2 kb auf. Die Quantifizierung der beiden Transkripte von Wildtyp-mRNA und 20210A-mRNA in beiden transfizierten Zelllinien zeigt eine Verschiebung zugunsten der korrekt prozessierten mRNA bei der Mutante (Abb. 21). Dies spricht für eine Verbesserung der Polyadenylierungseffizienz durch den 20210A-Polymorphismus.



**Abb. 21: Quantifizierung der Transkripte aus stabil mit der Prothrombin 20210G/A-cDNA transfizierten HepG2- und COS-1-Zellen.** Je 10 µg Gesamt-RNA aus stabil mit der 20210G (wt) und 20210A Prothrombin-cDNA (mut) transfizierten HepG2- bzw. COS-1-Zellen wurden in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer <sup>32</sup>P-markierten Prothrombin-Sonde hybridisiert. Die beiden Transkripte (1,9 und 2,2 kb) wurden jeweils im PhosphorImager quantifiziert und aus jeweils zwei unabhängigen Transfektionen der Mittelwert sowie die Standardabweichung in EXCEL berechnet.

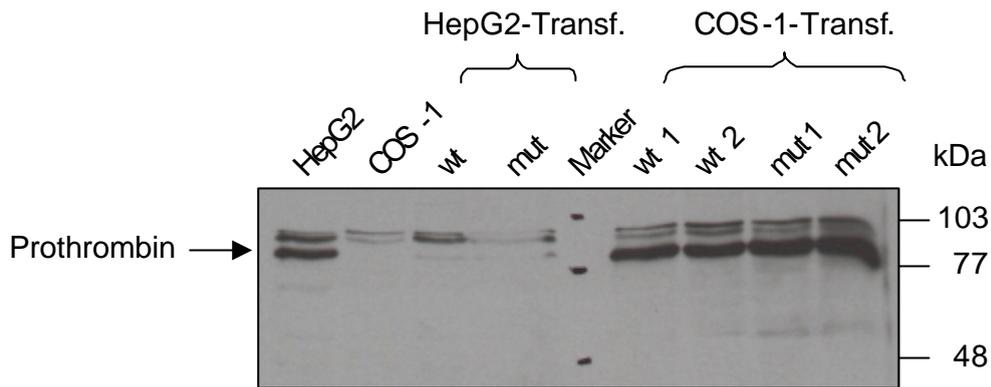
Auffallend ist die extrem erhöhte Expression der rekombinanten mRNA in der Affenierenzelllinie COS-1 gegenüber HepG2-Zellen. Diese Zelllinie verfügt über ein integriertes, defektes SV40-Genom, das das virale T-Antigen exprimiert. Dieses erkennt wiederum den viralen Replikationsstartpunkt auf transfizierten Plasmiden und bewirkt eine

massive Replikation des Plasmids und damit eine Anreicherung des vom Plasmid exprimierten Proteins (Gluzman, 1981).

Die Quantifizierung der erwarteten 1,9 kb Transkripte im PhosphorImager und die Bestimmung der Halbwertszeit durch Regression zeigte weder beim Wildtyp noch bei der Mutante eine Degradation über den untersuchten Zeitraum von 24 h. Somit unterlag die rekombinante Prothrombin-mRNA in diesen Zellsystemen keiner Regulation, und auch hier ergab sich kein Hinweis auf eine Verlängerung der Prothrombin-mRNA-Halbwertszeit durch den G20210A-Polymorphismus (vergl. Kap. 2.3.4).

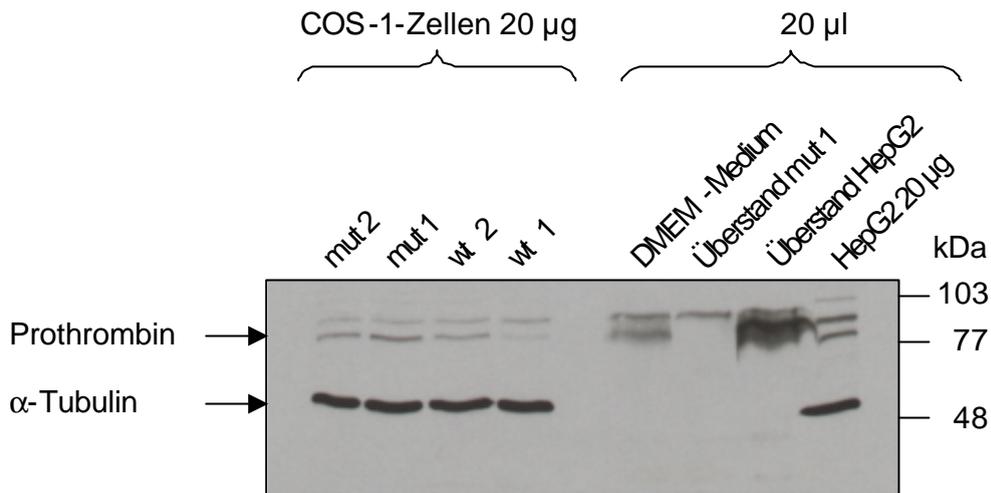
### ***2.4.3 Nachweis der Überexpression im Western Blot***

Stabil transfizierte HepG2- und COS-1-Zellen wurden hinsichtlich der Expression des rekombinanten Prothrombins in Western Blot Analysen getestet (Abb. 22). Als Positivkontrolle wurde Zelllysate aus HepG2-Zellen mit endogener Prothrombinexpression aufgetragen. Wie die Northern Blot Analyse (Abb. 20) zeigt, weisen die für die Transfektion verwendeten HepG2-Zellen keine endogene Prothrombinexpression auf. Sowohl in stabil mit den Prothrombinexpressionsvektoren transfizierten COS-1-Zellen als auch in HepG2-Zelllysaten lässt sich Prothrombin bei ca. 80 kDa detektieren. Die Differenz des apparenten Molekulargewichts zum rechnerisch ermittelten von 72 kDa (Barnhart, 1960; Mann und Elion, 1980) beruht vermutlich auf posttranslationalen Modifikationen. Bei dem Signal um 90 kDa handelt es sich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers, da diese Bande auch in der untransfizierten Affennierenzelllinie COS-1 erscheint, die keine endogene Prothrombinexpression aufweist (Abb. 20, Abb. 21). Wie aufgrund der Northern Blot Analyse erwartet, ist die rekombinante Prothrombinexpression in stabil transfizierten HepG2-Zellen sehr schwach, während die Signale in transfizierten COS-1-Zellen deutlich stärker sind.



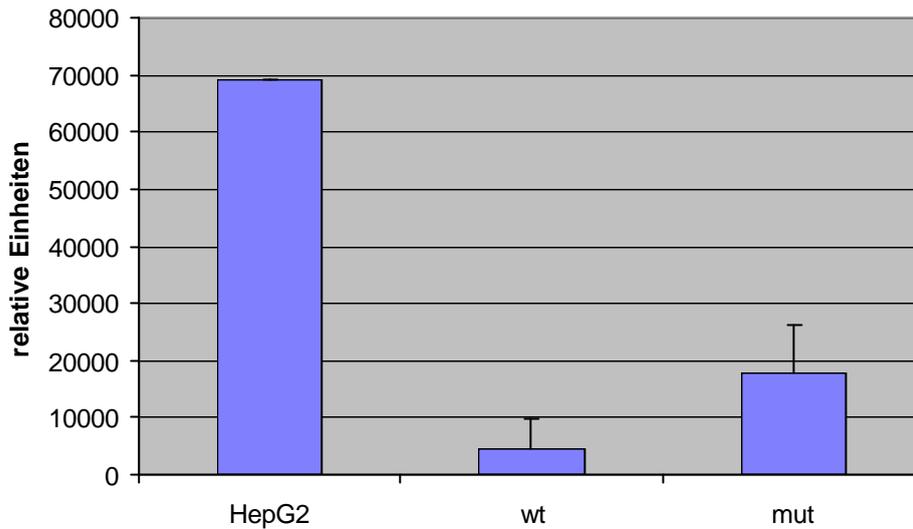
**Abb. 22: Western Blot der Überexpression von Prothrombin in HepG2- und COS-1-Zellen.** Je 20  $\mu$ g Lysat aus untransfizierten HepG2- und COS-1-Zellen bzw. mit einem Prothrombin-Wildtypkonstrukt (wt) und Prothrombin-G20210A-Konstrukt (mut) transfizierte HepG2-Zellen sowie transfizierte COS-1-Zellen (wt 1, wt 2, mut 1, mut 2) wurden in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte der Proteinnachweis mit dem Antikörper Rabbit Anti-Human Prothrombin im ECL-Verfahren.

Zur Quantifizierung der Signale im Western Blot wurden jeweils zwei verschiedene COS-1-Mischzellpopulationen Wildtyp (wt) und G20210A (mut), bestehend aus 500 bis 2000 Klonen, untersucht. Hierfür wurden Zelllysate der transfizierten COS-1-Zellen und der Zelllinie HepG2 als Positivkontrolle sowie Medienüberstand im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Mit einem Antikörper gegen Prothrombin und zur Normierung der aufgetragenen Proteinmenge mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin ließen sich die entsprechenden Proteine detektieren (Abb. 23).



**Abb. 23: Nachweis von Prothrombin in Zellextrakten stabil transfizierter COS-1-Zellen (mut 1, 2, wt 1, 2) und im Mediumüberstand verschiedener Zellen.** Als Positivkontrolle wurde Zelllysate von HepG2-Zellen aufgetragen. Je 20 µg Gesamtzelllysate bzw. 20 µl Medium wurden in einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper Rabbit Anti-Human Prothrombin im ECL-Verfahren detektiert. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde gleichzeitig α-Tubulin (Antikörper MA-α-Tubulin) detektiert.

Prothrombin- und Tubulinsignale der COS-1-Zelllinien wt 1, 2 und mut 1, 2 sowie HepG2 wurden densitometrisch im PhosphorImager quantifiziert und die Prothrombinexpression auf die Tubulinmenge normiert. Die in Abb. 24 grafisch dargestellte 4-fache Erhöhung der Prothrombin-Proteinexpression bei der G20210A-Mutation ist nach Berechnung mit dem zweiseitigen Student'schen t-Test nicht signifikant ( $p = 0,2$ ). Dies ist sicher auch auf die geringe Anzahl der Werte ( $n = 2$ ) zurückzuführen, die in die Berechnung der Mittelwerte eingegangen sind. Das im Western Blot (Abb. 23) analysierte DMEM-Medium und Medienüberstand von HepG2-Zellen weisen Prothrombinsignale auf. Die Medienüberstände und das DMEM-Medium enthielten jeweils 10 % FCS, das vermutlich für das Prothrombinsignal verantwortlich ist. Es konnte nicht geklärt werden, warum bei transfizierten COS-1-Zellen (mut 1) im Medienüberstand keine Prothrombinexpression nachweisbar ist. Das starke Signal im Medienüberstand von HepG2-Zellen resultiert vermutlich aus einer Akkumulation des Prothrombins in FCS und des von den Zellen sezernierten Prothrombins.



**Abb. 24: Quantifizierung der rekombinanten Prothrombinexpression in stabil transfizierten COS-1-Zellen.** 80 kDa Prothrombin- und  $\alpha$ -Tubulin-Signale der stabil transfizierten COS-1-Zelllinien wt 1, 2 und mut 1, 2 aus Abb. 23 wurden densitometrisch im PhosphorImager quantifiziert. Die Standardisierung der Prothrombin-Werte erfolgte mittels der  $\alpha$ -Tubulin-Werte. Es wurden Mittelwerte aus jeweils 2 Zelllinien berechnet und die Standardabweichung im Diagramm dargestellt. Zum Vergleich der Expressionshöhe ist das quantifizierte und normalisierte endogene Prothrombinsignal aus HepG2-Zellen dargestellt.

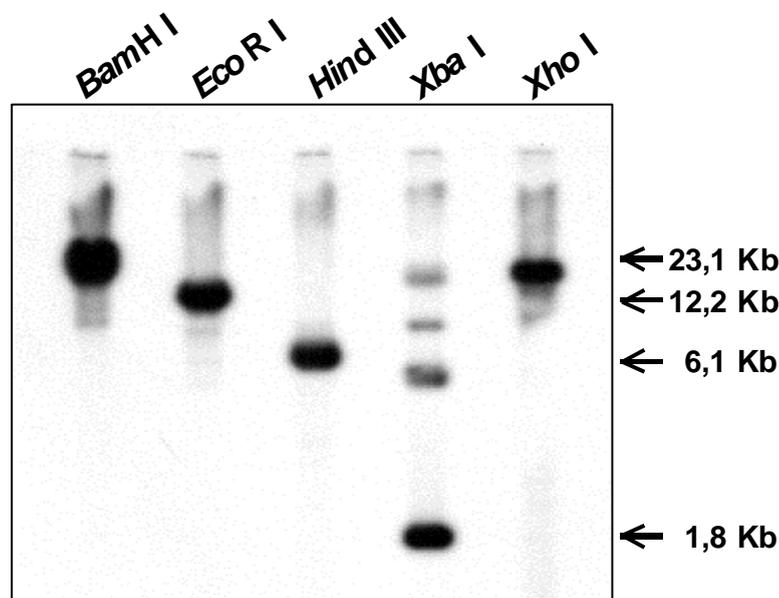
## 2.5 Erweiterung der humanen 3'-flankierenden Prothrombinregion

Wie in Kap. 2.3.5 gezeigt, führte die bis zu Beginn dieser Arbeit bekannte 240 bp 3'-Prothrombinregion in  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten zu einer inkorrekten Prozessierung der mRNA. Nicht das weiter 5'-gelegene Polyadenylierungssignal bewirkte in den mRNA-Hybriden die Anheftung des Poly A-Endes, sondern das weiter 3'-gelegene Poly A-Signal des  $\beta$ -Globingens. Dies legte die Vermutung nahe, dass weitere Sequenzbereiche des Prothrombingens an Regulation und Prozessierung der mRNA beteiligt sind. Alternativ könnte das Poly A-Signal des  $\beta$ -Globingens stärker als das des Prothrombingens sein, so dass das erste Signal überlesen wird. Um Aufschluss über weiter 3'-gelegene, flankierende Bereiche des Prothrombingens zu erlangen, wurde eine Sequenzhomologiesuche mit der bekannten Prothrombin 3'-Region (Acc. No. M17262) und der Prothrombin cDNA-Sequenz (Acc. No. J00307) in öffentlich zugänglichen Datenbanken durchgeführt. Für die Sequenzrecherche wurde das Programm BLASTN, zugänglich über das NCBI, verwendet. Die Sequenzhomologiesuche lieferte keinen Aufschluss über weitere 3'-flankierende Bereiche

des Prothrombingens. Daher wurde ein PCR-Screening in einer humanen genomischen P1-Bibliothek durchgeführt (*Genome Systems*, St. Louis, USA). Die Oligonukleotide FII-1 und FII-3 amplifizieren ein 345 bp PCR-Fragment, das einen Teil des Introns M, das komplette Exon XIV sowie den 3'-flankierenden Bereich des Prothrombingens umfaßt. Ein P1-Klon mit der Nummer 24961 wurde als positiv identifiziert. Die PCR-Amplifikation mit 50 ng Template-DNA des entsprechenden P1-Klones und dem Primerpaar FII-1 und FII-3 resultierte in einem PCR-Produkt der erwarteten Größe. Durch Southern Blot Analyse und Subklonierung eines genomischen DNA-Fragments wurde schließlich eine 1,8 kb-Region aus dem 3'-Bereich des Prothrombingens isoliert und einer Sequenzanalyse zugänglich gemacht.

### 2.5.1 Southern Blot Analyse eines Prothrombin-Subklons

Für die Sequenzaufklärung des 3'-flankierenden Bereiches wurde zunächst DNA des P1-Klones 24961 einer Southern Blot Analyse unterzogen. Als DNA-Sonde wurde ein 345 bp PCR-Fragment, amplifiziert aus genomischer DNA mit dem Primerpaar FII-1 und FII-2 verwendet.



**Abb. 25: Southern Blot Analyse eines P1-Klones.** Je 0,5 µg DNA des P1-Klones 24961 wurden mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten, die resultierenden Fragmente in einem 0,8 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer <sup>32</sup>P-markierten Prothrombin-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Die Expositionsdauer betrug 1 ½ h unter Verwendung einer Signalverstärkerfolie.

Die in Abb. 25 detektierten genomischen DNA-Fragmente beinhalten aufgrund der in Tab. 6 aufgelisteten Restriktionsstellen des Prothrombingens erweiterte 3'-flankierende Bereiche. Keine der verwendeten Restriktionsendonukleasen schneidet im 3'-Ende des Prothrombingens zwischen Position 19890 und 20354, der am weitesten 3'-gelegenen, bisher bekannten Base. Ein ca. 1,8 kb *Xba* I-Restriktionsfragment wurde für die Subklonierung ausgewählt. Dieses Fragment sollte einen Bereich von Position 19890 bis 20354 des Prothrombingens und zuzüglich ca. 1350 bp weiter 3'-gelegene Bereiche umfassen.

**Tab. 6: Positionen von Restriktionsschnittstellen im Prothrombingen (Acc. No. M17262).**

<i>Bam</i> H I	<i>Eco</i> R I	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I
7705	1367	1583	677	1575
10274	2106	8613	16972	17061
13105	3018	10122	17311	19540
	15579	17555	19890	
	15811	19827		

### 2.5.2 Klonierung der 1,8 kb 3'-flankierenden Prothrombinregion

*Xba* I-Restriktionsfragmente aus DNA des P1-Klones 24961 wurden in den Vektor pBluescript II SK<sup>+</sup> subkloniert. Die Sequenzanalyse des resultierenden Vektors pBS-3'-Fillerw erfolgte mehrfach von beiden Seiten und wurde mit Hilfe des Programmes *Align IR (LI-COR)* editiert. Abb. 26 zeigt die Sequenz des 1,8 kb *Xba* I-Fragments. Sie umfasst einen Teil von Intron M (Pos. 19889 -19968), Exon XIV (Pos. 19970 - 20210), die bekannte 3'-flankierende Region (Pos. 20211 - 20354) und neue 1350 bp 3'-flankierende Bereiche von Position 20355 bis 21704.

<i>Xba</i> I		
19889	<b>TCTAGA</b> AACA GTTGCTGGC AGAGGAATAC TGATGTGACC TTGAACTGA CTCTATTGGA	19948
19949	AACCTCATCT TTCTTCTTCA GAGCCCTTT AACAACCGCT GGTATCAAAT GGCATCGTC	20008
20009	SerTrpGlyG luGlyCysAs pArgAspGly LysTyrGlyP heTyrThrHi sValPheArg TCATGGGGTG AAGGCTGTGA CCGGATGGG AAATATGGCT TCTACACACA TGTGTTCCGC	20068
20069	LeuLysLysT rpIleGlnLy sValIleAsp GlnPheGlyG lu*** CTGAAGAAGT GGATACAGAA GGTCATTGAT CAGTTTGGAG AGTAGGGGGC CACTCATATT	20128

---

20129	CTGGGCTCCT	GGAACCAATC	CCGTGAAAGA	ATTATTTTTG	TGTTTCTAAA	ACTATGGTTC	20188
20189	CC <u>AATAAA</u> AG	TGACTCTCAG	<u>G</u> AGCCTCAA	TGCTCCCAGT	GCTATTCATG	GGCAGCTCTC	20248
	Poly A		202010G				
20249	TGGGCTCAGG	AAGAGCCAGT	AATACTACTG	GATAAAGAAG	ACTTAAGAAT	CCACCACCTG	20308
20309	GTGCACGCTG	GTAGTCCGAG	CACTCGGGAG	GCTGAGGTGG	GAGGATCGCT	TGAGCCCAGG	20368
20369	AGGTGGAGGC	TGCAGTGAGC	CACTGCACCC	CAGCCTGGGT	GACAGAGTGA	GACCCTGTCC	20428
20429	CAAAAGAATC	CACTATCTAT	CTTCAGAGCA	GGGCCAGGTG	AGAGGAAAGA	TGGCAGGTTG	20488
20489	AATTTACAGG	CATTAAAGAT	GTTCCACCCT	CTGGGTTTTA	ATGGATTATC	TCATTTAATC	20548
20549	CTCACAAGAG	GTAGGTGAGT	AAACTGAGAT	TTGGAGAAGT	ACCTTGTCCTA	AAGTCACATG	20608
20609	GCTAAGAAAG	CTCAAAGTAG	GACTTCAAAT	ATAGAAAATA	TTGAGTGAGG	ACGGTGCTTT	20668
20669	TTTAGTTAAC	TCCCTACATC	TTCCCTTGTA	TCATTTAAAT	GATATCAGAT	CAGGTAGGGC	20728
20729	ATGGTGGCTC	ACACCTGTAA	TCTCAGCAAT	TTAGGAGACT	AAGGTTGAGG	CTAGGAATGC	20788
20789	GAGATCAGTC	TGGGCAATGT	GGTGAGACCC	CAAAAAATAA	AATTAGCTAG	GCGTGGTGGC	20848
20849	ATGTGCCTGT	AGTCAAGGTT	ACTTGGGAGG	ATCACTTGAG	CCCAGGAGGT	TGAGGCTGCA	20908
20909	GTGAGCCATG	ATCATGTAC	TACACCTGCA	CTGCAGCCTG	GGTGACAGTG	AAACCCTGTT	20968
20969	TATAAAAATC	AGGGCTGGGC	ACGGTGGCTC	AAGCCTGTAA	TCCCAGCACT	TTGGGAGGCT	21028
21029	GAGGTGGATG	GATCACAAGG	TCAGGAGATT	GAGACCATCC	TGGTGAACAC	GGTGAAACCC	21088
21089	TGTCTCTACC	AAAAATACAA	AAAATTAGCC	AGGCGTGGTG	GTGGACGCCT	GTAGTCCCAG	21148
21149	CTACGTGGGA	GGCTGAGGCA	GGAGAATGGC	ATGAACCTGG	GAGGTGGAGC	TTGCAGTGAG	21208
21209	ACAAGATTGC	ACCACTGCAC	TCCAGCCTGG	GCGACAGAGC	GACTCTGTCT	CAAAAAGAAG	21268
21269	AAGAACCAAC	CATGCATACC	AAAATCCATA	GATGCTCAAA	TCTCTTATAT	AAAATGGCAC	21328
21329	AGTTTACATA	TAACCTATGC	ACATCCTCCC	ATATACTTCA	TTTTTAAAAT	TTATTTTTAT	21388
21389	CTTTTTGAGT	TGGAATTTTG	CTCATTGCC	AGGCTGGAGT	GCAATGGTGC	GATCTCGGCT	21448
21449	CACTGCAATC	TCCGCCTCTT	AGGTTCAAGT	GATTCTCCTG	CCTCAGCCTC	CCGAGTAGCT	21508

---

```

21509  GGGATTACAG GTGCCCGCCA CCACGCCTGG CTAGTTTTTTG TATTTTTAGT AGAGATGGGG 21568
21569  TTTCAACGTG TTGGTCAGGC TGGTCTCAAA CTCCTGACCT CAGGTTATCC ACCCATCGGG 21628
21629  GCCTCCCAAA GTGTTTGGGA TTACAGACAT GAGCCACCCT GCCCGGCCTT CCCATATACT 21688
21689  TCAAATCATC Xba I TCTAGA..... 21704

```

**Abb. 26: 1,8 kb 3'-Prothrombin-Region, GenBank Acc. No. AF493953.** Die dargestellte Sequenz wurde durch Doppelstrangsequenzierung des Klons pBS-3'-Fluerw mit dem LI-COR Sequenzautomaten ermittelt. Sie umfasst einen Teil von Intron M (Pos. 19889 - 19968), das Exon XIV (Pos. 19970 - 20210) und die 3'-flankierende Sequenz (Pos. 20211 - 21704). \*\*\*: Stopcodon der Translation, Poly A: Polyadenylierungssignal.

Die erweiterte 3'-flankierende Prothrombinregion wurde unter der Acc. No. AF493953 unter Verwendung des Programms BankIt, ebenfalls zugänglich über NCBI, in die Datenbank GenBank (Benson et al., 2002) eingegeben.

## 2.6 Analyse der regulatorischen Prothrombinregionen mit Luciferase-Reporterkonstrukten

Die potentielle Promotorregion des Prothrombingens wurde auf den Bereich -110 bis -1 vor dem Transkriptionsstartpunkt eingegrenzt. Dieser Sequenzbereich ist bei den verschiedenen Spezies hochkonserviert. Der Promotor besitzt keine TATA-Box. Weitere regulatorische Elemente sind eine konservierte Region im Bereich -717 bis -581, die eine große Homologie mit dem bovinen Prothrombingen aufweist, eine potentielle Bindungsstelle für HNF-1 (*hepatocyte nuclear factor-1*) und ein nicht-gewebespezifisches Enhancer-Element im Bereich -919 bis -790 (Chow et al., 1991; Bancroft et al., 1992).

Die potentielle HNF-1-Bindungsstelle umfaßt die Region -887 bis -875 (Sequenz 5'-ACTAATATTTGCC-3') und vermittelt vermutlich die leberspezifische Prothrombinexpression. Der Transkriptionsfaktor HNF-1 wurde kausal mit der leberspezifischen Expression anderer Gene in Zusammenhang gebracht (Courtois et al., 1988).

Für die Analyse möglicher regulatorischer 5'- und 3'-Regionen des Prothrombingens wurden von einem 974 bp umfassenden 5'-flankierenden und -untranslatierten Bereich des humanen Prothrombingens (Position -944 bis +31, relativ zum Transkriptionsstart) mehrere Deletionsmutanten hergestellt. Hierzu wurden vom 5'-Ende sukzessiv verkürzte PCR-

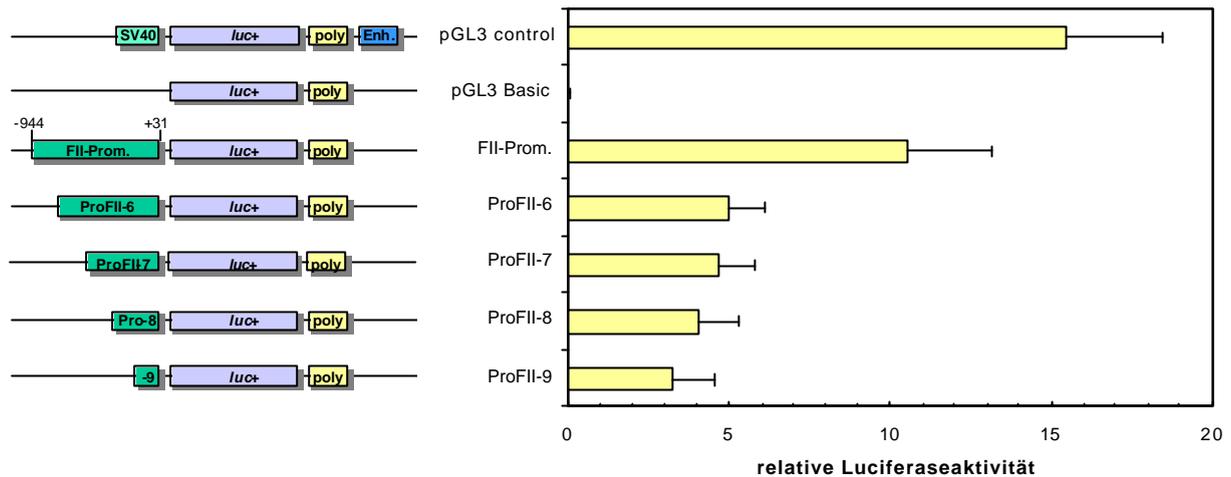
Fragmente der Prothrombin 5'-Region in den Expressionsvektor pGL3 Basic vor das Luciferasereportergen aus *Photinus pyralis* geschaltet. Durch Deletion der ersten 197 bp entstand das Konstrukt -748/+31, dem die potentielle HNF-1-Bindungsstelle und das Enhancer-Element fehlte. Aus weiterer Deletion von 225 bp resultierte das Konstrukt -524/+31 ohne die konservierte Region -717/-581 bis zur Deletionsmutante -164/+31, die den Bereich des basalen Promotors enthielt.

Als zelluläres System für die Messung der Promotoraktivität der verschiedenen Fragmente wurde sowohl die Hepatozyten-Zelllinie HepG2, als auch die humane Cervixcarcinom-Zelllinie HeLa ausgewählt. Dazu wurden die Reportergenkonstrukte transient transfiziert und nach 48 h die Luciferaseaktivität und damit die Promotoraktivität der verschiedenen Fragmente gemessen.

In der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens befindet sich das potentielle Polyadenylierungssignal 5'-AATAAA-3' an Position 20191 bis 20196. Zur Analyse 3'-regulatorischer Regionen wurden zusätzlich zu den Promotordeletionsmutanten PCR-Fragmente der 3'-untranslatierten und -flankierenden Prothrombinsequenzen in den pGL3 Basic-Expressionsvektor inkloniert und die Luciferaseaktivität nach Transfektion in HepG2-Zellen bestimmt. Die Normierung der Signale erfolgte durch Cotransfektion des Vektors pRL-TK, der für die Luciferase aus *Renilla reniformis* (Matthews et al., 1977) kodiert.

### **2.6.1 Promotoranalyse mit Luciferase-Reporterkonstrukten**

Für die Analyse der leberspezifischen Prothrombin-Promotoraktivität wurden 5'-Deletionsmutanten der 5'-flankierenden Region zunächst in HepG2-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität der Konstrukte gemessen. Im Vergleich zum Kontrollvektor pGL3 control, dessen SV 40-Promotor/Enhancer-Sequenzen stark transkriptionsaktivierend wirken, zeigen 974 bp der 5'-flankierenden Sequenz (-944/+31) eine ca. 70 %ige Aktivität (Abb. 27, FII-Prom.). Mit Verkürzung des Konstrukts um 197 bp (Pro FII-6, -748/+31) und der damit verbundenen Deletion der potentiellen HNF-1-Bindungsstelle und eines potentiellen Enhancer-Elementes im Sequenzbereich -919 bis -790 nimmt die transkriptionsaktivierende Wirkung des eingesetzten Fragments erwartungsgemäß auf ca. 50 % der Ausgangsaktivität ab. Weitere Deletion der 5'-Region im Bereich -748 bis -525 und -524 bis -331 führen zu keiner signifikant erniedrigten Promotoraktivität (ProFII-7, ProFII-8). Die konservierte Region -717/-581 scheint damit keinen regulatorischen Einfluss zu besitzen.

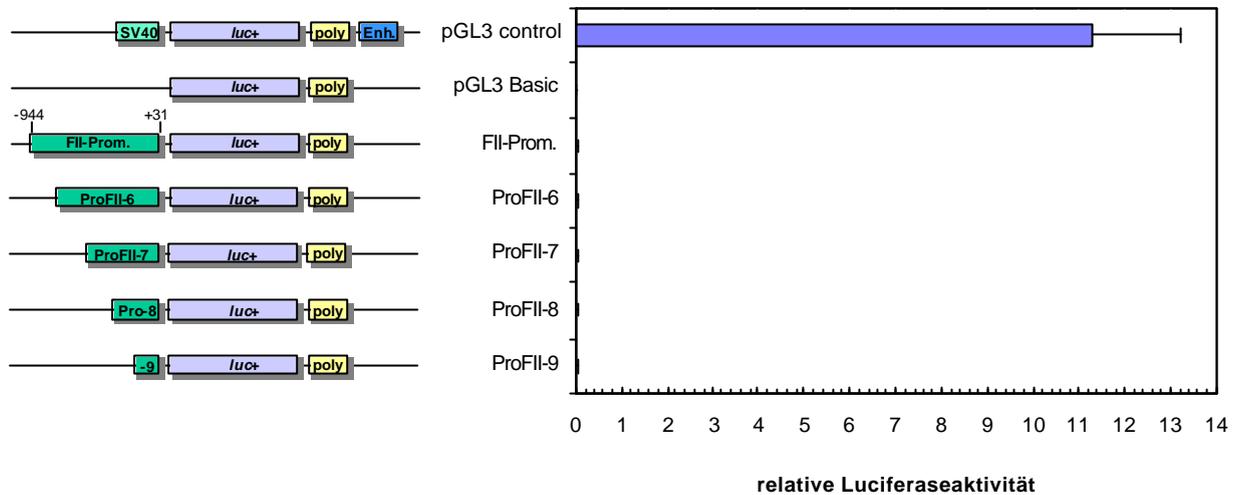


**Abb. 27: Prothrombin-Promotoranalyse in HepG2-Zellen.** Die Transkriptionsaktivierung der Luciferase-Reportergerkonstrukte wurde mit 5'-Deletionsmutanten aus dem 5'-flankierenden Bereich des Prothrombingens untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pGL3 control mit SV40-Promotor/-Enhancer-Sequenzen eingesetzt. Zur Kontrolle der basalen Aktivität diente der Vektor pGL3 Basic ohne Promotor- oder Enhancersequenzen. Die relative Luciferaseaktivität der Reportergerkonstrukte ergab sich durch Normierung der Signale mittels der *Renilla reniformis*-Luciferaseaktivität des cotransfizierten Vektors pRL-TK. *luc+*: Kodierende Sequenz des Luciferasgens aus *Photinus pyralis*, SV40: SV40-Promotor, poly: SV40 late poly A-Sequenzen, Enh.: SV40-Enhancer, FII-Prom.: umfaßt Nukleotide -944 bis +31 des humanen Prothrombingens, ProFII-6: -748/+31, ProFII-7: -524/+31, ProFII-8: -331/+31, ProFII-9: -164/+31.

Bei Eingrenzung der 5'-Region auf die potentielle Promotorregion des Prothrombingens (ProFII-9, -164/+31) ist eine basale Aktivität von ca. 30 % des Konstrukts -944/+31 zu verzeichnen. Diese Daten unterscheiden sich damit von denen von Chow et al., 1991, und von Bancroft et al, 1992. Die basale Promotoraktivität der Konstrukte nach Deletion der Region -919 bis -790 fällt nicht stark ab, obwohl sie die vermutlich die leberspezifische Expression vermittelnde HNF-1-Bindungsstelle und ein potentielles Enhancer-Element enthält. Den hier gezeigten Daten zufolge enthält schon die minimale Promotorregion Sequenzen, die zu einer leberspezifischen Expression beitragen.

Die Untersuchung der Luciferaseaktivität der Reporterkonstrukte nach Transfektion der humanen Cervixcarcinomzelllinie HeLa ist in Abb. 28 dargestellt. 5'-flankierende Prothrombinsequenzen zeigen wie erwartet eine nur minimale Transkriptionsaktivierung leicht oberhalb der basalen Aktivität des Vektors ohne Promotorsequenzen, da die leberspezifische Prothrombinexpression prätranslational reguliert ist. Sie wird durch Expression von *trans*-wirksamen Faktoren in Hepatozyten, vermutlich durch HNF-1

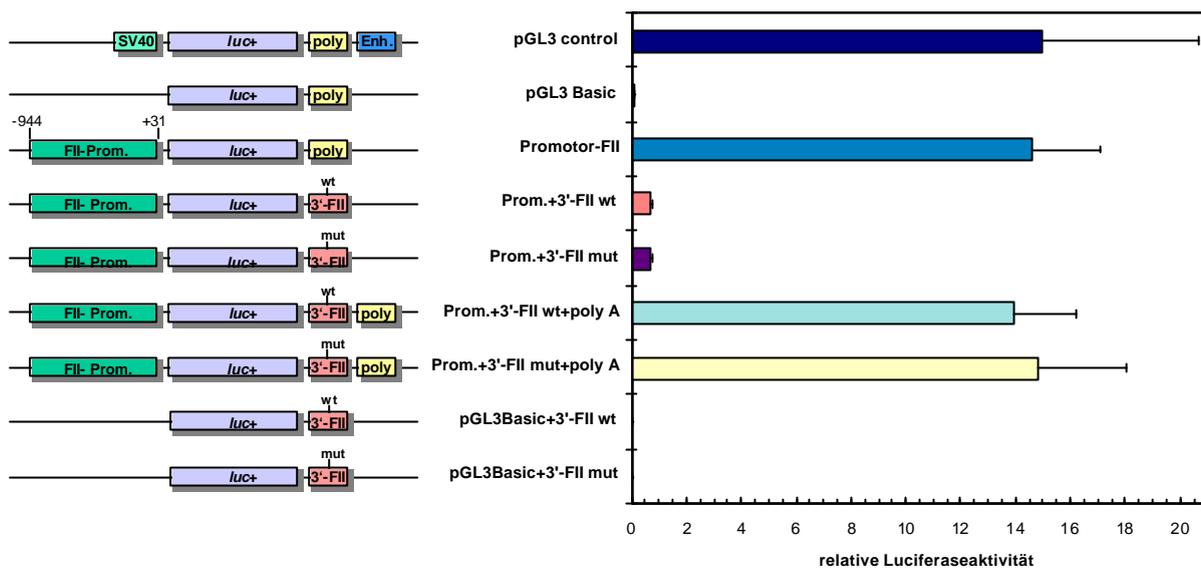
vermittelt (Bancroft et al., 1992; Chow et al., 1991; Jamison und Degen, 1991; Mitchell und Tjian, 1989; Maniatis et al., 1987).



**Abb. 28: Prothrombin-Promotoranalyse in HeLa-Zellen.** Die Transkriptionsaktivierung der Luciferase-Reportergenkonstrukten wurde mit 5'-Deletionsmutanten aus dem 5'-flankierenden Bereich des Prothrombingens untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pGL3 control mit SV40-Promotor/-Enhancer-Sequenzen eingesetzt. Zur Kontrolle der basalen Aktivität diente der Vektor pGL3 Basic ohne Promotor- oder Enhancersequenzen. *luc+*: Kodierende Sequenz des Luciferasegens aus *Photinus pyralis*, SV40: SV40-Promotor, poly: SV40 late poly A-Sequenzen, Enh.: SV40-Enhancer, FII-Prom.: umfaßt Nukleotide -944 bis +31 des humanen Prothrombingens, ProFII-6: -748/+31, ProFII-7: -524/+31, ProFII-8: -331/+31, ProFII-9: -164/+31.

### 2.6.2 Einfluss der 3'-Prothrombinregion auf die Luciferaseaktivität

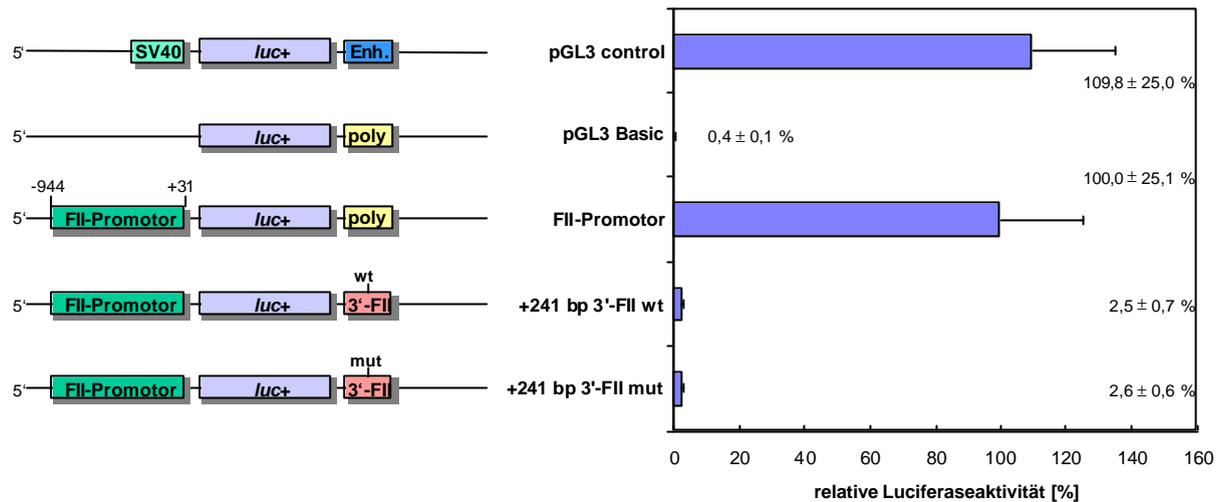
Zur Untersuchung des Einflusses der 3'-untranslatierten und -flankierenden Prothrombinregion auf die Transkriptionsaktivität wurden Prothrombin-Promotorkonstrukte hergestellt, die zusätzlich eine 241 bp Prothrombin 3'-Region von Position 20114 (direkt nach dem Stop-Codon) bis 20354 enthielten. Damit konnte der Einfluss der G20210A-Punktmutation auf die Transkriptionsaktivität des Reporters untersucht werden. Wahlweise wurde die 3'-Region entweder mit oder ohne Deletion der SV40 late poly A-Sequenzen des pGL3 Basic-Reporterplasmids direkt hinter das Luciferasegen geschaltet.



**Abb. 29: Luciferaseaktivität der Reporter-genkonstrukte in HepG2-Zellen.** Der Einfluss einer 241 bp Prothrombin 3'-untranslatieren und -flankierenden Region auf die Transkriptionsaktivierung der Luciferase-Reporter-genkonstrukte wurde untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pGL3 control mit SV40-Promotor/-Enhancer-Sequenzen eingesetzt. Zur Kontrolle der basalen Aktivität diente der Vektor pGL3 Basic ohne Promotor- oder Enhancersequenzen. *luc+*: Kodierende Sequenz des Luciferasegens aus *Photinus pyralis*, SV40: SV40-Promotor, poly: SV40 late poly A-Sequenzen, Enh.: SV40-Enhancer, FII-Promotor: umfaßt Nukleotide -944 bis +31 des humanen Prothrombingens, 3'-FII wt: 241 bp 3'-untranslatierte und flankierende Region des Prothrombingens (20114/20354) 20210G, 3'-FII mut: 20114/20354, 20210A.

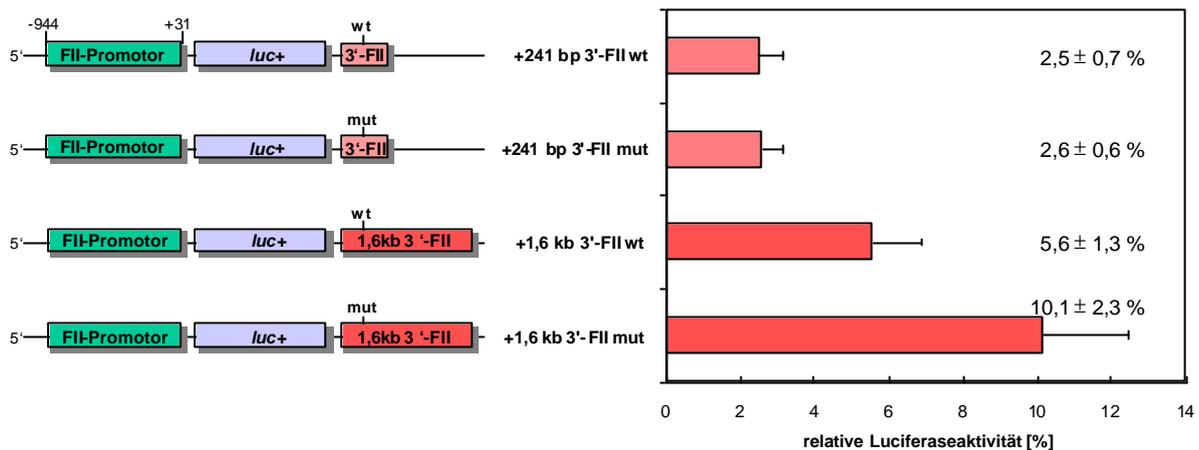
Aus Abb. 29 und Abb. 30 geht hervor, dass der Austausch der stabilisierenden SV40 3'-Bereiche durch die Prothrombin 3'-Region einen überraschend starken Abfall der Luciferaseaktivität auf 2,5 % bei der Wildtypregion bzw. 2,6 % bei Insertion der 20210A-Region zur Folge hat. Der Unterschied zwischen Wildtyp und mutierter 3'-Region war nicht signifikant ( $p = 0,9$ ,  $n = 20$ ).

Diese Daten sind konsistent mit den Untersuchungen aus Kap. 2.3.5 zur fehlerhaften Prozessierung der  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybrid-mRNA. Wieder erschien die 241 bp 3'-Region des Prothrombingens nicht funktionell.



**Abb. 30: Prozentuale Luciferaseaktivität der Reporterkonstrukte in HepG2-Zellen.** Der Einfluss einer 241 bp Prothrombin 3'-untranslatieren und -flankierenden Region auf die Transkriptionsaktivierung der Luciferase-Reportergerkonstrukte wurde untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pGL3 control mit SV40-Promotor/-Enhancer-Sequenzen eingesetzt. Zur Kontrolle der basalen Aktivität diente der Vektor pGL3 Basic ohne Promotor- oder Enhancersequenzen. Die Messwerte beziehen sich auf die Luciferaseaktivität des FII-Promotors (-944/+31). *luc+*: Kodierende Sequenz des Luciferasegens aus *Photinus pyralis*, SV40: SV40-Promotor, poly: SV40 late poly A-Sequenzen, Enh.: SV40-Enhancer, FII-Promotor: umfasst Nukleotide -944 bis +31 des humanen Prothrombingens, 3'-FII wt: 241 bp 3'-untranslatierte und flankierende Region des Prothrombingens (20114/20354) 20210G, 3'-FII mut: 20114/20354, 20210A.

Deshalb wurde eine erweiterte 1,6 kb 3'-Prothrombinregion (Kap. 0, Abb. 26) von Position 20114 bis Position 21704 anstelle der SV40-stabilisierenden 3'-Sequenzen des Vektors eingefügt. Durch den Einsatz von Wildtyp und 20210A 3'-Region sollte der Einfluss der Mutation untersucht werden.



**Abb. 31: Luciferaseaktivität der Reporterkonstrukte mit unterschiedlich langen 3'-Prothrombinfragmenten in HepG2-Zellen.** Der Einfluss einer 241 bp und 1,6 kb Prothrombin 3'-untranslatierten und -flankierenden Region auf die Transkriptionsaktivierung der Luciferase-Reportergenkonstrukte wurde untersucht. Die Messwerte beziehen sich auf die Luciferaseaktivität des FII-Promotors (-944/+31) mit SV40 late poly A-Region. *luc+*: Kodierende Sequenz des Luciferasegens aus *Photinus pyralis*, FII-Promotor: umfaßt Nukleotide -944 bis +31 des humanen Prothrombingens, 3'-FII wt: 3'-untranslatierte und flankierende Region des Prothrombingens 20210G, 3'-FII mut: 20210A.

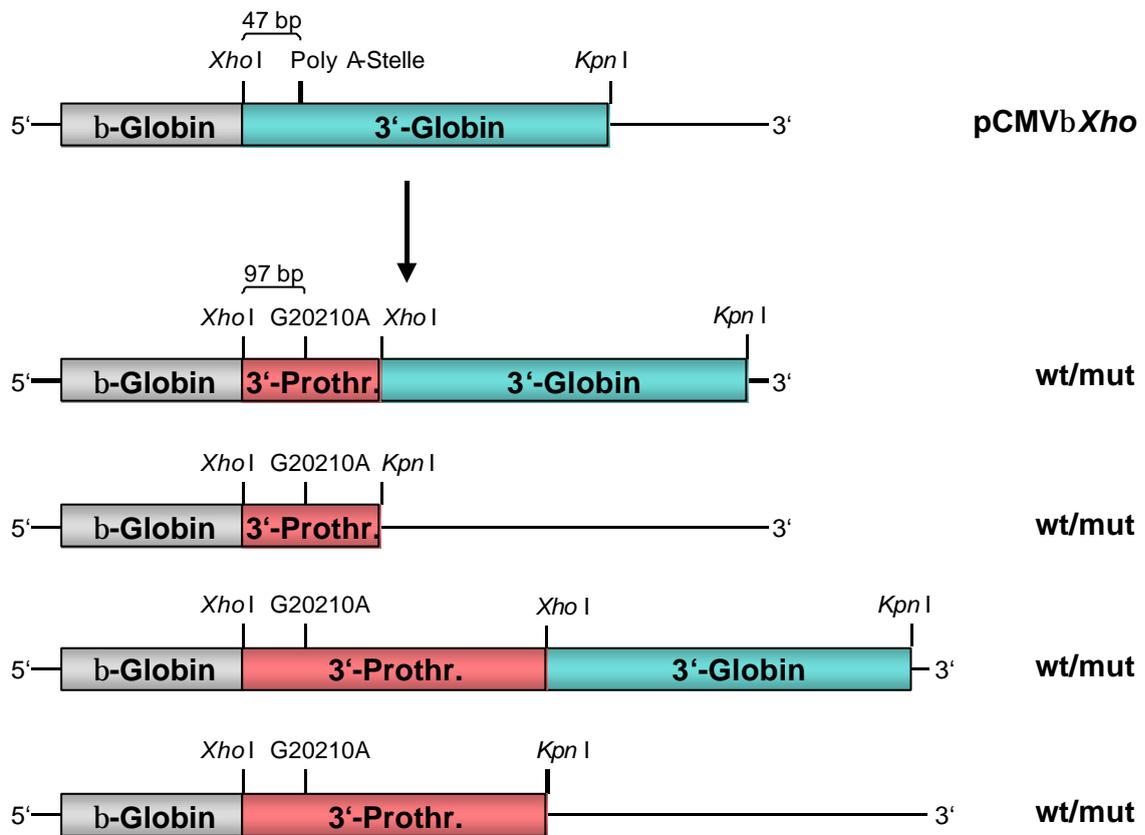
Abb. 31 zeigt nach Erweiterung der 3'-Region eine deutliche Erhöhung der Luciferaseaktivität. Für die Wildtypregion ergibt sich eine Erhöhung von 2,5 auf 5,6 %, was einer Verdoppelung der Promotoraktivität entspricht. Bei der G20210A-Mutante ist der Anstieg von 2,6 auf 10,1 % noch stärker. Der Unterschied zwischen Wildtyp und 20210A-Transition entspricht einem Faktor von 1,8 und ist hoch signifikant ( $p = 1,4 \cdot 10^{-15}$ ,  $n = 36$ ).

## 2.7 Expression der 3'-Prothrombin-Reporterkonstrukte in HepG2-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des Prothrombin 3'-Bereiches wurde erneut ein überexprimierendes Zellsystem etabliert. Der Einfluss der durch Southern Blot Analyse erweiterten 3'-flankierenden Region auf die Halbwertszeit der  $\beta$ -Globinreporterkonstrukte sollte mittels transient und stabil transfizierter HepG2-Zellen untersucht werden.

### 2.7.1 Klonierungsstrategie

Eine 241 bp sowie eine 1,6 kb 3'-untranslatierte und -flankierende Prothrombinregion wurde aus genomischer DNA von heterozygoten Patienten amplifiziert. Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden dann sowohl in die *Xho* I-Restriktionsschnittstelle des Vektors pCMV $\beta$ *Xho* als auch in die Schnittstellen *Xho* I und *Kpn* I nach Exzision der 3'- $\beta$ -Globinregion des Vektors ligiert. Der Genotyp der resultierenden Klone wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Abb. 32 zeigt die verwendeten  $\beta$ -Globinreporterkonstrukte.

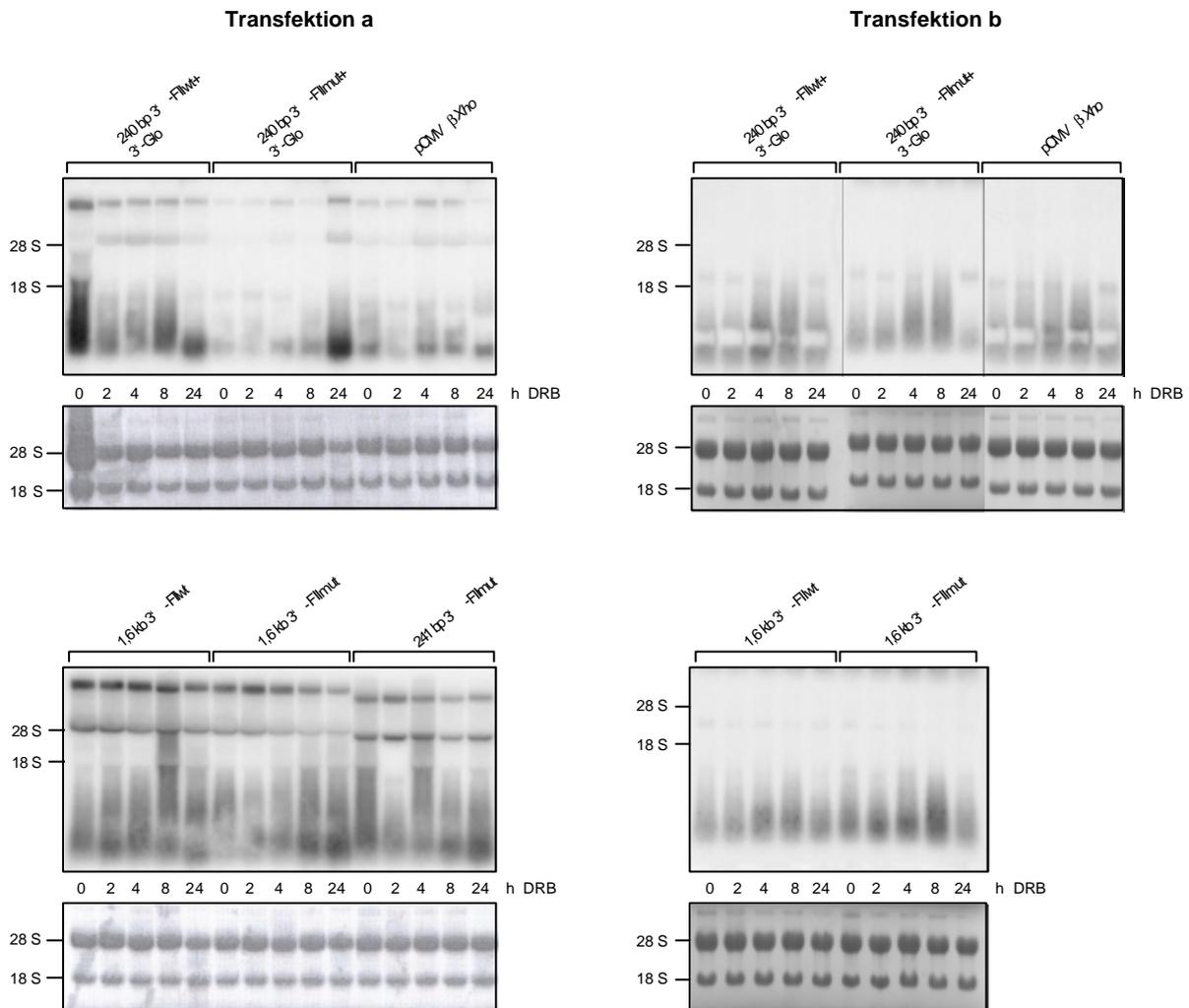


**Abb. 32: Schematische Darstellung der b-Globinreporterkonstrukte.** Klonierung einer 241 bp und einer 1,6 kb 3'-Prothrombinregion in den Säugerexpressionsvektor pCMV $\beta$ *Xho* unter Erhaltung oder Eliminierung der 3'- $\beta$ -Globinregion.

### 2.7.2 Transiente Expression von 3'-Prothrombin-Reporterkonstrukten

Die Reporterkonstrukte wurden in HepG2-Zellen mit endogener Prothrombinexpression durch Lipofectin-Transfektion mit einem Plasmid zur Standardisierung der Transfektionseffizienz eingeschleust. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DRB

behandelt, um die Transkription zu hemmen. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 h wurde jeweils die RNA isoliert und in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt.

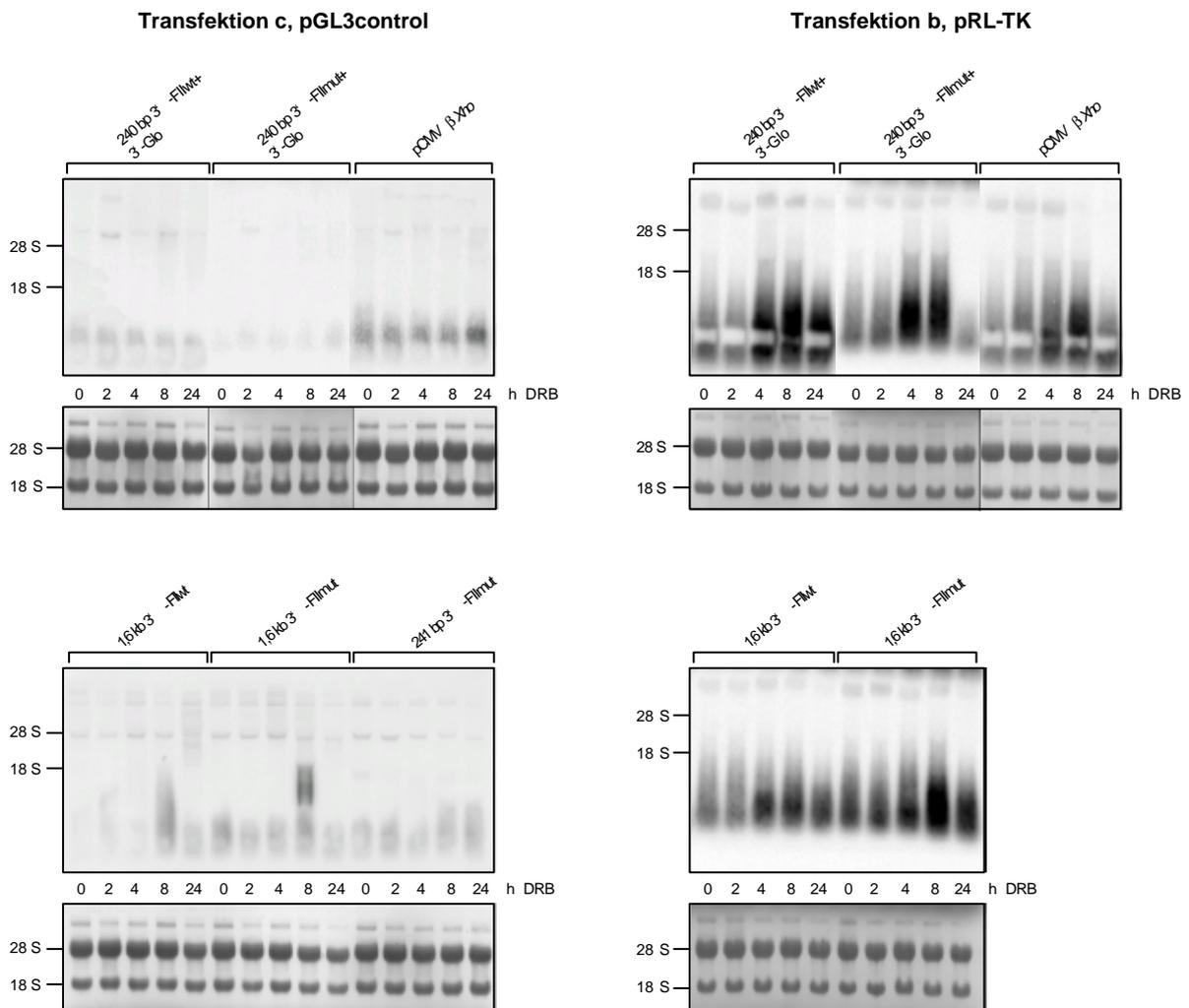


**Abb. 33: Transiente Transfektion von  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten.** Die 3'- $\beta$ -Globinregion des Vektors pCMV $\beta$ Xho wurde ersetzt durch die 241 bp 3'-untranslatierte und flankierende Region (241 bp 3'-FII) oder die 1,6 kb 3'-Prothrombinregion (1,6 kb 3'-FII) und der Einfluss der 20210G/A-Transition (wt/mut) auf die Stabilität der mRNA-Hybride im Northern Blot untersucht. Dazu wurden transient transfizierte HepG2-Zellen 24 h nach Cotransfektion mit  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten und pGL3control- bzw. pRL-TK-Luciferasevektoren zur Inhibition der Transkription mit DRB behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten danach die RNA isoliert. Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente untersucht (Transfektion a und b). Je 10  $\mu$ g RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die 28 S und 18 S rRNA-Banden wurden nach dem RNA-Transfer auf der Membran mit Methylenblau angefärbt und dokumentiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einer Kaninchen  $\beta$ -Globin-spezifischen,  $^{32}$ P-markierten Sonde. Die Expositionszeit betrug 16 h.

Abb. 33 zeigt die Northern Blot Hybridisierung der transfizierten und mit DRB-behandelten HepG2-Zellen mit einer Kaninchen  $\beta$ -Globinspezifischen Sonde. Auffallend ist die starke

Degradation der  $\beta$ -Globin-mRNA, sichtbar im unteren Bereich der Autoradiogramme. Diese Instabilität der Reporter-mRNA hängt vermutlich mit einer unspezifischen Degradation der nach transienter Transfektion überexprimierten rekombinanten Transkripte zusammen. Außerdem werden Unterschiede in der Transfektionseffizienz und der Anzahl bzw. Intensität der Transkripte deutlich. So wurde im linken Teil der Abbildung (Transfektion a) eine Doppelbande oberhalb der 28 S rRNA-Markierung detektiert, während bei einem zweiten Experiment (Transfektion b) nur eine schwache Bande oberhalb der 18 S-Höhe sichtbar war. Eine Degradation der 1,6 kb 3'-FII-mRNA während DRB-Inhibition, sowohl der unteren als auch der oberen mRNA-Bande, ist erkennbar.

Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde eine Cotransfektion mit Luciferase-Expressionsvektoren pGL3control bzw. pRL-TK durchgeführt (Abb. 34).



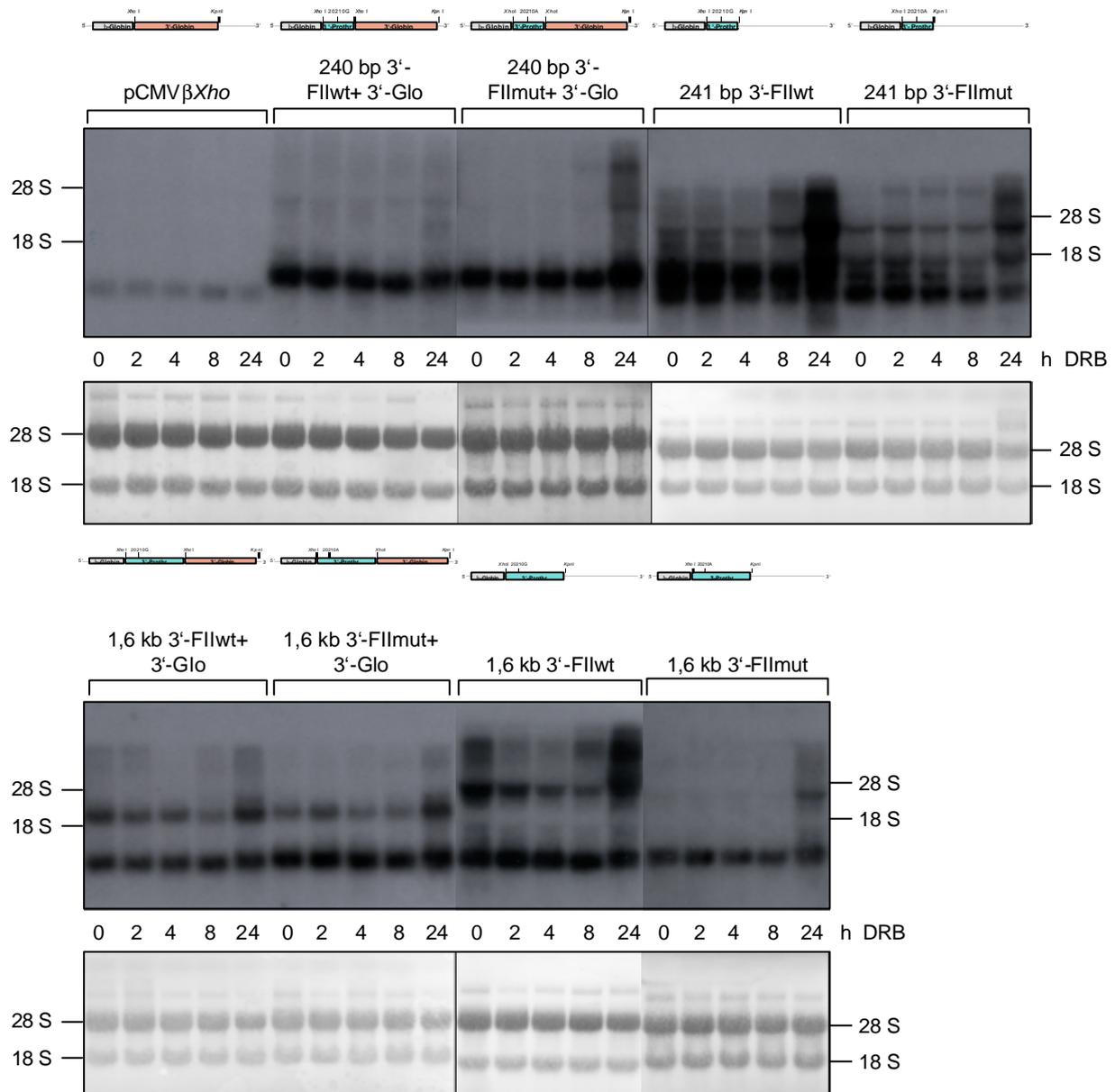
**Abb. 34: Cotransfektion von Luciferase-Expressionsplasmiden.** Nach transienter Transfektion von HepG2-Zellen mit  $\beta$ -Globinkonstrukten und pGL3control- (Transfektion c) bzw. pRL-TK-Luciferase-Expressionsvektoren (Transfektion b) erfolgte eine 24-stündige

DRB-Behandlung. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA präpariert. Jeweils 10 µg RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die ribosomale RNA wurde auf den Filtern mit Methylenblau sichtbar gemacht und die Filterfärbung dokumentiert. Die Northern Blot Hybridisierung erfolgte entweder im Falle von pGL3control-Cotransfektion mit einer Luciferase-spezifischen, <sup>32</sup>P-markierten Sonde (1689 bp *Hind* III/*Xba* I-Restriktionsfragment aus pGL3control, Transfektion a) oder bei pRL-TK-Cotransfektion mit einer *Renilla*-Luciferase-spezifischen Sonde (1212 bp *Hind* III/*Xba* I-Restriktionsfragment aus pRL-TK, Transfektion b). Die Expositionszeit betrug 16 h.

Auch die Hybridisierung mit einer spezifischen Luciferase-Sonde zeigt einen starken Abbau der mRNA. Außerdem sind z. T. zwei Signale und unterschiedliche Transfektionseffizienzen sichtbar. Die Quantifizierung der unteren Banden bei Cotransfektion mit dem Konstrukt 241 bp 3'-FIImut zeigt eine erhöhte Degradation der mRNA nach 24-stündiger DRB-Behandlung der Zellen. Die Instabilität der Luciferase-mRNA, verbunden mit vermutlich unspezifischer Degradation der nach transienter Expression in hohen Mengen exprimierten rekombinanten Transkripte, lässt eine Quantifizierung und Normalisierung der β-Globin-Hybrid-mRNA wenig sinnvoll erscheinen. Zur Umgehung dieser Probleme wurden zusätzlich stabile Transfektionen durchgeführt.

### **2.7.3 Stabile Expression von 3'-Prothrombin-Reporterkonstrukten**

Für die Transfektion wurden wie bei Kap. 2.7.2 HepG2-Zellen mit endogener Prothrombinexpression verwendet. Die Reporterkonstrukte wurden zunächst durch Restriktion mit *Kpn* I, das Resistenz-vermittelnde Plasmid pSV2neo durch Restriktion mit *Eco*R I linearisiert. Nach Cotransfektion mit Lipofectin und Selektion stabil transfizierter Klone wurden jeweils zwei bis 240 Klone vereinigt und für jedes Konstrukt ein bis zwei Mischzellpopulationen hinsichtlich der Stabilität der β-Globin-Prothrombin-mRNA untersucht. Dazu wurden die Zellen über 24 h zur Inhibition der Transkription mit DRB behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA präpariert. Die darauffolgende Northern Blot Analyse schloß eine Hybridisierung mit einer Kaninchen β-Globin-spezifischen cDNA-Sonde ein. In Abb. 35 ist für jedes Konstrukt exemplarisch jeweils ein Experiment im Northern Blot dargestellt.



**Abb. 35: Stabile Transfektion von  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten.** HepG2-Zellen wurden stabil mit verschiedenen  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten transfiziert (schematisch oberhalb der Beschriftung dargestellt). Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Hybrid-mRNA wurden die Mischklone mit DRB inhibiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die RNA isoliert. Je 10  $\mu$ g RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die rRNA mit Methylenblau angefärbt. Auf die Hybridisierung mit einer Kaninchen  $\beta$ -Globin-spezifischen,  $^{32}$ P-markierten Sonde erfolgte die 24-stündige Exposition.

Der 3'-untranslatierte Bereich des Kaninchen  $\beta$ -Globingens umfasst von der eingeführten *Xho* I-Stelle bis zur Poly A-Stelle 47 bp. So besteht bei korrekter Prozessierung nach 97 Nukleotiden der 3'-untranslatierten Region an Position 20210 des Prothrombingens eine Größendifferenz von 50 bp zwischen  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybrid-mRNA und  $\beta$ -Globinreporter-mRNA. Die unteren Banden der Konstrukte 241 bp 3'-FII, 1,6 kb 3'-FII+3'-

Glo und 1,6 kb 3'-FII befinden sich ungefähr auf gleicher Höhe mit der  $\beta$ -Globin-mRNA aus pCMV $\beta$ Xho und repräsentieren vermutlich die korrekt an der Position 20210 polyadenylierte Hybrid-mRNA. Bei den Konstrukten mit dem 240 bp 3'-Prothrombinbereich und dem nachfolgendem  $\beta$ -Globin 3'-Bereich dagegen besteht ein Größenunterschied zwischen  $\beta$ -Globin-mRNA und  $\beta$ -Globin-Prothrombin-mRNA von ca. 240 bp (vergl. Kap. 2.3.1, Abb. 16). Wie in Kap. 2.3.5 beschrieben wird das Poly A-Signal der Prothrombin 3'-Region überlesen, und die Prozessierung findet ausschließlich an der Polyadenylierungsstelle des  $\beta$ -Globins statt.

Vor allem bei den Konstrukten mit kurzem 3'-Prothrombinbereich ohne  $\beta$ -Globin 3'-UTR (241 bp 3'-FIIwt/mut) zeigen sich im Northern Blot eine Vielzahl nicht korrekt prozessierter Transkripte. Im Gegensatz hierzu führt die Verlängerung des 3'-Bereiches mit oder ohne  $\beta$ -Globin 3'-UTR (Konstrukte 1,6 kb 3'-FIIwt/mut und 1,6 kb 3'-FIIwt/mut+3'-Glo) zur Bildung von nur zwei Transkriptvarianten.

Auffallend ist ein Anstieg der Prä-mRNA und der prozessierten mRNA-Menge nach 24-stündiger DRB-Behandlung bei den Konstrukten 241 bp 3'-FII, 1,6 kb 3'-FII+3'-Glo und 1,6 kb 3'-FII. Diese Beobachtungen gelten sowohl für den Wildtyp als auch für die 20210A-Variante. Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils 10  $\mu$ g Gesamt-RNA aufgetragen, in der Regel war aber die RNA-Ausbeute der 24 h-Werte niedriger als die der anderen Werte. Somit könnte der Anstieg der mRNA-Menge mit einem Einfluss der Inhibition auch auf die Menge der ribosomalen RNA und damit mit einer Verschiebung des Gleichgewichts von ribosomaler RNA zu mRNA zusammenhängen.

Nach Quantifizierung der Signale im PhosphorImager wurden die Daten halblogarithmisch in Abhängigkeit der DRB-Behandlungsdauer grafisch dargestellt und die exponentielle Trendlinie  $N = N_0 \cdot e^{-I t}$  berechnet. Die Bestimmung der Halbwertszeit der Hybrid-mRNA

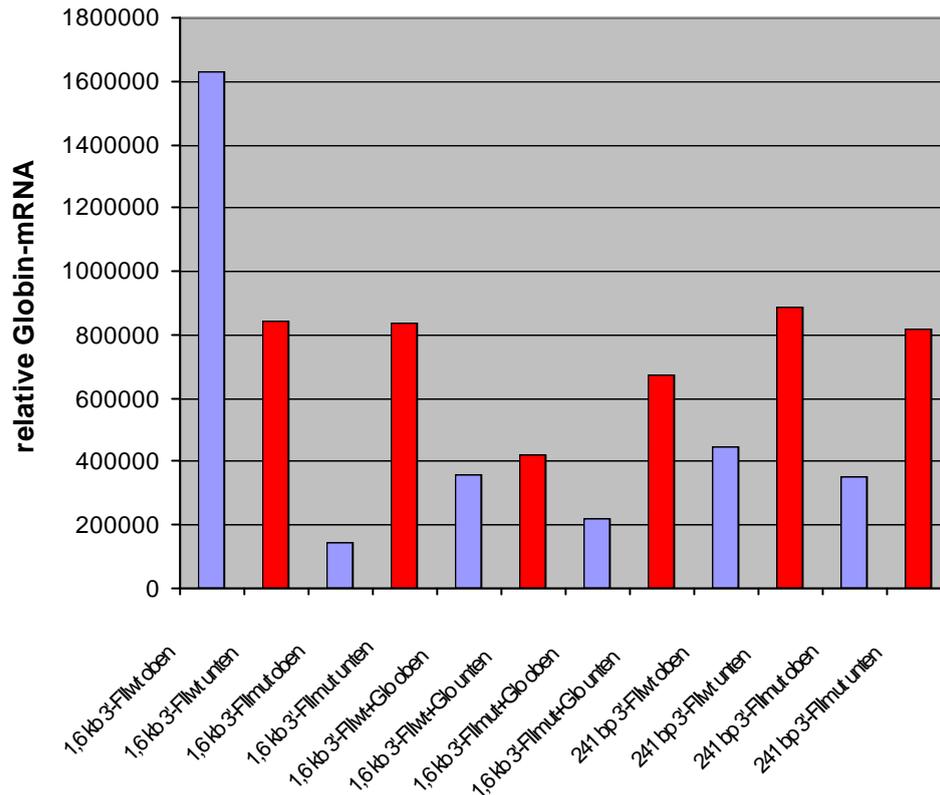
erfolgte nach  $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{I}$ .

In diesem Zellsystem ist kein Abbau der Kaninchen  $\beta$ -Globin-mRNA aus pCMV $\beta$ Xho nach 24-stündiger DRB-Behandlung messbar ( $T_{1/2} = 422,11 \pm 219,93$ ,  $n = 2$ ). Eine erhöhte Apoptosis der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit DRB war zu beobachten, was sich durch Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Kulturschalen bemerkbar machte. Die offensichtlich toxischen Einflüsse von DRB auf die HepG2-Zellen machten eine Quantifizierung und Halbwertszeitmessung der relativ stabilen Hybrid-mRNA schwierig.

Dies hatte negative Halbwertszeitmessungen und ansteigende Trendlinien oder sehr hohe Halbwertszeiten oberhalb von 100 h zur Folge.

Bei Vernachlässigung der negativen Halbwertszeiten ergibt sich für das Konstrukt 240 bp 3'-FIIwt+3'-Glo eine Halbwertszeit von  $58,83 \pm 15,72$  ( $n = 4$ ) und für die Mutante eine Halbwertszeit von  $59,69 \pm 25,72$  ( $n = 2$ ). Damit liegen die Werte im Bereich der Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA aus HepG2-Zellen ( $53,9 \pm 14,6$ ) und Rattenleberzellen ( $49,1 \pm 11,1$ ) wie in Kap. 2.2.3 beschrieben. Allerdings liegen sie deutlich höher als nach stabiler Transfektion der beiden Konstrukte in einen HepG2-Laborstamm, der keine endogene Prothrombinexpression aufweist (Kap. 2.3).

Bei keinem der Konstrukte lassen sich jedoch Anhaltspunkte für eine verlängerte Halbwertszeit der 20210A Hybrid-mRNA finden. Unterschiede bestehen allerdings, wie schon in Kapitel 2.4.2, Abb. 21, beschrieben, im Verhältnis von prozessierter zu Prä-mRNA. Die Quantifizierung von oberen und unteren Banden der Konstrukte 1,6 kb 3'-FII, 241 bp 3'-FII und 1,6 kb 3'-FII+3'-Glo ergibt eine Verschiebung zugunsten der prozessierten Transkripte (untere Banden) bei den mutierten Konstrukten 1,6 kb 3'-FII und 1,6 kb 3'-FII+3'-Glo (Abb. 36).



**Abb. 36: Vergleich der Transkriptmengen der verschiedenen  $\beta$ -Globin-Prothrombin mRNA-Hybride.** HepG2-Zellen wurden stabil mit verschiedenen  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten (1,6 kb 3'-FIIwt/mut, 241 bp 3'-FIIwt/mut und 1,6 kb 3'-FIIwt/mut+Glo) transfiziert und die Klone vereinigt. Je 10  $\mu$ g RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Kaninchen  $\beta$ -Globin-spezifischen,  $^{32}$ P-markierten Sonde hybridisiert. Obere und untere Transkripte (oben und unten) wurden quantifiziert und mit Hilfe von EXCEL grafisch dargestellt.

Bei dem mutierten Konstrukt 241 bp 3'-FIIwt ist keine eindeutige Verschiebung zugunsten der korrekt polyadenylierten Transkriptvariante messbar. Allerdings zeigt die Betrachtung der Northern Blot Analyse mindestens zwei weitere Transkripte oberhalb der unteren Bande, die bei dem Wildtyp-Konstrukt deutlich stärker erscheinen (Abb. 35).

## 3 Diskussion

### 3.1 Die G20210A-Mutation in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens

Der von Poort et al. erstmals 1996 beschriebene G20210A Prothrombin-Polymorphismus geht bei heterozygoten Trägern der Punktmutation mit einer 1,25- bis 1,3-fach erhöhten Prothrombin-Konzentration im Plasma und einer erhöhten Thromboseneigung einher (Poort et al., 1996; Makris et al., 1997; Toso et al., 1999). Einen ersten Hinweis auf einen tatsächlichen kausalen Zusammenhang zwischen Mutation, erhöhtem Plasma-Prothrombinspiegel sowie erhöhtem Thromboserisiko lieferte eine *Linkage* Analyse (Soria et al., 2000). Diese Studie basierte auf der Untersuchung von Familien mit mindestens einem thrombotischen Ereignis. Es konnte eindeutig eine Korrelation zwischen 20210G/G-, G/A- und A/A-Genotyp, Prothrombinspiegel und Thromboserisiko hergestellt werden, wobei Patienten, die homozygot bezüglich des 20210A-Allels sind, die höchsten Prothrombinkonzentrationen im Plasma aufweisen. Die Hypothese wird durch das Fehlen anderer Polymorphismen in Promotor und kodierender Region des Prothrombingens unterstützt (Poort et al., 1996; Zivelin et al., 1998).

Betroffen von der Mutation ist das 3'-terminale Nukleotid in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens. Für den erhöhten Plasmaspiegel könnten demnach eine erhöhte mRNA-Stabilität, Transkriptionseffizienz, Translationsrate oder eine verbesserte Prozessierung verantwortlich sein (Poort et al., 1996; Gehring et al., 2001). Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, die zu einer Erhöhung der Prothrombinkonzentration durch die G20210A-Mutation führen, wurde in der vorliegenden Arbeit die mutierte 3'-Prothrombinregion in  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten untersucht. Weiterhin wurde sie durch rekombinante Überexpression in verschiedenen Zelllinien mit der Wildtyp-Region verglichen. Für die optimale Expression von Luciferasereporterkonstrukten wurden verschiedene Promotorregionen des Prothrombingens untersucht und der Einfluss der 3'-UTR auf die Luciferaseaktivität getestet.

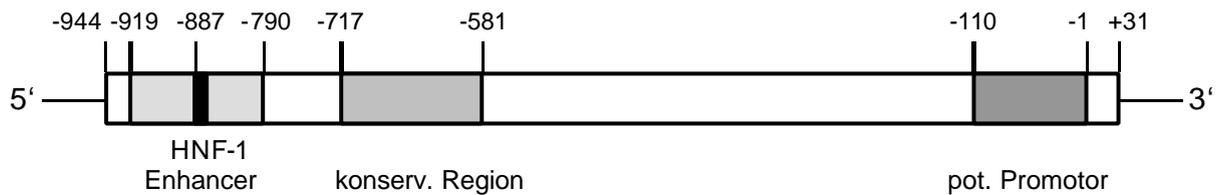
## 3.2 Regulation des Prothrombingens

### 3.2.1 Promotorregulation des Prothrombingens

Der Hauptsyntheseort von Prothrombin ist die Leber (Barnhart, 1960; Jamison und Degen, 1991). Allerdings konnte die Expression von geringen Mengen an Prothrombin auch im Gehirn und neuralen Zelllinien (Dihanich et al., 1991; Weinstein et al., 1995), im Skelettmuskel der Maus (Zoubine et al., 1996) und in differenzierten Skelettmuskelzellen (Glazner et al., 1997; Kim und Nelson, 1998) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Zellen und verschiedene Zelllinien hinsichtlich ihrer Prothrombinexpression untersucht (Kap. 2.1 und Kap. 2.2). Ein Nachweis der Expression von Prothrombin auf mRNA-Ebene gelang jedoch nur in der Lebercarcinomzelllinie HepG2 (Abb. 7) und in primären Rattenleberzellen (Kap. 2.2.2, Abb. 10). Keine Expression war in der humanen embryonalen Leberzelllinie CL-48, den humanen Leberzellen CCL-13, der humanen Leber-Adenocarcinomzelllinie SK-HEP-1, in COS-1- und HeLa-Zellen sowie in primären Zellen wie HUVEC und vaskulären glatten Muskelzellen aus Maus und Schwein detektierbar (Kap. 2.1, Abb. 7). Gründe für einen Verlust der Expression in Leberzellen könnten im Differenzierungsstatus der Zellen zu suchen sein. Kultivierung von Hepatozyten über einen längeren Zeitraum kann zum Verlust der Expression spezifischer Faktoren und zur Entdifferenzierung der Zellen führen (Baumhueter et al., 1988; Baker et al., 2001). So ist der Transkriptionsfaktor HNF-1 (*hepatocyte nuclear factor-1*) für die leberzellspezifische Expression einiger Gene verantwortlich (Courtois et al., 1988).

Einheitliche regulatorische Sequenzen für die leberzellspezifische Expression von Vitamin K-abhängigen Faktoren sind bisher nicht bekannt (Sun und Degen, 2001). Einzig das Fehlen von kanonischen TATA- und CCAAT-Sequenzen in der Promotorregion der Gene stellt eine Gemeinsamkeit dar (Pollak et al., 1996; Hung und High, 1996; Stauffer et al., 1998).

Zur Analyse der leberzellspezifischen Prothrombin-Promotoraktivität wurden verschiedene Deletionsmutanten der 5'-flankierenden Region vor ein Luciferasereporter gen geschaltet und die Luciferaseaktivität der verschiedenen Konstrukte nach transienter Transfektion in HepG2-Zellen bestimmt (Kap. 2.6). Das längste Fragment, das die Region von -944 bis +31 der 5'-flankierenden und untranslatierten Region umfaßt (Abb. 37), zeigte dabei die höchste Aktivität. Sie betrug ca. 70 % im Vergleich zum Kontrollplasmid, bei dem das Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promotors stand (Kap. 2.6.1, Abb. 27).



**Abb. 37: Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente in der 5'-flankierenden Region des Prothrombingens** (verändert nach Degen und Sun, 1998). □ : Enhancer-Element (Pos. -919 bis -790), ■ : potentielle HNF-1-Bindungsstelle (Pos. -887 bis -875), ▨ : konservierte Region (Pos. -717 bis -581), ▩ : potentielle Promotorregion (Pos. -110 bis -1).

Die Deletion des Sequenzbereichs -919 bis -790 bewirkte eine deutliche Verringerung der Luciferaseaktivität um ca. 50 % im Vergleich zum Ausgangskonstrukt -944/+31 (Abb. 27). Die Deletion weiterer 5'-Bereiche auf -748, -524 und -331/+31 hatte keine weitere Reduzierung der transkriptionellen Aktivität zur Folge. Bei Eingrenzung der 5'-Region auf den Bereich -164 bis +31 mit der potentiellen Promotorregion (-110/-1) des Prothrombingens ist noch eine basale Aktivität von ca. 30 % des Ausgangskonstrukts -944/+31 detektierbar. Die Reduktion der Luciferaseaktivität nach Deletion des Sequenzbereichs -919 bis -790 deckt sich mit der von Chow et al. (1991) und Bancroft et al. (1992) beschriebenen potentiellen Bindungsstelle für HNF-1 (-919/-849) und einem Enhancer-Element im Sequenzbereich -919 bis -790. Die Autoren zeigten nach Verkürzung der 5'-Region auf -876 bzw. -849 ebenfalls eine Reduktion der Promotoraktivität und identifizierten die Region -887 bis -875 durch Homologievergleich als potentielle Bindungsstelle für den leberspezifischen Faktor HNF-1. HNF-1 ist für die leberzellspezifische Expression verschiedener Gene verantwortlich. Dazu gehören  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein und die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von Fibrinogen (Courtois et al., 1988; Frain et al., 1989; Monaci et al., 1988). Vermutlich vermittelt oder potenziert die potentielle HNF-1-Erkennungssequenz eine leberspezifische Expression von Prothrombin. Allerdings war nach Deletion dieser Region bei Chow et al. und Bancroft et al. nur noch eine geringe oder gar keine *cis*-wirksame Aktivität der 5'-Bereiche feststellbar. Die hier präsentierten Daten sprechen für die Existenz zusätzlicher transkriptionsaktivierender Elemente. Da in der Cervixcarcinomzelllinie HeLa keines der beschriebenen Konstrukte Luciferaseaktivität induzierte (Abb. 28), scheint es sich dabei um leberspezifische Sequenzelemente zu handeln. Die zusätzliche Reduktion nach Deletion der Bereiche -789 bis -165 auf 30 % Restaktivität (Abb. 27) könnte auf die Existenz von mindestens zwei weiteren Elementen hinweisen.

Die Deletion der 5'-Region im Bereich -748 bis -523 mit der konservierten Region -717/-581 führte zu keiner signifikant erniedrigten Promotoraktivität, was bedeuten würde, dass die konservierte Region keinen regulatorischen Einfluss besitzt.

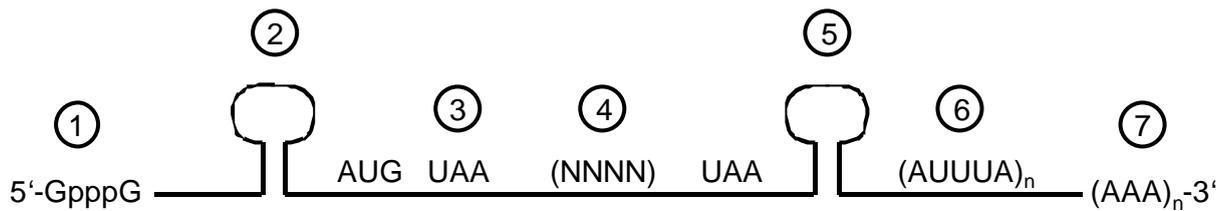
5'-flankierende Prothrombinsequenzen zeigten nach Transfektion der humanen Cervixcarcinomzelllinie HeLa eine nur minimale Transkriptionsaktivierung leicht oberhalb der basalen Aktivität des Vektors ohne Promotorsequenzen (Abb. 28). Für die Initiation der Transkription sind demnach *trans*-wirksame leberzellspezifische Faktoren notwendig. Bancroft et al. konnten 1992 allerdings in *Electrophoretic Mobility Shift* und *DNase Footprint* Analysen auch Protein-DNA-Komplexe in der Sequenzregion zwischen -919 und -790 mit HeLa-Zellextrakten detektieren. Die Beteiligung von nicht-leberzellspezifischen Faktoren an der Regulation, nicht aber bei der Initiation der Transkription, erscheinen somit möglich. Hierbei könnte es sich um einen ubiquitär vorkommenden Enhancer handeln.

### **3.2.2 Stabilität der endogenen Prothrombin-mRNA**

Die Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA wurde mit  $53,9 \pm 14,6$  h in der humanen Lebercarcinomzelllinie HepG2 sowie mit  $49,1 \pm 11,1$  h in primären Rattenleberzellen bestimmt (Abb. 12). Der Unterschied von 4,8 h war nicht signifikant ( $p = 0,55$ ). Damit ergab sich kein Unterschied in der Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA bei den untersuchten Spezies. Bisher sind noch keine Daten hierzu aus der Literatur bekannt.

In eukaryotischen Zellen variiert die Halbwertszeit verschiedener mRNAs zwischen wenigen Minuten (*c-fos*-, *c-myc*-mRNA) und mehreren Stunden oder sogar Tagen (Globin-mRNA, Lodish und Small, 1976; Volloch und Housman, 1981; Ross und Sullivan, 1985). Die vergleichsweise hohe Halbwertszeit spricht für eine große Stabilität der Prothrombin-mRNA. Eine erhöhte mRNA-Stabilität kann durch fehlende destabilisierende Elemente bedingt sein. Die mRNA-Menge in der Zelle ist damit keiner strikten Regulation unterworfen. Es sind aber auch Sequenzelemente bekannt, die die betreffende mRNA vor Degradation schützen.

An der Modulation der Abbaugeschwindigkeit sind regulatorische Elemente beteiligt, die sowohl in den untranslatierten Regionen als auch in der kodierenden Region lokalisiert sein können. Auch die 5'-Kappe, das Poly A-Ende und Sekundärstrukturen können die mRNA-Stabilität beeinflussen (Abb. 38).



**Abb. 38: mRNA-Stabilitätsdeterminanten** (nach Sachs, 1993). Sequenzelemente, die an der Regulation der mRNA-Stabilität beteiligt sind, sind in verschiedenen Bereichen der mRNA lokalisiert. (1) 5'-Kappe, (2) Sekundärstrukturen in der 5'-UTR, (3) vorzeitige Stop-Codons, (4) Sequenzmotive im kodierenden Bereich, (5) Sekundärstrukturen in der 3'-UTR, (6) Destabilisierungselemente in der 3'-UTR (z. B. AREs). (7) Poly A-Ende. AUG: Start-Codon, UAA: Stop-Codon.

Zudem tragen destabilisierende Sequenzmotive in der 3'-UTR zu einem schnelleren Abbau der betroffenen mRNA bei (Abb. 38 ©). Dazu gehören *AU-rich elements* (AREs), die eine oder mehrere Kopien des Pentanukleotids AUUUA in einer U-reichen Region enthalten. Als klassisches Beispiel für eine mRNA mit ARE-Sequenzmotiv dient die *c-fos*-mRNA (Treisman, 1985). Die Regulation der mRNA-Stabilität erfolgt durch ARE-Bindeproteine wie AUF-1 und HuR. Während AUF-1 eine schnelle Degradation der betroffenen mRNA einleitet, hat die Bindung von HuR stabilisierende Funktion.

Sequenzelemente, die durch Inhibition von Abbauwegen zu einer Stabilisierung der mRNA führen, wurden für das  $\alpha$ -Globintranskript beschrieben. Die  $\alpha$ -Globin-mRNA enthält in der 3'-UTR eine Endonuklease-Schnittstelle. Durch Bindung des  $\alpha$ -CP-Komplexes an ein überlappendes C-reiches Element wird die Schnittstelle maskiert und die mRNA vor endonukleolytischem Abbau geschützt (Wang et al., 1999; Wang und Kiledjian, 2000). Der  $\alpha$ -CP-Komplex interagiert außerdem mit Poly A-Bindeproteinen (PABP) und erhöht damit ihre Bindungsaffinität. Die erhöhte Stabilität des Poly A-PABP-Komplexes schützt vermutlich die  $\alpha$ -Globin-mRNA zusätzlich vor Deadenylierung (Wang et al., 1999).

Auch die Translation beeinflusst die Abbaugeschwindigkeit einer mRNA. So konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der Translationsinitiation mRNA destabilisiert wird (Schwartz und Parker, 1999), wohingegen die Inhibition der Translationselongation zur Stabilisierung führt (Beelman und Parker, 1994).

Die Prothrombin-mRNA zeichnet sich durch eine hohe Stabilität in Leberzellen aus. Die Halbwertszeit von ca. 50 h wurde sowohl in primären Rattenzellen als auch in der Leberzelllinie HepG2 gemessen. Carter et al. (2002) konnten eine Bindung des stabilisierenden ARE-Bindeproteins HuR an die Prothrombin 3'-UTR zeigen. Keine Bindung

erfolgte durch den destabilisierenden Faktor AUF-1. Da diese Region kein AUUUA-Sequenzmotiv enthält, könnte als *cis*-regulatorisches Element ein noch nicht identifiziertes Klasse II ARE-Motiv fungieren. Klasse II AREs zeichnen sich durch das Fehlen des AUUUA-Pentamers aus. Als *cis*-Element dient hier eine U-reiche Region. Die hohe Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA könnte demnach durch Bindung des stabilisierenden Faktors HuR an ein ARE-Motiv in der 3'-UTR bedingt sein.

### **3.2.3 Analyse der 3'-Prothrombinregion mit $\beta$ -Globinreporterkonstrukten**

Zur Untersuchung der Hypothese, dass die 20210A-Variation aufgrund einer Stabilisierung der Prothrombin-mRNA zu den erhöhten Prothrombinkonzentrationen im Plasma führt, wurde der Prothrombin 3'-Bereich in eine Kaninchen  $\beta$ -Globin-mRNA inseriert. Die Halbwertszeit der Kaninchen  $\beta$ -Globin-mRNA in stabil transfizierten HepG2-Zellen ergab einen Wert von  $32,8 \pm 5,7$  h (Kap. 2.3.4). Dabei stand das  $\beta$ -Globin unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Aufgrund der sehr stabilen  $\beta$ -Globin-mRNA ermöglichte dieses Vektorsystem die Messung des Einflusses beider Varianten der 240 bp 3'-untranslatierten und flankierenden Region des Prothrombingens auf die mRNA-Stabilität des Reporters. Durch Einfügen der 97 bp 3'-UTR und 143 bp flankierenden Region (Kap. 2.3.1) verringerte sich die Halbwertszeit der Hybrid-mRNA entscheidend auf  $17,4 \pm 5,3$  h (Wildtyp) bzw.  $17,2 \pm 4,5$  h (20210A). Zwischen Wildtyp und Mutante war kein signifikanter Unterschied in der Halbwertszeit messbar (Kap. 2.3.4, Abb. 17 und Tab. 5). Dies bedeutet, dass die G20210A-Mutation am 3'-Ende der 3'-UTR des Prothrombingens keinen Einfluss auf die Halbwertszeit der Hybrid-mRNA hat. Konträr dazu sind die Befunde von Carter et al. (2002). Die Autoren wiesen bisher als Einzige eine durch die Mutation verlängerte Halbwertszeit der  $\beta$ -Globin-Hybrid-mRNA nach. Die  $\beta$ -Globin-Konstrukte unterschieden sich jedoch von den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen durch ausschließliche Verwendung der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens. Sie enthielten keine flankierende 3'-Prothrombinsequenzen. Die Autoren konnten in stabilen Expressionssystemen eine Verlängerung der Halbwertszeit der 20210A-Transkriptvariante auf ca. 20 h gegenüber ca. 10 h bei Wildtyp-mRNA beobachten. Diese Ergebnisse sind nicht direkt vergleichbar, da andere Konstrukte verwendet wurden. Zudem erfolgte die Quantifizierung ausschließlich durch Real-Time-PCR, welche im Vergleich zum Northern Blot Einschränkungen unterliegt. Die Real-Time PCR gilt als sehr sensitiv. Gerade aber hier gibt es Probleme, da geringste Schwankungen an Ausgangsmaterial am Anfang einer PCR zu erheblichen Schwankungen im Produkt führen können.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung der exprimierten Hybrid-mRNA in jeweils drei verschiedenen Mischzelllinien ergab in zwei Experimenten keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (Kap. 2.3.3, Tab. 3). Für die in einem Fall um das dreifache erhöhte Wildtypexpression könnten auch eine unterschiedliche Anzahl vereinigter Zellklone, eine unterschiedliche Anzahl in das Chromatin integrierter Kopien oder der Ort der Insertion eine Rolle spielen (Nanbu und Nagamine, 1997). Diese Messung ist stark von den Transfektionsvariablen abhängig und kann nicht zur Bestimmung von erhöhten Transkriptmengen aufgrund einer verlängerten mRNA-Halbwertszeit herangezogen werden. Zur Messung der Halbwertszeit einer mRNA sind deshalb Transkriptions-Inhibitionsexperimente unerlässlich.

Die Laufeigenschaften der Hybrid-Signale im Northern Blot vermitteln den Eindruck eines gegenüber der  $\beta$ -Globin-Reporter-mRNA verlängerten Transkripts (Abb. 16). Die Vermutung lag nahe, dass die Polyadenylierung nicht korrekt an der Polyadenylierungsstelle der 3'-Prothrombinregion statt fand, sondern erst an der stromabwärts folgenden Poly A-Stelle des  $\beta$ -Globins. Die Untersuchung der Hybrid-mRNA mittels reverser Transkription, spezifischer Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung zeigte, dass die  $\beta$ -Globin-Polyadenylierungsstelle des Vektors für die Prozessierung maßgeblich war und die mRNA-Hybride zusätzliche 3'-Sequenzen enthielten (Abb. 18). Bei beiden mRNA-Varianten erfolgte die Prozessierung an der  $\beta$ -Globin-Polyadenylierungsstelle des Reporterplasmids. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die bis dahin bekannte 240 Basenpaare umfassende 3'-untranslatierte und flankierende Prothrombinregion für eine korrekte Polyadenylierung an Position 20210 nicht ausreichend war oder die *cis*-wirksamen Elemente der 3'-Globinregion *trans*-wirksame Faktoren stärker rekrutierten als diejenigen der 3'-Prothrombinregion.

Zusätzlich wurde die komplette Prothrombin-cDNA mit 143 bp 3'-flankierender Sequenz in einen Expressionsvektor ohne SV40-Poly A-Region kloniert, und HepG2 sowie COS-1-Zellen wurden stabil transfiziert (Kap. 2.4.1). Die Bestimmung der Halbwertszeit der Wildtyp- und 20210A-mRNA ergab in keiner der beiden Zelllinien einen Hinweis auf eine durch die Mutation erhöhte mRNA-Stabilität (Kap. 2.4.2). Vielmehr zeigten sich in der Northern Blot Analyse der beiden Zelllinien zwei Transkripte, von denen das kleinere die vermutlich polyadenylierte mRNA darstellt. Ein Vergleich mit der endogenen Prothrombin-mRNA, die die gleiche Fragmentgröße aufweist, unterstützt diese Vermutung. Das größere Fragment könnte die Prä-mRNA oder eine falsch prozessierte verlängerte mRNA repräsentieren. Durch die Mutation erfolgte eine Verschiebung zugunsten der korrekt prozessierten mRNA.

Zur Untersuchung des Einflusses weiter stromabwärts gelegener Sequenzen der 3'-flankierenden Prothrombinregion auf die Prozessierung und Halbwertszeit der mRNA wurden mittels Screening einer humanen genomischen P1-Bibliothek weitere 1350 bp 3'-flankierende Prothrombinsequenz aufgeklärt (Abb. 26, Acc. No. AF493953). Diese erweiterte 3'-Prothrombinregion wurde ebenfalls in den  $\beta$ -Globinreportervektor inseriert. Die Expression der Reporterplasmide wurde in HepG2-Zellen mit endogener Prothrombinexpression untersucht. Bei transienter Transfektion der Zellen war eine schlechte Prozessierung der Transkripte und ein starker Abbau der mRNA zu verzeichnen (Kap. 2.7.2, Abb. 33 und Abb. 34). Deshalb konnte keine Quantifizierung der Hybrid-mRNA und somit keine Halbwertszeitmessung bei transient transfizierten Zellen durchgeführt werden. Bei stabiler Transfektion der Reporterkonstrukte war dagegen die mRNA intakt (Kap. 2.7.3, Abb. 35). Auch in diesem Zellsystem erfolgte die Polyadenylierung ausschließlich an der  $\beta$ -Globin Poly A-Stelle des Vektors.

Nach Deletion der  $\beta$ -Globin 3'-Region sind eine Vielzahl nicht korrekt prozessierter Transkripte detektierbar. Dabei entspricht vermutlich das kleinste Transkript der korrekt an der Poly A-Stelle (Position 20210) polyadenylierten mRNA. Nach Insertion der erweiterten 3'-Prothrombinregion sind sowohl mit als auch ohne 3'-Vektorregion nur noch zwei Transkripte vorhanden, von denen das kleinere wiederum die vermutlich korrekt polyadenylierte mRNA repräsentiert, während das größere die Prä-mRNA darstellt. Diese Reduzierung der Transkripte nach Insertion zusätzlicher 3'-flankierender Sequenzen zeigt, dass hier weitere regulatorische Elemente liegen, die die korrekte Polyadenylierung unterstützen. Die 3'-Globinregion des Vektors hat nach Insertion der verlängerten 3'-Prothrombinregion keinen Einfluss mehr auf die Polyadenylierung der Prä-mRNA. Trotz zusätzlicher 3'-flankierender Sequenzen ist die Prozessierung der  $\beta$ -Globin-Prothrombin-mRNA-Hybride nicht quantitativ. Vermutlich enthält die Prothrombin 3'-Region nur ein schwaches Poly A-Signal, das nicht zu einer 100%igen Polyadenylierung führt. Ein Unterschied in der Menge an polyadenylierter mRNA zu Prä-mRNA zeigte sich jedoch bei der Mutation. Die 20210A-Hybrid-Variante bewirkt eine Zunahme an polyadenylierter mRNA, bei gleichzeitiger Abnahme der Prä-mRNA (Abb. 36). Dies spricht ebenfalls für eine verbesserte Polyadenylierungseffizienz durch die Mutation und damit für eine erhöhte Menge an funktioneller mRNA.

Eine Halbwertszeitbestimmung der Hybride gestaltete sich schwierig, da die Transkriptmenge nach 24-stündiger DRB-Behandlung teilweise anstieg. Zudem war eine erhöhte Apoptosis der Zellen nach längerer Behandlung mit DRB zu beobachten. Diese scheinbar toxischen Effekte

durch DRB erlaubten die Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit nur für einige Konstrukte. Es ergaben sich Halbwertszeiten im Bereich der Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA aus HepG2-Zellen ( $53,9 \pm 14,6$  h) und Rattenleberzellen ( $49,1 \pm 11,1$  h), die in ihrer großen Stabilität der rekombinanten Prothrombin-mRNA ähneln (Kap. 2.4.2). Diese zeigte in stabil transfizierten HepG2- und COS-1-Zellen über den betrachteten Zeitraum von 24 h keine Degradation. Allerdings liegen die Halbwertszeiten deutlich höher als in einem HepG2-Laborstamm, der keine endogene Prothrombinexpression aufwies (Kap. 2.3). Dies spricht dafür, dass die Expression von leberspezifischen Faktoren in den differenzierteren Zellen zu einer Stabilisierung der mRNA beitragen. Vermutlich exprimieren entdifferenzierte Zellen im Gegensatz zu Zellen mit endogener Prothrombinexpression keine Faktoren, die an der Regulation der Prothrombinhalbwertszeit beteiligt sind. Damit wäre die Untersuchung der Prothrombinregulation in nicht-leberspezifischen Zellsystemen, wie sie von Gehring et al. (2001) durchgeführt wurde, fraglich. Für die übrigen Konstrukte mit verlängerter 3'-Prothrombinregion ließ sich kein Abbau der mRNA über den betrachteten Zeitraum von 24 h nachweisen.

Diese Befunde werden unterstützt durch die Studie von Pollak et al. (2002), die *in vivo* die Menge an 20210G und 20210A Prothrombin-mRNA verglichen haben. Die Autoren argumentieren, dass im Falle einer Erhöhung des Prothrombingehalts um 25 % bei heterozygoten Trägern eine um das 1,5-fach erhöhte Prothrombin-mRNA-Menge notwendig sei. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde mRNA aus der Leber eines 20210G/A heterozygoten Patienten isoliert, revers transkribiert und spezifisch für Prothrombin-cDNA amplifiziert. Die daraus resultierenden Klone wurden sequenziert. Insgesamt wurden 70 Klone analysiert, von denen 54 % ein G an Position 20210 enthielten, also dem Wildtyp entsprachen, und 46 % die Mutation 20210A trugen. Eine Erhöhung der 20210A-Transkriptmenge durch eine verlängerte Halbwertszeit oder andere posttranskriptionelle Mechanismen lag demnach nicht vor. Vielmehr waren beide mRNA-Mutanten gleichmäßig exprimiert. Allerdings zeigte sich, wie auch in dieser Arbeit, ein Unterschied im 3'-Polyadenylierungsmuster der beiden Transkriptvarianten (Abb. 36). Während alle cDNA-Klone der 20210A-mRNA an Position 20210A polyadenyliert waren, wiesen 74 % der 20210G-Klone eine Polyadenylierung an Position 20212 auf. Bei den restlichen 26 % der Transkripte erfolgte dagegen die Anheftung des Poly A-Endes wie erwartet an Position 20210. Pollak et al. postulieren aufgrund dieser Befunde eine Modifikation der Prothrombinproteinmenge durch translationale Mechanismen. Eine Erhöhung der Translationseffizienz könnte kausal mit unterschiedlichen Poly A-Längen oder veränderten

Bindungsaffinitäten *trans*-wirksamer Faktoren in Zusammenhang stehen (Gehring et al., 2001).

Zu völlig anderen Daten kam die Studie von Gehring et al. aus dem Jahre 2001. Hier wurden Hybrid-Konstrukte mit humanem  $\beta$ -Globin verwendet, bei dem 3'-UTR und 62 bp 3'-flankierende Region des  $\beta$ -Globingens durch 3'-UTR und 140 bp 3'-flankierende Region von Prothrombin 20210G bzw. 20210A ersetzt wurde. HeLa-Zellen wurden transient mit diesen Konstrukten transfiziert und eine Northern Blot Analyse von cytoplasmatischer RNA der transfizierten Zellen zeigte eine im Mittel 1,8-fach erhöhte Akkumulation von 20210A-Hybrid-mRNA. Die Untersuchung der  $\beta$ -Globinmengen mittels Immunoblot zeigten eine damit korrelierende erhöhte Proteinexpression bei dem mutierten Konstrukt. Die Autoren postulierten daraus einen kausalen Zusammenhang zwischen einem durch die Mutation erhöhten mRNA-Gehalt und dem erhöhten Plasmagehalt an Prothrombin bei Patienten und führen diesen auf eine durch die Mutation verbesserte Prozessierungseffizienz zurück. Wie in Kap. 2.7.2, Abb. 33, gezeigt, ist die Untersuchung transient exprimierter Transkripte jedoch aus verschiedenen Gründen schwierig. So war die Prozessierung der  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybride, im Gegensatz zu stabilen Transfektionen (Kap. 2.7.3, Abb. 35), nicht vollständig. Zudem war eine erhöhte Degradation dieser aberranten Transkripte zu beobachten, wodurch auch eine Bestimmung der absoluten Expression sowie der Halbwertszeit der Transkriptvarianten beeinträchtigt war. Außerdem führt die hohe Anzahl der bei transienter Transfektion im Nukleoplasma befindlichen Kopien zu einer veränderten Stöchiometrie zwischen Template und *trans*-wirksamen Faktoren, während bei stabiler Transfektion nur wenige Kopien der Fremd-DNA in das Chromatin integriert sind. Auch hier können Insertionsort und Kopienanzahl Einfluss auf Höhe der Expression und Abbauraten der resultierenden mRNA nehmen, weshalb die Untersuchung von Mischklonen zur Herabsetzung der klonalen Unterschiede ratsam erscheint (Nanbu und Nagamine, 1997, s. auch Kap. 3.2.3.1). Ein weiteres Problem besteht in der Verwendung der Cervixcarcinomzelllinie HeLa, die keine leberspezifischen Faktoren exprimiert. Abb. 27 zeigt die leberzellspezifische Induktion des Prothrombinpromotors in der Leberzelllinie HepG2, während in HeLa-Zellen keine Transkriptionsaktivierung aufgrund fehlender *trans*-wirksamer Faktoren erfolgt (Abb. 28). Wie zuvor erwähnt, ist zudem die Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA vom Differenzierungsstatus der Zellen abhängig (S. 73).

Carter et al. (2002) favorisieren dagegen einen bifunktionalen Mechanismus. Sie konnten durch den 20210A-Polymorphismus eine Verlängerung der Halbwertszeit von  $\beta$ -Globin-

Hybriden nachweisen. Die Polyadenylierung erfolgte, übereinstimmend mit den zuvor beschriebenen Befunden, an der SV40-Poly A-Stelle des Vektors. Die Autoren argumentieren, dass durch die identischen Schnittstellen der Einfluss der Mutation auf die Prozessierung minimiert würde und der Effekt der Mutation auf die Stabilität der mRNA unabhängig von etwaigen Einflüssen auf die Prozessierung untersucht werden könne. Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen  $\beta$ -Globin-Hybriden ist dies jedoch auch der Fall. Bei Wildtyp- und 20210A-mRNA erfolgte die Polyadenylierung an der stromabwärts gelegenen Poly A-Stelle des Vektors (Abb. 18). Dennoch konnten keine Unterschiede in der Stabilität beider Hybrid-mRNAs festgestellt werden (Abb. 17).

Sowohl bei der Studie von Gehring et al. (2001) als auch von Carter et al. (2002) ist es aufgrund der gewählten Ausschnitte der Northern Blot Analysen nicht möglich, eventuell höher laufende, nicht korrekt prozessierte Transkripte zu erkennen. Allerdings blieb auch bei beiden Untersuchungen die Poly A-Region des Vektors erhalten, was, wie in Kap. 2.3.5 gezeigt, zu einer präferentiellen Prozessierung an der  $\beta$ -Globin- bzw. SV40-Polyadenylierungsstelle führte.

Der Vergleich der Halbwertszeit zwischen Wildtyp- und 20210A-Prothrombin-mRNA wurde mittels  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten mit und ohne 3'-Vektorregion, unter Verwendung der 143 bp 3'-flankierenden sowie der 1494 bp 3'-flankierenden Sequenz in HepG2-Zellen mit und ohne endogene Prothrombinexpression durchgeführt. Zusätzlich wurde die Prothrombin-cDNA mit 143 bp 3'-flankierender Sequenz stabil in HepG2- und COS-1-Zellen exprimiert und die Stabilität der Wildtyp- und 20210A-mRNA verglichen. Bei keinem der untersuchten Expressionssysteme ließ sich ein Anhaltspunkt für eine durch die Mutation erhöhte mRNA-Halbwertszeit finden. Auch deutet die sehr hohe Halbwertszeit der endogenen Prothrombin-mRNA nicht auf eine strikte Regulation der Genexpression über die mRNA-Stabilität hin (vergl. Kap. 3.2.2). Vielmehr zeigten Northern Blot Analysen verschiedener 3'-Prothrombin-Konstrukte eine scheinbar erhöhte Polyadenylierungseffizienz bei der 20210A-Transkriptvariante (Abb. 21 und Abb. 36). Das Verhältnis lag bei der Wildtyp-mRNA deutlich auf Seiten der Prä-mRNA, während die Mutante einen höheren Anteil an 3'-prozessierter mRNA aufwies.

### **3.2.3.1 Vergleich der transienten und stabilen Expression von $\beta$ -Globinkonstrukten**

Zur Untersuchung der Stabilität und Abbaurate einer spezifischen mRNA dienen in der Regel Vektorsysteme, die transient oder stabil in Zelllinien exprimiert werden. Transient

transfizierte Plasmide verbleiben dabei meist im Nukleoplasma. Dabei kann der Ort der Transkription im kompartimentierten und komplexen Zellkern (Capco et al., 1982; Jackson, 1991; Stein et al., 1994) entscheidend für die Expression des modifizierten Gens sein, wie auch die damit verbundene Verfügbarkeit und Menge von *trans*-wirksamen Faktoren einen Einfluss auf die Stabilität der entsprechenden mRNA ausüben können.

Bei stabiler Expression erfolgt dagegen eine Integration der Vektor-DNA in das Chromatin.

Ein Vergleich zwischen transient und stabil transfizierten  $\beta$ -Globin-Konstrukten zeigte einen deutlichen Unterschied in der Prozessierung der Prä-mRNA (Kap. 2.7.2 und 2.7.3). Bei transient transfizierten Zellen waren mehrere  $\beta$ -Globin-Transkripte im Northern Blot sowie eine starke Degradation der überexprimierten mRNA nachweisbar (Abb. 33), was auf eine unvollständige Prozessierung hindeutet. Gleiches galt auch für die Luciferase-mRNA des cotransfizierten Plasmids. Dies könnte durch die hohe Kopienanzahl an ektopischer DNA, die mit dieser Transfektionsmethode einhergeht, und einer Limitierung der für die Polyadenylierung verantwortlichen Faktoren in der Zelle erklärt werden. Aufgrund der degradierten und nicht korrekt prozessierten mRNA war eine quantitative Auswertung und Halbwertszeitbestimmung nicht möglich. Bei stabiler Transfektion der gleichen  $\beta$ -Globin-Konstrukte dagegen war keine mRNA-Degradation in der Northern Blot Analyse ersichtlich (Abb. 35). Zudem verlief die Prozessierung der  $\beta$ -Globin-mRNA korrekt.

Ein weiterer wichtiger Unterschied der beiden Methoden liegt in der Menge der exprimierenden DNA. Während bei stabiler Transfektion mit nachfolgender Selektion die meisten Zellen einige Kopien des Plasmids tragen, enthalten bei transients Transfektion nur wenige Zellen eine große Anzahl der klonierten DNA (Alwine, 1985; Nanbu et al., 1994). Auch hier kann eine veränderte Stöchiometrie zwischen Protein und Transkript den mRNA-Metabolismus beeinflussen. So war bei einem Vergleich zwischen transients und stabiler Transfektion von  $\beta$ -Globin- und  $\beta$ -Globin-uPA-Konstrukten in LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen keine veränderte Prozessierung zu beobachten, sondern eine veränderte Halbwertszeit der mRNA-Hybride bei transients Transfektionsexperimenten (Nanbu und Nagamine, 1997). Für die hohe Zahl an Transkripten liegen *trans*-wirksame Faktoren, sowie subnukleäre Strukturen, an denen mRNA reguliert und prozessiert wird, in zu geringer Menge vor und wirken so limitierend. Erst transients Transfektion von sehr geringen Konzentrationen an Vektor-DNA führten zu mRNA-Halbwertszeiten, die mit denen aus stabil transfizierten Zellen vergleichbar waren (Nanbu und Nagamine, 1997). Eine Quantifizierung der Transkripte ist bei transients

Transfektion zudem sehr problematisch. Zur Normierung der Transfektionsrate muss eine Cotransfektion durchgeführt werden.

Somit sind die Daten von Gehring et al. (2001) bzgl. der 1,8-fach gegenüber der Wildtyp-mRNA erhöhten 20210A-mRNA-Menge mit Vorsicht zu deuten. Die Messung erfolgte nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit  $\beta$ -Globin-Hybrid-Konstrukten. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein zweites Plasmid cotransfiziert. Die Untersuchungen der Regulation eines leberzellspezifisch exprimierten Gens wurden in einer Cervixcarcinomzelllinie (HeLa) durchgeführt. Auch hier könnten Unterschiede in der Verfügbarkeit von *trans*-wirksamen Faktoren bestehen, die an Polyadenylierung oder Abbaugeschwindigkeit der mRNA beteiligt sind, da es sich nicht um Leberzellen handelt. Wie hier gezeigt, ist gerade der Differenzierungsstatus der Zelle sehr entscheidend für die Stabilität und Halbwertszeit der mRNA (Kap. 2.3.4 und 2.7.3)

### ***3.2.4 Rekombinante Expression der 20210G/A Prothrombin-cDNA***

Die Überexpression beider Varianten der Prothrombin-cDNA erfolgte in stabil transfizierten selektionierten HepG2-Zellen ohne endogene Prothrombinexpression und in COS-1-Zellen (Kap. 2.4). Die Behandlung der stabil transfizierten Mischpopulation mit DRB zur Inhibition der Transkription und die anschließende Quantifizierung im Northern Blot zeigten sowohl in HepG2- als auch in COS-1-Zellen keine Degradation der Prothrombin-mRNA über den untersuchten Zeitraum von 24 h (Kap. 2.4.2). Damit gleicht die Stabilität der rekombinanten Prothrombin-mRNA derjenigen der endogenen Prothrombin-mRNA, die ebenfalls eine sehr hohe Halbwertszeit aufwies (Kap. 2.2.3; primäre Rattenleberzellen:  $49,1 \pm 11,1$  h und HepG2-Zellen:  $53,9 \pm 14,6$  h).

Die Analyse im Northern Blot zeigte in beiden Zelllinien zwei Transkripte, wobei das kürzere die gleiche Größe wie die endogene Prothrombin-mRNA aus HepG2-Zellen aufwies (Abb. 20) und somit vermutlich die korrekt an der Polyadenylierungsstelle 20210 prozessierte mRNA darstellt. Die Quantifizierung der Transkripte ergab bei beiden Zelllinien eine Verschiebung der mRNA-Menge zugunsten des kleineren Transkripts bei der 20210A-Variante und damit einen Hinweis auf eine Erhöhung der Polyadenylierungseffizienz durch den Austausch des Nukleotids G→A an Position 20210 (Abb. 21). Möglicherweise führt das Dinukleotid CA (Mutante) zu einer verbesserten Erkennung der Schnittstelle durch die Faktoren der Polyadenylierungsmaschinerie als das Dinukleotid CG (Wildtyp). Bekannt ist, dass die Basenfolge CA *in vitro* zu einer effizienteren Polyadenylierung als das Sequenzmotiv

CG führt (Chen et al., 1995). Eine korrekte Analyse der Halbwertszeit der rekombinanten mRNA beider Varianten war aufgrund der unterschiedlichen Mengen an korrekt prozessierter mRNA und der hohen Stabilität beider Varianten nicht möglich.

Die densitometrische Quantifizierung der rekombinant gebildeten Proteinmengen im Western Blot (Kap. 2.4.3, Abb. 24) zeigte eine 4-fach erhöhte Menge an rekombinantem Prothrombin bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die erhöhte Menge an korrekt prozessierter 20210A-mRNA zu einer Erhöhung der Prothrombinexpression führt. Man sollte jedoch noch weitere Studien und quantitative Untersuchungen zur gebildeten Proteinmenge durchführen, um dieses Ergebnis aus relativ wenigen Transfektionsexperimenten statistisch abzusichern.

Dieser Mechanismus wird ebenfalls von Gehring et al. (2001) diskutiert, die mittels Primer Extensions-Analysen eine 1,5-fache Erhöhung der 20210A-mRNA auf posttranskriptioneller Ebene messen konnten. Ribonuklease-Schutzexperimente zeigten zudem erhöhte Mengen an korrekt polyadenylierter mRNA bei der Mutation. Die Autoren zogen daraus die Schlussfolgerung, dass die G20210A-Mutation zu einer erhöhten Polyadenylierungsrate und damit zu einem Anstieg der Proteinexpression führt.

Korrelierend mit den hier beschriebenen Befunden zeigten Carter et al. (2002), dass sowohl rekombinante Prothrombin mRNA- als auch sekretierte Proteinmenge in stabil mit der 20210A-Variation der Prothrombin-cDNA transfizierten NIH3T3-Zellen gegenüber der 20210G-Wildtyp-cDNA erhöht war. Die Expression der Prothrombin-cDNA erfolgte dabei über einen Säugerepressionsvektor mit CMV-Promotor und SV40-Polyadenylierungsstelle, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Poly A 3'-Region des Expressionsvektors deletiert wurde (Kap. 2.4.1). Weitere Unterschiede bestanden in der Länge der inserierten Prothrombin 3'-Region. Während Carter et al. die 97 Nukleotide umfassende 3'-UTR vor die SV40-Poly A-Region des Vektors inserierten, wurde hier zusätzlich die 144 bp 3'-flankierende Region verwendet (Abb. 19). Wie in Kap. 2.3.5, Abb. 18, gezeigt, erfolgte die Polyadenylierung bei  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybriden ausschließlich an der stromabwärts gelegenen Poly A-Stelle des  $\beta$ -Globingens. Das schwächere Poly A-Signal der Prothrombin 3'-Region wurde überlesen. Durch das Ersetzen der bevorzugten SV40-Poly A-Region des Expressionsplasmids durch 3'-flankierende Sequenzen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Vektorsystems auf die Polyadenylierung der rekombinanten mRNA minimiert. Die Autoren führen die Konzentrationsunterschiede zwischen 20210A- und 20210G-mRNA auf eine durch die Mutation verlängerte Halbwertszeit der Prothrombin- bzw. Reporter-

mRNA zurück. Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit mit  $\beta$ -Globin-Reporterkonstrukten nicht bestätigt werden (Abb. 17). Auch rekombinante Prothrombintranskriptvarianten lieferten keinen Hinweis auf eine durch die Mutation bedingte Erhöhung der mRNA-Halbwertszeit (Kap. 2.4.2). Damit widersprechen die vorliegenden Daten deutlich den Befunden von Carter et al. Vielmehr scheint eine durch die 20210A-Mutation verbesserte Prozessierung der mRNA vorzuliegen. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Vergleich der Transkripte im Northern Blot (Abb. 21) und die Quantifizierung der Western Blot Analysen (Abb. 22; vergl. hierzu Kap. 3.2.5).

### ***3.2.5 Prozessierung der mRNA am 3'-Ende***

Die Poly A-Enden eukaryotischer mRNAs sind essentielle strukturelle und funktionelle Elemente (Zarudnaya, 2003). Sie sind an der Regulation der mRNA-Stabilität (Wang et al., 1999; Decker und Parker, 1993), dem mRNA-Export aus dem Kern in das Cytoplasma (Chen et al., 1999) und an der Initiation der Translation (Craig et al., 1998) beteiligt. Alternative Polyadenylierungsstellen können außerdem zur Regulation der Genexpression beitragen (Edwards-Gilbert et al., 1997).

Die Prozessierung am 3'-Ende einer tierischen Prä-mRNA erfolgt im Allgemeinen an einer optimalen Sequenz zwischen dem Polyadenylierungssignal AAUAAA und einem U/GU-reichen, 20 bis 40 Basenpaare stromabwärts der Polyadenylierungsstelle gelegenen Sequenzmotiv (Chou et al., 1994). Das Poly A-Signal liegt 10 bis 30 Basenpaare stromaufwärts von der Polyadenylierungsstelle und ist in 90 % aller mRNA-Spezies konserviert (Colgan und Manley, 1997). Eine Studie von Zarudnaya et al. (2003) untersuchte 244 zufällig ausgewählte humane DNA-Sequenzen, von denen nur 69 % der Prä-mRNAs das AAUAAA-Hexamer enthielten. Die Prothrombin-mRNA enthält das Poly A-Signal AAUAAA, aber kein eindeutiges U- oder GU-reiches Element in der 3'-flankierenden Region (Abb. 39). Die Polyadenylierungsstelle, die von der Mutation betroffen ist, liegt 14 bp stromabwärts des Poly A-Signals.

**A** Maus  $\beta^{\text{maj}}$ -Globin

+1                    +10                    +20  
 |                    |                    |  
 AUGAUGUUUUAAUUUUUUUGUCUGUGU

**B** SV40 *Late*

+1                    +10                    +20                    +30                    +40  
 |                    |                    |                    |                    |  
 ACAAUUGCAUUCAUUUUUAUGUUUCAGGUUCAGGGGGAGGUGUGGGAGG

**C** SV40 *Early*

+1                    +10  
 |                    |  
 UUCUAGUUUGUGGUUUGUC

**D** HSV-1 *tk*

+1                    +10                    +20                    +30  
 |                    |                    |                    |  
 AAUAAAACCCACGGGUGUUUGGUUCGUUUGUU

**E** Maus IgM *heavy chain (secretory site)*

+1                    +10                    +20                    +30                    +40                    +50                    +60                    +70  
 |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |  
 ACUGUUUUUGAUUAUACAAUGCUCAUGCCUGCUGAGACAGUUUGUUUUUGCUUGCUCUGCACACACCCUG

**F** Humane *cerebroside sulfotransferase*

+1                    +10                    +20                    +30                    +40                    +50  
 |                    |                    |                    |                    |                    |  
 AAUCAGCCUCAGUGGUGGUGACUUGGGUGGGGUUGGGUGGGGGGAACCC

**G** Humane Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

+1                    +10                    +20                    +30                    +40                    +50  
 |                    |                    |                    |                    |                    |  
 AGUUACUUGUCCUGUCUUAUUCUAGGGUCUGGGGCAGAGGGGAGGGAAAGCUG

**H** Humanes Prothrombin

+1                    +10                    +20                    +30                    +40                    +50                    +60                    +70  
 |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |  
 AGCCUCAUUGCUCCCAGUGCUAUUCAUGGGCAGCUCUCUGGGCUCAGGAAGAGCCAGUAAUACUACUGGA

**Abb. 39: Poly A-Signale in 3'-flankierenden Bereichen** (verändert nach Zarudnaya et al., 2003). Die Positionsangabe +1 bezieht sich auf das 1. Nukleotid der 3'-flankierenden Region. U- und GU-reiche Elemente sind unterstrichen, G-reiche Sequenzen sind doppelt unterstrichen.

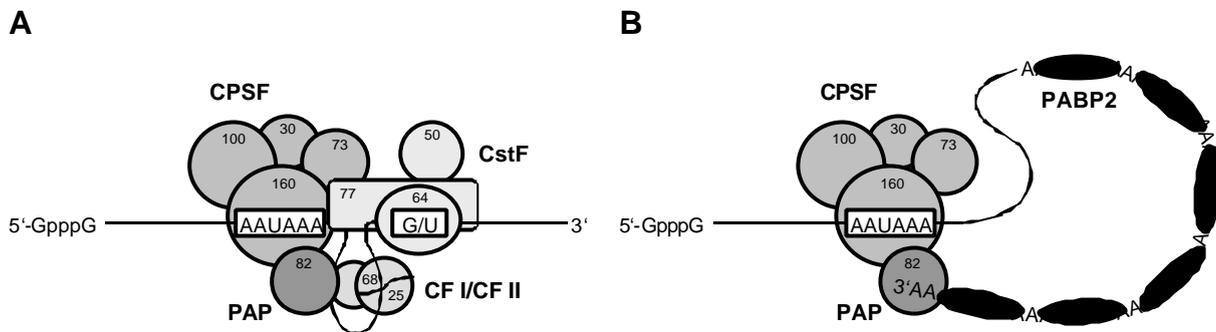
Die Nukleotidfolge des Poly A-Signals und die Anzahl der Uridine ist entscheidend für die Effizienz der Prozessierung (Chou et al., 1994; Colgan und Manley, 1997). Die Polyadenylierungsstelle ist nicht streng konserviert (Zhao et al., 1999), es ist aber bekannt, dass das Dinukleotid CA, wie es im Falle der Mutation vorliegt, *in vitro* zu einer höheren Prozessierungsrate beiträgt, während CG (Polyadenylierungsstelle bei Wildtyp-Prothrombin) weniger effizient ist (Chen et al., 1995). Ein verlängertes Poly A-Ende kann zu einer erhöhten Stabilität der entsprechenden mRNA beitragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass keine Anheftung des Poly A-Endes an der Polyadenylierungsstelle der 3'-UTR des Prothrombingens bei  $\beta$ -Globinreporterkonstrukten erfolgte (Kap. 2.3.5), sondern dass bei beiden Transkriptvarianten die Polyadenylierung an der stromabwärts gelegenen  $\beta$ -Globin-Poly A-Stelle des Expressionsvektors erfolgte (Abb. 18). Eine nur partielle Polyadenylierung konnte bei rekombinanter Expression der Prothrombin-cDNA mit 3'-UTR und flankierender Region in einem Expressionsvektor, bei dem die SV40-Poly A-Region deletiert war, sowohl in HepG2-Zellen als auch in COS-1-Zellen (Kap. 2.4.2) nachgewiesen werden. Der Anteil an korrekt prozessierter Prothrombin-mRNA bei der 20210A-Transkriptvariante schien in beiden Zelllinien höher zu liegen (Abb. 21). Die Ergebnisse wurden bestätigt durch Transfektion von  $\beta$ -Globinkonstrukten mit einer erweiterten 3'-flankierenden Prothrombinregion (Abb. 35). Nach Quantifizierung der Transkriptmengen im Northern Blot zeigte sich bei der Mutante eine Zunahme an korrekt prozessierter mRNA bei gleichzeitiger Abnahme der Prä-mRNA (Abb. 36). Ein erhöhter Anteil an polyadenylierter mRNA könnte ebenfalls zu einer vermehrten Translation der Transkripte führen. Die Quantifizierung des rekombinanten Wildtyp- und 20210A-Prothrombins im Western Blot bestätigte diese Vermutung. In stabil transfizierten COS-1-Zellen stieg die Proteinexpression bei der Mutante um den Faktor 4 (Abb. 24).

Die unvollständige Polyadenylierung der rekombinanten Prothrombin-mRNA deutet auf ein schwaches *cis*-regulatorisches Element in der 3'-flankierenden Region hin. Da das Poly A-Signal des Prothrombingens der Konsensussequenz entspricht, könnte das Fehlen eines U/GU-reichen Elementes stromabwärts der Poly A-Stelle für die ineffiziente Prozessierung verantwortlich sein. Die Polyadenylierung der Säuger Prä-mRNA erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird die Prä-mRNA an der Poly A-Stelle endonukleolytisch gespalten. Anschließend erfolgt die Anheftung des Poly A-Endes (Colgan und Manley, 1997; Wahle und Rügsegger, 1999; Zhao et al., 1999). Für die Spaltung der Prä-mRNA ist die Bildung eines Komplexes aus den Faktoren *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF), *cleavage stimulation factor* (CstF), *cleavage factors I und II* (CF I und CF II) und *poly(A) polymerase* (PAP) notwendig. Dabei bindet CPSF an das AAUAAA-Hexamer, während CstF mit dem stromabwärts der Poly A-Stelle gelegenen U/GU-reichen Element interagiert (Abb. 40A). Für die Polyadenylierung sind ebenfalls die Faktoren CPSF und PAP sowie ein drittes Protein, *poly(A) binding protein 2* (PABP2), erforderlich (Abb. 40B).

Inkorrekt prozessierte, d. h. 3'-verlängerte Transkripte, können einer Degradation durch den cytoplasmatischen *Surveillance* Mechanismus der Zelle unterliegen (Muhlrad und Parker,

1999) oder als Substrate für das Exosom dienen, das im Kern zum Abbau abnormaler mRNA führt (van Hoof und Parker, 1999; Burkard und Butler, 2000).



**Abb. 40: Modell des Spaltungskomplexes (A) und des Polyadenylierungskomplexes (B) der Prä-mRNA** (nach Wahle und Rügsegger, 1999). (A) CPSF bindet an das AAUAAA-Sequenzmotiv. CstF interagiert mit dem U/GU-reichen Element. Die exakten Positionen von CF I, CF II und PAP (82 kDa) sind nicht bekannt. (B) Der Faktor CPSF bleibt während der Polyadenylierung an das AAUAAA-Hexamere gebunden. PABP2 bindet an das Poly A-Ende und stimuliert die Poly A-Polymerase (PAP). GpppG: 5'-Kappe, CPSF: *cleavage and polyadenylation specificity factor* (vier Untereinheiten: 160, 100, 73 und 30 kDa), CstF: *cleavage stimulation factor* (drei Untereinheiten: 77, 64 und 50 kDa), CF I: *cleavage factor I* (68 und 25 kDa funktionelle Untereinheiten), CF II: *cleavage factor II*, PAP: *poly(A) polymerase* (82 kDa), PABP2: *poly(A) binding protein 2* (33 kDa).

Eine erhöhte Prozessierungseffizienz der G20210A-Mutation wurde auch von Gehring et al., 2001, beschrieben. Ribonuklease-Schutzexperimente ergaben in Abhängigkeit der verwendeten Konstrukte unterschiedliche Mengen an korrekt prozessierter mRNA. Die Mutation führte dabei in allen Fällen der transient transfizierten HeLa-Zellen zu einer verbesserten Polyadenylierung und damit zu einer erhöhten Menge an mRNA und Protein.

### 3.2.6 Einfluss der 3'-flankierenden Prothrombinregion

Zur Untersuchung des Einflusses der 3'-Prothrombinregion und der 20210A-Mutation auf die Expression eines Luciferasereportergens wurden unterschiedlich lange 3'-Bereiche des Prothrombingens in das Vektorsystem inseriert und transient in HepG2 exprimiert (Kap. 2.6.2). Das Luciferasegen stand dabei unter der Kontrolle des Prothrombinpromotors. Bei Insertion einer 241 bp 3'-UTR und flankierenden Region vor das SV40-Poly A-Ende des Vektors lag die Luciferaseaktivität im Bereich des Konstrukts ohne 3'-Prothrombinregion (Abb. 29). Zwischen Wildtyp und 20210A 3'-Region war kein signifikanter Unterschied zu

verzeichnen. Der Austausch der 3'-Region des Vektors durch die Prothrombin 3'-Region führte jedoch zur Reduktion der Luciferaseaktivität auf 2,5 % (Wildtyp) und 2,6 % (Mutante). Wie in Kap. 2.3.5 gezeigt, führte die 143 bp 3'-flankierende Region nicht zur korrekten Polyadenylierung an der Poly A-Stelle des Prothrombingens. Die Polyadenylierung erfolgte ausschließlich an der Poly A-Stelle des Vektors (Abb. 18). Nach Deletion des 3'-Vektorbereichs wurde dagegen die Prä-mRNA ungenügend prozessiert. Mehrere Banden im Northern Blot wiesen auf aberrante Transkripte hin. Nur ein Teil der Prä-mRNA war korrekt polyadenyliert (Abb. 35). Weiterhin erfolgte nach Deletion der SV40-Poly A-Region nur eine unvollständige Polyadenylierung rekombinanter Prothrombintranskripte in HepG2- und COS-1-Zellen. Der auffällige Abfall der Luciferaseaktivität nach Deletion der Poly A-Sequenz deutet auf eine fehlende bzw. ungenügende Polyadenylierung der entstehenden Transkripte hin. Dies bestätigen auch die Befunde von Gehring et al. (2001), die mittels Ribonuklease-Schutzexperimenten eine Erhöhung der korrekt polyadenylierten Prothrombin-mRNA durch den G→A-Austausch an Position 20210 zeigen konnten.

Die Insertion einer erweiterten 1,6 kb 3' Prothrombinregion (Abb. 26) führt dagegen zu einer 2,2-fachen Erhöhung der Luciferaseaktivität beim Wildtyp und einer 3,9-fachen Erhöhung bei der Mutante im Vergleich zur 241 bp 3'-Region (Abb. 31). Die 20210A-Transkriptvariante führt gegenüber dem Wildtyp zu einer signifikant erhöhten Aktivität (Faktor 1,8). Dieser Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante war nur mit zusätzlichen 3'-flankierenden Bereichen messbar. Bei Verwendung der bislang bekannten 144 bp 3'-flankierenden Sequenz ergab sich weder mit noch ohne Poly A-Region des Vektors eine erhöhte Luciferaseaktivität durch die Mutation.

Zusammen mit den Ergebnissen der Northern Blot Analyse aus Kap. 2.7.3, Abb. 35, die eine Abnahme aberranter  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Transkripte durch Verlängerung der 3'-flankierenden Prothrombinregion und eine Verschiebung der Prä-mRNA zugunsten polyadenylierter mRNA zeigen, sprechen diese Daten für eine *cis*-wirksame Regulation der Polyadenylierung durch 3'-flankierende Bereiche. Diese müssen im Bereich 20355 bis 21704 lokalisiert sein, da die 3'-flankierende Region 20211 bis 20354 nicht zu einer effektiven Polyadenylierung führt. Zudem ist nur mit der verlängerten 3'-Sequenz eine Erhöhung der Luciferaseaktivität durch den 20210A-Polymorphismus festzustellen (Abb. 31).

### 3.3 Mögliche regulatorische Bereiche in der 3'-Prothrombinregion

Durch REMSA-Analysen mit HepG2-Zellextrakten konnte gezeigt werden, dass die 97 Nukleotide umfassende 3'-untranslatierte Prothrombinregion mindestens drei Protein-RNA-Bindungsstellen aufweist (Carter et al., 2002). Dabei war kein Unterschied in Migration oder Bindungsaffinität zwischen den beiden Prothrombinvarianten festzustellen, was die Autoren auf die geringe Sensitivität des Verfahrens zurückführen. Als eindeutigen Bindungspartner konnte HuR, ein ubiquitär exprimiertes Protein aus der Hu-Familie von RNA-Bindeproteinen (Ma et al., 1996) und eng verwandt mit ELAV (*embryonic lethal abnormal visual*) und SXL (*sex lethal*) Proteinen aus *Drosophila* (Good, 1995; Mitchell und Tollervey, 2000), mittels REMSA *Supershift* Experimenten identifiziert werden. Auch hier war kein Unterschied in den Bindungseigenschaften zwischen Wildtyp und Mutante zu detektieren. Durch AUF-1 erfolgte keine Bindung an die 3'-UTR des Prothrombingens (Carter et al., 2002).

HuR gehört wie AUF-1 zu den ARE-Bindeproteinen. AREs (*AU-rich elements*) sind in der 3'-untranslatierten Region von Genen mit kurzer Halbwertszeit lokalisiert und erhöhen Deadenylierungsrate und Degradation der betroffenen mRNA (Ford et al., 1999; Peng et al., 1998). Die Größe variiert zwischen 50 und 150 Nukleotiden mit einer oder mehreren Kopien des AUUUA-Pentamers oder UUAUUUA(U/A)(U/A)-Nonamers. Bisher wurde eine Einteilung dieser Sequenzmotive in drei Klassen vorgenommen, basierend auf Vorkommen und Häufigkeit des AUUUA-Motivs (Peng et al., 1996). AREs ohne AUUUA-Sequenzmotiv werden als non-AUUUA bezeichnet und kommen z. B. bei *c-jun* vor. AREs mit AUUUA-Motiv werden in zwei Klassen eingeteilt, Klasse I (z. B. *c-fos*) und Klasse II (z. B. *granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor*) und unterscheiden sich durch ihre Regulationsmechanismen und Deadenylierungsmuster (Chen und Shyu, 1995). Durch Bindung von *trans*-wirksamen Faktoren an das *cis*-Element wird die Degradation der betreffenden mRNA eingeleitet oder ihre Stabilität modifiziert. Zu den spezifisch an ARE-Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region von mRNAs bindenden Proteinen gehören AUF-1, vier Proteine aus der ELAV-Familie (HuR, HuB, HuC, HuD), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), hnRNPA1, hnRNPC und AUH (Gouble und Morello, 2000; Grzybowska et al., 2001). Dabei sind die Funktionen von AUF-1 und HuR gegensätzlich. Während durch die Bindung von AUF-1 an das Motiv eine schnelle Degradation der mRNA eingeleitet wird, hat die Bindung von HuR stabilisierende Funktion.

So können durch *in vitro* Überexpression von HuR oder anderen Proteinen aus der ELAV-Familie deadenylierte, das ARE-Motiv tragende Transkripte der Degradationsmaschinerie entzogen werden (Ford et al., 1999). Äußere Faktoren, die zur Stabilisierung einer mRNA über das ARE-Sequenzmotiv beitragen, sind Stress, Zellstimulation oder onkogene Transformation (Gallouzi et al., 2000).

Die hohen Halbwertszeiten von endogener Prothrombin-mRNA (Kap. 2.2.3) sowie rekombinanter Prothrombin-mRNA (2.4.2) von über 50 h sprechen nicht für das Vorhandensein von Destabilisierungselementen. Die Bindung von HuR an die 3'-Prothrombinregion (Carter et al., 2002) deutet jedoch auf die Präsenz eines Klasse II ARE-Sequenzelementes hin. AREs sind aber *per se* Destabilisierungselemente, auch wenn HuR eine stabilisierende Wirkung vermittelt. Die exakte Sequenz *cis*-regulatorischer Elemente und ihre Funktion konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden. Die Identifizierung dieser Elemente und weiterer Sequenzbereiche in der 3'-flankierenden Prothrombinregion sollte in Hinblick auf die Regulation der mRNA-Stabilität und der Prozessierung Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### 3.4 Abschließende Diskussion

Die G20210A-Mutation an der Polyadenylierungsstelle des Prothrombingens führte in  $\beta$ -Globinexpressionsstudien und bei rekombinanter Expression in verschiedenen Zelllinien nicht zu einer veränderten Halbwertszeit im Vergleich zur Wildtyp-mRNA.

Sowohl bei  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybrid-mRNA als auch bei rekombinanter Prothrombin-mRNA stand die Mutation jedoch kausal in Zusammenhang mit einem erhöhten Anteil an korrekt polyadenylierter mRNA. Gleichzeitig nahm die Menge an aberranten Transkripten oder Prä-mRNA ab. Die verbesserte Prozessierung durch die Mutation resultierte bei rekombinanter Überexpression in einer 4-fach erhöhten Proteinmenge. Die G20210A-Mutation führte zudem nach Klonierung der verlängerten 3'-Prothrombinregion in ein Luciferasereporterplasmid zu einer gegenüber der Wildtypregion 1,8-fach erhöhten Luciferaseaktivität.

Die genannten Daten weisen auf erhöhte Polyadenylierungseffizienzen durch den Basenaustausch von G nach A an der Polyadenylierungsstelle von Prothrombin hin. Diese führte bei *in vitro* Expressionsstudien zu einer erhöhten Proteinbildung. Damit könnte die bei Mutationsträgern erhöhte Plasma-Prothrombinkonzentration aus einer verbesserten

---

Polyadenylierung, einem damit verbundenen Anstieg der mRNA-Menge und einer vermehrten Translation des Proteins resultieren. Bisher sind die beteiligten *cis*-regulatorischen Sequenzelemente und *trans*-wirksamen Faktoren nicht bekannt. Die Identifizierung der Sequenzbereiche könnte durch Homologievergleiche und DNA-Proteinbindungsstudien erfolgen. Auch die Ausbildung von Sekundärstrukturen durch stromabwärts der Polyadenylierungsstelle gelegene Sequenzelemente kann zu einer effizienten Polyadenylierung beitragen (Phillips et al., 1999). Interessant sind die Untersuchungen von Arhin et al. (2002), die bei ca. 34 % der Säuger-mRNAs kurze G-reiche Sequenzen in der 3'-flankierenden Region gefunden haben. Die Bindung von hnRNP H/H'-Proteinen an diese Elemente bewirkt eine Stimulation der 3'-Prozessierung. Die G-reichen Sequenzen in der Prä-mRNA sind zudem in der Lage, viersträngige G-Quadruplexe zu bilden (Patel et al., 1999). Für diese wird ebenfalls eine Beteiligung an der Polyadenylierung diskutiert (Zarudnaya et al., 2003).

## 4 Material

### 4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Gerät/Material</b>	<b>Firma</b>
β-Counter Rackbeta 1217	LKB, Bromma, Schweden
Brutschrank	Memmert, Schwalbach
CASY 1 Cell Counter	Schärfe System, Reutlingen
Corex-Zentrifugenröhrchen	Corning Glass Works, Corning (USA)
Einfrierröhrchen	Greiner GmbH, Frickenhausen; Nunc, Roskilde (Dänemark)
Elektrophoresekammern DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell	GIBCO BRL, Gaithersburg (USA)
Elektrophoreseapparatur (Proteine): Protean II- Minigelapparaturen, inkl. Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationseinheit (Genepulser und Pulse Controller)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsküvetten	BTX, San Diego (USA)
ELISA-Reader und Software Easyfit	SLT-Labinstruments, Crailsheim
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2ml)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson & Company, Lincoln Park (USA)
Feinwaagen Mettler PC 440, PE 2000	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Filme X-OMAT AR	Eastman Kodak Co., Rochester (USA)
Filmkassetten	BioTech Trade & Service GmbH, St. Leon-Rot
Filterpapier	Whatman International Ltd, Maidstone (England)
Glaswaren	Schott, Mainz
Hamilton-Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (Schweiz)
Hand-UV-Lampe	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifuge Z 320 K	Hermle GmbH & Co., Gosheim
Luminometer Autolumat LB 953	Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Lyophilisator: Speed Vac Concentrator SVC 100 H und Refrigerated Condensation Trap RT 100-A	Savant, Farmingdale (USA)
Magnetrührer MR2002	Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim

<b>Gerät/Material</b>	<b>Firma</b>
Mikroskop Axiovert 25	CarlZeiss, Jena
Mikrotiterplatten Maxisorp	Nunc, Roskilde (Dänemark)
MM301 Mixer Mill	Retsch GmbH & Co. KG, Haan
Nitrocellulose Transfermembran BA 85	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Hybond N+	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)
PCR-Gerät: Perkin-Elmer/Cetus und Primus 96 DNA Thermal Cyclers	Perkin Elmer, Norwalk (USA) MWG-Biotech AG, Ebersberg
PhosphorImager SF	Molecular Dynamics, Sunnyvale (USA)
Photometer Uvikon 710	Kontron, Rotkreuz (Schweiz)
Quarzküvetten	Hellma GmbH, Mühlheim
Rollinkubator	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific, Edison (USA); Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Sequenzierautomat LI-COR 4200	LI-COR Inc., Lincoln (USA)
Signalverstärkerfolien Cronex Lightning Plus	DuPont, Boston (USA)
Spannungsgeber ST 504, Model 1000/500	GIBCO BRL, Gaithersburg (USA); Bio- Rad Laboratories GmbH, Richmond (USA)
Sterilbänke Gelaire BSB 4, Twin 30	Gelaire Flow Laboratories, Opera (Italien)
Sterilfilter	Nalge Company, Rochester (USA)
Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Sunnyvale (USA)
Tischzentrifuge 5415C, Hettich Mikroliter	Eppendorf Gerätebau, Hamburg; Hettich, Tuttlingen
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disruptor	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultrazentrifuge L7-65 (Rotor 70.1 TI)	Beckman Instruments GmbH, München
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch Dual-Intensity Transilluminator	Herolab, Wiesloch
Videodokumentationsanlage CS-1	Cybertech, Berlin
Wasseranlagen Milli-RO 10 Plus, Milli-Q Plus	Millipore GmbH, Eschborn
Wasserbäder Haake S mit Aufsatz F3, Julabo 6A mit Aufsatz R5	Haake Mess-Technik GmbH u. Co., Karlsruhe; Juchheim Labortechnik KG, Seelbach
Zellkulturschalen	Nalge Company, Rochester (USA)
Zellkulturschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Heraeus Sepatech Cryofuge 5000	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifugen J2-21 (JA-20-Rotor), TJ-6	Beckman Instruments GmbH, München

## 4.2 Chemikalien

Firma	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)	ECL-Detektionsreagenzien, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, RapidGel XL 40 %
Biochrom KG, Berlin	Wasser ultra-pure, steril und pyrogenfrei
Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Protein Assay Farbstoff-Konzentrat, TEMED
Biotest AG, Dreieich	Agar-Agar, Hefeextrakt
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	Lachssperma Carrier-DNA, FuGENE 6 Transfection Reagent
Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Ts.	G418
Difco Laboratories, Detroit (USA)	BiTek Agar, Gelatine, Yeast Nitrogen Base
Merck, Darmstadt	Ammoniumperoxodisulfat, Chloroform, Dikaliumhydrogenphosphat, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat Heptahydrat, Natriumacetat, Natronlauge (1 M), Salzsäure (1 M)
Eastman Kodak Co., Rochester (USA)	Entwicklerlösung Kodak RP X-OMAT, Fixierlösung Kodak RP X-OMAT LO
Eurogentec, Seraing (Belgien)	dATP/dCTP/dGTP/dTTP-Nukleotide, Elektroporationsküvetten 0,4 cm
Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)	$\beta$ -Mercaptoethanol, Chloramphenicol, 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Benzimidazol (DRB), Guanidinhydrochlorid, Magermilchpulver, Natriumdeoxycholat, Triethanolamin
Fresenius AG, Bad Homburg v. d. H.	NaCl-Lösung (0,9 %)
GIBCO BRL, Gaithersburg (USA)	Agarose, Casein Hydrolysat (Pepton), Collagenase, DMEM-Medium, Fungizon (Amphotericin B), Insulin-Zink-Komplex, L-Glutamin (200 mM), Lipofectin, M199-Medium, Natriumpyruvat, Opti-MEM I-Medium, Penicillin/ Streptomycin-Lösung, RPMI-Medium, Trypsin-EDTA-Lösung (10 x), Waymouth-Medium
Greiner GmbH, Frickenhausen	FCS (Fötales Kälberserum)
Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)	IPTG, Repel-Silane ES
Pierce, Rockford (USA)	BCA Protein Assay Reagenzien, SDS
Roth, Karlsruhe	$\alpha$ -D(+)-Glucose Monohydrat, Adenin, Ammonium-sulfat ROTIPURAN, Borat, BSA, D(+)-Galactose, Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Formamid, Glycerin ROTISOLV 86 %, Glycin, Harnstoff, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, L-Arginin, L-Glutaminsäure

<b>Firma</b>	<b>Produkte</b>
Roth, Karlsruhe	L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin Monohydrat, L-Methionin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Valin, Lithiumacetat, Magnesiumchlorid Hexahydrat, Methanol, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Phenol, Rotiphorese Gel 30 (30 % Acr., 0,8 % Bis.), Rotisol, Salzsäure 37 %, Trichloressigsäure
SIGMA Chemical Co., St. Louis (USA)	Actinomycin D, Ampicillin, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Coomassie Brilliant Blue R 250 D(+)-Glucose, Dexamethason, Dimethylsulfoxid, DTT, EDTA, EGTA, Ethidiumbromid, Ficoll 400, Glycerin, HEPES, Imidazol, Methylenblau, Mineralöl, MOPS, N-Lauroyl Sarcosin Natriumcitrat Dihydrat, Nonidet P-40, Polyethylenglycol 3350, Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20), Ponceau S-Lösung, Tireagenz, Tris, Triton X-100
Stratagene, La Jolla (USA)	QuikHyb-Hybridisierungslösung

### 4.3 Kits

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison (USA)
High Prime DNA Labeling Kit	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Mycoplasma PCR ELISA	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
NucTrap Probe	Stratagene, La Jolla (USA)
Original TA Cloning Kit	Invitrogen, San Diego (USA)
QIAamp Blood Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Endofree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)
TOP10F <sup>+</sup> One Shot <sup>TM</sup> Kit	Invitrogen, San Diego (USA)

## 4.4 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Firma</b>
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs Inc., Beverly (USA)
Complete <sup>TM</sup> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
DNase I	Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I Large Fragment)	New England Biolabs Inc., Beverly (USA)
MMLV reverse transcriptase	WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla (USA)
Proteinase K	Stratagene, La Jolla (USA)
Restriktionsendonukleasen	GIBCO BRL, Gaithersburg (USA); New England Biolabs Inc., Beverly (USA)
RNase A	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly (USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	SIGMA Chemical Co., St. Louis (USA)

## 4.5 Elektrophoresemarker

### Längenstandards für Agarosegelelektrophorese

100 bp DNA-Leiter	GIBCO BRL, Gaithersburg (USA)
1 kb DNA-Leiter	GIBCO BRL, Gaithersburg (USA)
$\lambda$ -DNA/ <i>Hind</i> III-Fragmente	GIBCO BRL, Gaithersburg (USA)

### Längenstandards für SDS-Gelelektrophorese

Prestained SDS-PAGE Standards Low Range (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München)

<b>Protein</b>	<b>kDa</b>
Phosphorylase B	103,0
Bovine serum albumin	77,0
Ovalbumin	48,0
Carbonic anhydrase	34,2
Soybean trypsin inhibitor	28,4
Lysozyme	20,5

## 4.6 Stammlösungen

Komponente	Konzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 0,3 M HCl	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	170 µg/ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml in TE-Puffer	0,1 µg/ml
Magermilch	100 mg/ml in PBS	100 mg/ml
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM bzw. 0,1 mM EDTA	

## 4.7 Oligonukleotide

Die Schmelztemperatur  $T_m$  der Oligonukleotide wurde nach der Formel  $T_m = 4 \text{ °C} \times (G + C) + 2 \text{ °C} \times (A + T)$  berechnet (Nelson und Brutlag, 1979). Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) und Eurogentec (Belgien) bezogen. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

### 4.7.1 Oligonukleotidprimer für Sequenzierung

Sequenzierprimer wurden für die Sequenzierung mit dem LI-COR-Sequenzautomaten 4200 durch Farbstoffe IRDye™700 oder IRDye™800 5'-modifiziert (MWG-Biotech AG, Ebersberg).

Sequenzierprimer pCMVβ*Xho*:

- **SEQ-CMV-1**: 19-mer,  $T_m = 60 \text{ °C}$   
5'-GCCCTGGCTCACAAATACC-3'
- **SEQ-CMV-2**: 19-mer,  $T_m = 60 \text{ °C}$   
5'-CCTTCCGAGTGAGAGACAC-3'

Primer für die Sequenzierung der erweiterten Prothrombin 3'-Region:

- **pGL3fw**: Pos. 1663 bis 1682 (bez. auf pGL3 Basic), 20-mer,  $T_m = 62 \text{ °C}$ , 80 bp vor *Xba* I-Stelle  
5'-CTTACCGGAAAACCTCGACGC-3'
- **RVprimer4**: Pos. 2061 bis 2080, 20-mer,  $T_m = 66 \text{ °C}$ , 56 bp hinter *Bam*H I-Stelle  
5'-GACGATAGTCATGCCCCGCG-3'
- **RVprimer5**: Pos. 2073 bis 2092, 20-mer,  $T_m = 62 \text{ °C}$ , 68 bp hinter *Bam*HI-Stelle  
5'-CATAAGTGCGGCGACGATAG-3'

- **FIIerwfw**: Pos. 651 bis 670 (3'-FIIerw, s. Kap. 0), 20-mer,  $T_m = 60\text{ °C}$   
5'-AGACTAAGGTTGAGGCTAGG-3'

Sequenzierprimer für pcDNA3-BGH+FII-Konstrukte:

- **pcDNA3-rev**: reverse Primer für Sequenzierung pcDNA3-BGH-Plasmide: Pos. 1287 bis 1268 (bez. auf pcDNA3), 20-mer,  $T_m = 60\text{ °C}$   
5'-TGGTTCTTTCCGCCTCAGAA-3'
- **FII-fw**: forward Primer für Prothrombin-cDNA: Pos. 877/844<sup>1</sup> bis 896/863 (bez. auf die Prothrombin-cDNA, Acc. No. J00307), 20-mer,  $T_m = 60\text{ °C}$   
5'-TCAACTATTGTGAGGAGGCC-3'
- **FII-rev**: reverse Primer für Prothrombin-cDNA: Pos. 1170/1137 bis 1151/1118, 20-mer,  $T_m = 60\text{ °C}$   
5'-GACTCTTCCGGAAAAGCATC-3'

#### 4.7.2 Oligonukleotide für PCR-Klonierungen

**Primer für den Nachweis der G20210A-Mutation im Prothrombingen nach Poort et al., 1996 und Makris et al., 1997**

- **FII-1**: Pos. 19889 bis 19908 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262), 20-mer,  $T_m = 60\text{ °C}$   
5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
- **FII-2**: Pos. 20233 bis 20212, Transition G→A an Pos. 20214, 22-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$   
5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3'
- **FII-3**: Pos. 20233 bis 20212, Wildtyp, 22-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$   
5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAGGC-3'
- **FII-4**: Pos. 20093 bis 20116, 24-mer,  $T_m = 70\text{ °C}$   
5'-ATTGATCAGTTTGGAGAGTAGGGG-3'
- **FII-5**: Pos. 20234 bis 20211, 24-mer,  $T_m = 70\text{ °C}$   
5'-AATAGCACTGGGAGCATTGAAGCT-3'

---

<sup>1</sup> Die erste Positionsangabe bezieht sich auf Prothrombin-cDNA mit Pre-Pro-Prothrombin-Sequenz (+33 bp).

---

**Primer für die Klonierung einer 240 bp 3'-untranslatierten und flankierenden Prothrombinregion in pCMVb *Xho***

- **FII-CMV-1:** Pos. 20114 bis 20134 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262), 30-mer,  $T_m = 68$  °C, *Xho* I-Stelle  
5'-CCGCTCGAGGGGGCCACTCATATTCTGGGC-3'
- **FII-CMV-2:** Pos. 20353 bis 20333, 30-mer,  $T_m = 72$  °C, *Xho* I-Stelle  
5'-CCGCTCGAGTCCTCCCACCTCAGCCTCCCG-3'

**Primer für die Klonierung der 241 bp und der erweiterten Prothrombin 3'-Region in pCMVb *Xho***

241 bp 3'-Region: Pos. 20114 bis 20354 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262); Klonierung in *Xho* I und *Kpn* I anstelle der  $\beta$ -Globin 3'-Region des Vektors

- **FII-CMV-1:** Pos. 20114 bis 20134, 30-mer,  $T_m = 68$  °C, *Xho* I-Stelle  
5'-CCGCTCGAGGGGGCCACTCATATTCTGGGC-3'
- **FII-CMV-3rev:** Pos. 20354 bis 20334, 29-mer,  $T_m = 70$  °C, *Kpn* I-Stelle  
5'-GGGGTACCATCCTCCCACCTCAGCCTCCC-3'

Zweiter reverse Primer für die Klonierung in die *Xho* I-Stelle; 3'-Region des Vektors bleibt erhalten

- **FII-CMV-2:** Pos. 20353 bis 20333 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262), 28-mer,  $T_m = 72$  °C, *Xho* I-Stelle  
5'-CCGCTCGAGTCCTCCCACCTCAGCCTCCCG-3'

Reverse Primer für die Klonierung der erweiterten FII 3'-Region (1,6 kb) in *Xho* I und *Kpn* I anstelle der  $\beta$ -Globin 3'-Region des Vektors

- **FII-CMV-4rev:** 33-mer,  $T_m = 66$  °C, *Kpn* I- und *Xba* I-Stelle  
5'-GGGGTACC-TCTAGAGATGATTTGAAGTATATGG-3'

Reverse Primer für die Klonierung der erweiterten FII 3'-Region (1,6 kb) in *Xho* I, 3'-Region des Vektors bleibt erhalten

- **FII-CMV-5rev:** 34-mer,  $T_m = 66$  °C, *Xho* I- und *Xba* I-Stelle  
5'-CCGCTCGAG-TCTAGAGATGATTTGAAGTATATGG-3'

**Primer für die Klonierung der 3'-flankierenden Prothrombinregion in pcDNA3**

- **FII-1:** Pos. 19889 bis 19908 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262), 20-mer,  $T_m = 60$  °C  
5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'

- **FII-pcDNA3**: Pos. 20335 bis 20354 (PCR mit FII-1 und FII-pcDNA3 ergibt ein 465 bp-Fragment, zuzüglich 8 bp *Not* I-site und 8 bp Klammer), 36-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$ , *Not* I-Stelle  
5'-ATAAGAATGCGGCCGCATCCTCCCACCTCAGCCTCC-3'

### Primer für die Klonierung der Prothrombin-Promotorregion und der 3'-Region in pGL3 Basic

Promotorregion: Pos. -944 bis +31 = 974 bp (Positionsangaben nach Bancroft et al., 1990);  
Klonierung in *Xho* I und *Hind* III; Sequenzierung mit RVprimer3 und GLprimer2

- **ProFIIfw**: Promotor forward-Primer: Pos. -944 bis -925, 29-mer,  $T_m = 64\text{ °C}$ , *Xho* I-Stelle  
5'-CCGCTCGAGGAGGCGAGAACTTGTGCCTC-3'
- **ProFII-6**: Promotor forward-Primer: Pos. -748 bis -729, 29-mer,  $T_m = 64\text{ °C}$ , *Xho* I-Stelle,  
5'-CCGCTCGAGCCCAGGGATTTAGTAGCCC-3'
- **ProFII-7**: Promotor forward-Primer: Pos. -524 bis -506, 28-mer,  $T_m = 62\text{ °C}$ , *Xho* I-Stelle,  
5'-CCGCTCGAGCATGGCGAGGGGCAACTTC-3'
- **ProFII-8**: Promotor forward-Primer: Pos. -331 bis -311, 30-mer,  $T_m = 64\text{ °C}$ , *Xho* I-Stelle,  
5'-CCGCTCGAGGATGAGGAACTGAGGCACAC-3'
- **ProFII-9**: Promotor forward-Primer: Pos. -164 bis -146, 28-mer,  $T_m = 62\text{ °C}$ , *Xho* I-Stelle,  
5'-CGCTCGAGGACCATCCATCCCTGCTCC-3'
- **ProFIIrev**: Promotor reverse-Primer: Pos. +31 bis +12, 29-mer,  $T_m = 64\text{ °C}$ , *Hind* III-Stelle  
5'-CCCAAGCTTAGTGTGTCAGCTCCTGGGTC-3'

3'-Region: Pos. 20114 bis 20354 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262),  
Amplifikation eines 241 bp-Fragments; Klonierung in *Xba* I und *Bam*H I anstelle der Poly A  
Region des Vektors

- **3FIIfw**: Pos. 20114 bis 20134, 29-mer,  $T_m = 68\text{ °C}$ , *Xba* I-Stelle  
5'-GCTCTAGAGGGGCCACTCATATTCTGGGC-3'
- **3FIIrev**: Pos. 20354 bis 20335, 28-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$ , *Bam*H I-Stelle  
5'-CGGGATCCATCCTCCCACCTCAGCCTCC-3'

Zweiter reverse Primer für Klonierung in *Xba* I-Stelle; Poly A-Region des Vektors bleibt  
erhalten

- **3xFIIrev**: Pos. 20354 bis 20335 (bez. auf die Prothrombingensequenz, Acc. No. M17262),  
28-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$ , *Xba* I-Stelle  
5'-GCTCTAGAATCCTCCCACCTCAGCCTCC-3'

Reverse Primer für die Klonierung der erweiterten FII 3'-Region (1,6 kb)

- **FIIerw1**: 32-mer,  $T_m = 62\text{ °C}$ , *Bam*H I- und *Xba* I-Stelle  
5'-CGGGATCC-TCTAGAGATGATTTGAAGTATATG-3'
- **FIIerw2**: 33-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$ , *Bam*H I- und *Xba* I-Stelle  
5'-CGGGATCC-TCTAGAGATGATTTGAAGTATATGG-3'
- **FIIerw3**: 32-mer,  $T_m = 66\text{ °C}$ , *Bam*H I-Stelle  
5'-CGGGATCCGATGATTTGAAGTATATGGGAAGG-3'
- **FIIerw4**: 33-mer,  $T_m = 70\text{ °C}$ , *Bam*H I-Stelle  
5'-CGGGATCCGATGATTTGAAGTATATGGGAAGGC-3'

**Primer für die Klonierung der 3'-untranslatierten Region aus pCMV $\beta$ *Xho*-wt und pCMV $\beta$ *Xho*-mut in pCR<sup>O</sup> 2.1**

- **P2I glo fw**: forward-Primer  $\beta$ -Globingen aus Kaninchen: Pos. 1208 bis 1227 (bez. auf das  $\beta$ -Globingen, Acc. No. V00882.1); 110 bis 90 bp vor *Xho*I-Stelle (pCMV $\beta$ *Xho*), 20-mer,  $T_m = 64\text{ °C}$   
5'-GCAGGCTGCCTATCAGAAGG-3'

### 4.7.3 Oligonukleotide für reverse Transkription

WAK-Chemie Medical GmbH, Bad-Soden

- **H-T<sub>11</sub>A**: 16-mer,  $T_m = 36\text{ °C}$   
5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
- **H-T<sub>11</sub>C**: 16-mer,  $T_m = 38\text{ °C}$   
5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3'
- **H-T<sub>11</sub>G**: 16-mer,  $T_m = 38\text{ °C}$   
5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

## 4.8 Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBluescript SK+	lacZ', Amp <sup>R</sup> , ColE1-ori, T3-/T7-Promotor	Stratagene, La Jolla (USA)
pCMV $\beta$ <i>Xho</i>	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens	Nanbu et al., 1994

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCMV $\beta$ Xho-wt	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 240 bp 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (Wildtyp), kloniert in Xho I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-mut	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 240 bp 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (G20210A-Transition), kloniert in Xho I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-wt <sub>f</sub>	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 240 bp 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (Wildtyp), falsche Orientierung, kloniert in Xho I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-mut <sub>f</sub>	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 240 bp 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (G20210A-Transition), falsche Orientierung, kloniert in Xho I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-wt-3'- $\beta$ Glo	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2 des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 241 bp 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (Wildtyp), kloniert in Xho I, Kpn I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-mut-3'- $\beta$ Glo	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2 des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 241 bp 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (G20210A-Transition), kloniert in Xho I, Kpn I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-1,6 kb-wt	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 1,6 kb 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (Wildtyp), kloniert in Xho I, Kpn I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-1,6 kb-mut	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2, 3'-UTR des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 1,6 kb 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (G20210A-Transition), kloniert in Xho I, Kpn I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-1,6 kb-wt-3'- $\beta$ Glo	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2 des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 1,6 kb 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (Wildtyp), kloniert in Xho I, Kpn I	Diese Arbeit
pCMV $\beta$ Xho-1,6 kb-mut-3'- $\beta$ Glo	CMV-Promotor, 5'-UTR, Exons 1, 2, 3, Intron 2 des Kaninchen $\beta$ -Globingens, 1,6 kb 3'-UTR und flankierende Region des Prothrombingens (G20210A-Transition), kloniert in Xho I, Kpn I	Diese Arbeit
pGEMglo1	320 bp Hind III/Bam HI- $\beta$ -Globinfragment aus Kaninchen	Vakalopoulou et al., 1991
pcDNA3	Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , SV40-/ColE1-ori, SV40-/CMV-/Sp6-/ T7-Promotor, SV40 poly A, BGH poly A	Invitrogen, San Diego (USA)
pcDNA3-BGH-wt	Prothrombin-cDNA inkl. 241 bp 3'-UTR und flankierende Region (Wildtyp), Klonierungsstellen EcoR I-Not I	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pcDNA3-BGH-mut	Prothrombin-cDNA inkl. 241 bp 3'-UTR und flankierende Region (G20210A), Klonierungsstellen <i>EcoR</i> I- <i>Not</i> I	Diese Arbeit
pGL3 Basic	Amp <sup>R</sup> , f1-/ColE1-ori, SV40 late poly A, upstream poly A signal, Luciferasegen, RV primer3/4/GL primer2	Promega, Madison (USA)
pGL3-ProFII	974 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III	Diese Arbeit
pGL3-ProFII-6	778 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -748 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III	Diese Arbeit
pGL3-ProFII-7	554 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -524 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III	Diese Arbeit
pGL3-ProFII-8	361 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -331 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III	Diese Arbeit
pGL3-ProFII-9	194 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -164 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III	Diese Arbeit
pGL3-Prom.+3'-FII wt	974 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III und 241 bp Wildtyp-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstellen <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> H I (Exzision der Poly A-Region des Vektors)	Diese Arbeit
pGL3-Prom.+3'-FII mut	974 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III und 241 bp 20210A-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstellen <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> H I (Exzision der Poly A-Region des Vektors)	Diese Arbeit
pGL3-Prom.+3'-FII wt+ poly A	974 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III und 241 bp Wildtyp-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstelle <i>Xba</i> I	Diese Arbeit
pGL3-Prom.+3'-FII mut +poly A	974 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III und 241 bp 20210A-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstelle <i>Xba</i> I	Diese Arbeit
pGL3Basic+ 3'-FII wt	241 bp Wildtyp-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstellen <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> H I (Exzision der Poly A-Region des Vektors)	Diese Arbeit
pGL3Basic+ 3'-FII mut	241 bp 20210A-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstellen <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> H I (Exzision der Poly A-Region des Vektors)	Diese Arbeit
pGL3-Prom.+1,6 kb 3'-FII wt	974 bp Prothrombin 5'-Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III und 1,6 kb Wildtyp-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstellen <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> H I (Exzision der Poly A-Region des Vektors)	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGL3-Prom. +1,6 kb 3'-FII mut	974 bp Prothrombin 5'-flankierende und untranslatierte Region (Pos. -944 bis +31), Klonierungsstellen <i>Xho</i> I und <i>Hind</i> III und 1,6 kb 20210A-Prothrombin 3'-Region, Klonierungsstellen <i>Xba</i> I und <i>Bam</i> H I (Exzision der Poly A-Region des Vektors)	Diese Arbeit
pGL3 control	Amp <sup>R</sup> , f1-/ColE1-ori, SV40-Promotor, SV40-Enhancer, SV40 late poly A, upstream poly A signal, Luciferasegen, RV primer3/4/GL primer2	Promega, Madison (USA)
pRL-TK	Amp <sup>R</sup> , f1-/ColE1-ori, T7-/HSV TK-Promotor, SV40 late poly A, chimeric intron, <i>Renilla</i> -Luciferasegen	Promega, Madison (USA)
pCR <sup>®</sup> 2.1	lacZ', Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , ColE1-ori, M13-/T7-Promotor	Invitrogen, San Diego (USA)
pCR <sup>®</sup> 2.1-3'- βGlo-Prothr.	410 bp 3'-Prothrombin-β-Globin cDNA-Bereich	Diese Arbeit
M13mp18- Prothr.-cDNA	1947 bp Prothrombin-cDNA (Degen et al., 1983, Datenbank Acc. No. J00307), mit <i>Eco</i> R I kloniert	Dr. J. Hofsteenge, Friedrich- Miescher-Institut, Schweiz
pBS-Prothr.- cDNA	1947 bp Prothrombin-cDNA (Degen et al., 1983, Datenbank Acc. No. J00307), mit <i>Eco</i> R I umkloniert aus M13mp18-Prothr.-cDNA	Diese Arbeit
pBS-Prothr.-wt	Prothrombin-cDNA inkl. 241 bp 3'-UTR und flankierende Region (Wildtyp), Klonierungsstellen <i>Eco</i> R I- <i>Not</i> I	Diese Arbeit
pBS-Prothr.- mut	Prothrombin-cDNA inkl. 241 bp 3'-UTR und flankierende Region (G20210A), Klonierungsstellen <i>Eco</i> R I- <i>Not</i> I	Diese Arbeit
pBS-3'-FIIerw	1,8 kb <i>Xba</i> I-Prothrombinfragment, umfaßt einen Teil aus Intron M, Exon XIV und 3'-flankierende Sequenz	Diese Arbeit

## 4.9 Antikörper

### 4.9.1 Primäre Antikörper

**Antikörper SAFII-HRP** von *Haemochrom Diagnostica GmbH*, Essen:

Polyklonaler Schaf-Antikörper gegen humanes Prothrombin, isoliert aus Plasma,  
Peroxidase-gekoppelt.

**Antikörper Rabbit-Anti-Human-Prothrombin** von *Dako A/S*, Glostrup (Dänemark):

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanes Prothrombin, isoliert aus Plasma.

**Antikörper MA-a-Tubulin** von *Sigma Chemical Co.*, St. Louis (USA):

Polyklonaler Maus-Antikörper gegen humanes α-Tubulin, isoliert aus Plasma.

## 4.9.2 Sekundäre Antikörper

POD-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper von *Jackson Immuno Research*

*Laboratories*, West Grove (USA)

POD-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper von *Jackson Immuno Research Laboratories*,

West Grove (USA)

## 4.10 Bakterienstämme

Die Klonierung des humanen Prothrombins und Teilklonen des Prothrombins erfolgte in verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen.

Stamm	Genotyp	Firma
DH5a	supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1 relA1 (Hanahan, 1983)	Clontech, Palo Alto (USA); GIBCO BRL, Gaithersburg (USA)
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi $\Delta$ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15] (Yanisch-Perron et al., 1985)	Clontech, Palo Alto (USA)
SCS110	rpsL (Str <sup>r</sup> ) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 $\Delta$ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]	Stratagene, La Jolla (USA)
TOP10F'	F' {lacI <sup>q</sup> Tn10(Tet <sup>R</sup> )} mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen, San Diego (USA)

## 4.11 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit adhären wachsenden Zellen gearbeitet.

### 4.11.1 Primäre Zellen

HUVEC: humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (human umbilical vein endothelial cells).

Hepatozyten: männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*, Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover).

---

### **4.11.2 Etablierte Zelllinien**

Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) oder von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) bezogen.

CL-48 : humane embryonale Leberzellen (U. S. Pat. 3,935,066)

CCL-13: humane Chang Leberzellen

COS-1: SV40 transformierte Affennierenzellen (*Ceropithecus aethiops*)

HeLa: humane Cervixcarcinom-Zelllinie (Scherer et al., 1953; Gey et al., 1952)

HepG2: humane Lebercarcinomzellen (Aden et al., 1979; Knowles et al., 1980)

SK-HEP-1: humane Leber-Adenocarcinomzellen (Fogh et al., 1977; Heffelfinger et al., 1992)

## 5 Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

##### 5.1.1.1 Bakterienkultur

**LB-Medium, pH 7,5:**

1	% (w/v)	Casein Hydrolysat (Pepton)
0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
1	% (w/v)	NaCl

Nach dem Autoklavieren wurde Ampicillin zugesetzt (100 µg/ml).

**LB-Agarplatten, pH 7,5:**

1	% (w/v)	Casein Hydrolysat (Pepton)
0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
1	% (w/v)	NaCl
1,5	% (w/v)	Agar

Nach dem Autoklavieren wurde Ampicillin zugesetzt (100 µg/ml) und jeweils 25 ml des Ansatzes in sterile Petri-schalen gegossen.

**SOC-Medium, pH 7,0:**

2	% (w/v)	Casein Hydrolysat (Pepton)
0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl

Nach dem Autoklavieren

10	mM	MgCl <sub>2</sub>
10	mM	MgSO <sub>4</sub>
20	mM	Glucose zugeben.

**Lagermedium:**

0,70	% (w/v)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,30	% (w/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,05	% (w/v)	Natriumcitrat
0,01	% (w/v)	MgSO <sub>4</sub>
50,00	% (v/v)	Glycerin

sterilfiltriert.

#### Anlegen einer Übernachtskultur

5 ml LB-Medium wurden entweder mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte oder mit 50 µl einer Lagerkultur angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm über Nacht geschüttelt. Diese Kultur konnte für die Minipräparation von Plasmid-DNA oder zum Animpfen größerer Kulturen verwendet werden.

### Anlegen einer Lagerkultur

900 µl einer Übernachtskultur wurden mit 900 µl Lagermedium in einem Einfrierröhrchen vorsichtig gemischt und bei -75 °C gelagert.

### 200 ml-Bakterienkultur

200 ml LB-Medium wurden entweder mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte oder mit 0,5 ml Übernachtskultur angeimpft. Bei 37 °C und 225 rpm wurden die Bakterien bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,8 bis 1,0 geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml Chloramphenicol (Stammlösung: 34 mg/ml in Ethanol, Endkonzentration: 170 µg/ml) wurden die Bakterien über Nacht geschüttelt.

#### 5.1.1.2 Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (Minipräparation)

**Lösung I:**

50	mM	Glucose
10	mM	EDTA
24	mM	Tris/HCl, pH 8,0
5	mg/ml	Lysozym frisch zum Ansatz geben.

**Lösung II:**

200	mM	NaOH
1	% (w/v)	SDS

**Lösung III:**

3	M	KOAc, pH 4,8
---	---	--------------

Die Präparation erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Birnboim, 1983). 2 ml einer Bakterienübernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Lösung II versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl kalter Lösung III wurden Proteine, chromosomale DNA und Membranpartikel ausgefällt und 10 min bei 10.000 x g (4 °C) abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 2,5 Volumenanteilen Ethanol gefällt und durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g und 4 °C pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 29,5 µl ddH<sub>2</sub>O und 0,5 µl Ribonuklease A (10 mg/ml) aufgenommen. Ein Aliquot wurde für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt.

Für eine anschließende automatische Sequenzierung wurden geringe Mengen Plasmid-DNA mit dem *Plasmid Mini Kit* der Firma *QIAGEN* nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 5.1.1.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA über Anionen-Austauschsäulen

<b>Puffer P1:</b>	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNase A
<b>Puffer P2:</b>	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
<b>Puffer P3:</b>	3	M	KOAc, pH 5,5
<b>Puffer QBT:</b>	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS (3-N-Morpholino-Propansulfonsäure), pH 7,0
	15	% (v/v)	Ethanol
	0,15	% (v/v)	Triton X-100
<b>Puffer QC:</b>	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Ethanol
<b>Puffer QF:</b>	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris/HCl, pH 8,5
	15	% (v/v)	Ethanol

Die Präparation wurde unter Verwendung des von der Firma *QIAGEN* bezogenen *Plasmid Maxi Kits* nach dem Anwendungsprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Eine 200 ml-Bakterienkultur wurde 20 min bei 6.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Lysepuffer P2 versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation des Lysats erfolgte durch Zugabe von 10 ml kaltem Puffer P3. Daran schloß sich eine 20-minütige Inkubation auf Eis an. Denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zellbruchstücke wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 19.500 rpm und 4 °C (Beckman J2-21, JA-20-Rotor) präzipitiert. Zur weiteren Reinigung wurde der Überstand nochmals 15 min zentrifugiert. Das partikelfreie Lysat wurde dann auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte *QIAGEN*-Säule 500 geladen und die Säule zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer QF in ein silanisiertes Corex-Zentrifugenröhrchen eluiert, durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 9.500 rpm und 4 °C (Beckman J2-21, JA-20-Rotor) präzipitiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 bis 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM EDTA) rückgelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde eine Konzentration von 0,5 bis 1,0 µg/µl eingestellt. Für Transfektionsexperimente wurde die Plasmid-DNA mit dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* der Firma *QIAGEN* nach den Angaben des Herstellers Endotoxin-frei präpariert.

### 5.1.1.4 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und die Konzentration nach folgender Gleichung berechnet:

$$c = OD_{260} \cdot f \cdot n \quad [\mu\text{g/ml}]$$

c : Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]

OD : Optische Dichte

f : Verdünnungsfaktor

n : 50  $\mu\text{g/ml}$  für DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  für RNA und 37  $\mu\text{g/ml}$  für Oligonukleotide bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm.

Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt. Im Idealfall liegt der Quotient bei einem Wert von 1,8 für DNA und 2,0 für RNA.

### 5.1.1.5 Analyse von Plasmid-DNA

#### 5.1.1.5.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch in definierte Fragmente. Je nach Restriktionsenzym können dabei 3'- oder 5'-überhängende Enden, die als kohäsive oder klebrige Enden bezeichnet werden, oder glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Restriktionsspaltungen wurden für analytische und präparative Zwecke und zur Gewinnung linearer DNA-Fragmente durchgeführt.

<u>Restriktionsansatz:</u>	<u>analytisch</u>	<u>präparativ</u>
Plasmid-DNA (0,5 - 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0,5 - 4 $\mu\text{l}$	15 - 30 $\mu\text{l}$
10 x Reaktionspuffer	2,5 $\mu\text{l}$	8,0 $\mu\text{l}$
Restriktionsenzym (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$	3,0 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O (steril)	ad 25 $\mu\text{l}$	ad 80 $\mu\text{l}$

Der Restriktionsansatz wurde 1 bis 16 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Reaktionen wurden durch Zusatz von EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM und zehnmütiger Hitzedenaturierung der Restriktionsenzyme bei 65 °C gestoppt oder einer Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit nachfolgender Fällung unterzogen.

### 5.1.1.5.2 Analytische Agarosegelelektrophorese

<b>1 x TBE-Puffer</b> , pH 8,0:	0,09	M	Tris
	0,09	M	Borat
	0,002	M	EDTA, pH 8,0
<b>Agarosegele:</b>	0,6 - 2,5	% (w/v)	Agarose
	0,1	µg/ml	Ethidiumbromid
<b>5 x Auftragspuffer:</b>	25	mM	Tris/HCl, pH 7,0
	150	mM	EDTA
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	25	% (v/v)	Glycerin

Die durch Restriktionsenzymsspaltung erhaltenen Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (Southern, 1975 und 1977; Sambrook et al., 1989). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Poren des Agarosegels. Für DNA-Fragmente im Bereich von 700 bis 10.000 bp wurden 1 %ige Gele verwendet, für kleinere Fragmente wurde der Agaroseanteil auf bis zu 2,5 % erhöht. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt und das Gel in eine Gelkammer gegossen. Zum Aushärten wurde das Gel mindestens 30 min bei 4 °C in der Kühlzelle gelagert. Für die Elektrophorese wurde der Kamm entfernt, die Gelkammer in die Gelapparatur eingesetzt und mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Zur optischen Kontrolle wurden die Restriktionsansätze mit 0,25 Volumenanteilen 5 x Auftragspuffer versetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 2 min bei 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um Zyklisierungen zu vermeiden. Zur Abschätzung der Größe und Menge der DNA-Fragmente wurden zusätzlich DNA-Längenstandards aufgetragen. Für Fragmente unter 500 Basenpaaren wurde der Längenstandard 100 bp DNA-Leiter, für größere Fragmente wurden 1 kb DNA-Leiter und  $\lambda$ -DNA/*Hind* III (alle von *GIBCO BRL*, USA) verwendet. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm. Die DNA-Banden konnten über die Fluoreszenz der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe unter UV-Licht auf einem Transilluminator ( $\lambda = 302$  nm) sichtbar gemacht und zur weiteren Auswertung fotografiert werden.

### 5.1.1.5.3 Präparative Agarosegelelektrophorese

<b>1 x TAE-Puffer</b> , pH 8,0:	40	mM	Tris-Acetat, pH 8,0
	1	mM	EDTA

Die Auftrennung und Isolierung von PCR-Produkten oder durch Restriktionsspaltung entstandenen DNA-Fragmenten, die zur Ligation oder zur radioaktiven Markierung eingesetzt werden sollten, erfolgte in präparativen Agarosegelen. Anstelle von TBE-Puffer wurde hier TAE-Puffer verwendet, da Borat-Ionen bei der nachfolgenden Ligation störend wirken können. Für die Auftrennung wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 0,25 Volumenanteilen 5 x Auftragspuffer (Kap. 5.1.1.5.2) versetzt, 2 min bei 65 °C im Wasserbad erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt und auf 1 %iges Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm in 1 x TAE-Laufpuffer.

#### 5.1.1.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

**Puffer QX1:**

3	N	NaI
4	M	NaClO <sub>4</sub>
5	mM	Tris/HCl, pH 7,5
0,1	% (w/v)	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>

**Puffer PE:**

70	% (v/v)	Ethanol
100	mM	NaCl
1	mM	EDTA
10	mM	Tris/HCl, pH 7,5

**Puffer EB:**

10	mM	Tris/HCl, pH 8,5
----	----	------------------

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* der Firma *QIAGEN* nach den Angaben des Herstellers.

Nach Auftrennung über ein präparatives Agarosegel wurde das gewünschte DNA-Fragment unter der Hand-UV-Lampe ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) mit Hilfe eines DNA-Längenmarkers identifiziert und mit einem scharfen Skalpell herausgetrennt. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein tariertes 2 ml-Eppendorfgefäß überführt, gewogen und mit 3 Volumenanteilen Puffer QX1 versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 50 °C bis zum vollständigen Auflösen der Agarose (ca. 10 min). Die erhaltene Lösung wurde auf QIAquick-Zentrifugensäulen geladen, 1 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Eluat verworfen. Um Agarosereste zu entfernen, wurden nochmals 500 µl Puffer QX1 auf die Säule aufgetragen und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit je 750 µl Puffer PE gewaschen und 5 min getrocknet, die DNA mit 30 bis 50 µl Puffer EB eluiert.

## 5.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 5.1.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der selektiven Amplifizierung von DNA-Abschnitten zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Als Matrize (*Template*) benutzt man eine doppelsträngige DNA, die bei 94 °C denaturiert wird. Unter Hybridisierungsbedingungen (58 bis 70 °C) erfolgt die Anlagerung (*anneal*) der Oligonukleotidprimer. DNA-Polymerasen synthetisieren die komplementären Stränge in 5'→3'-Richtung bei 72 °C. Zur DNA-Synthese werden thermostabile DNA-Polymerasen verwendet, z. B. die *Taq*-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* oder die *Pfu*-Polymerase von *Pyrococcus furiosus*, die ein Temperaturoptimum von 72 °C besitzen und auch unter Denaturierungsbedingungen stabil sind. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese wird 25 bis 40-mal wiederholt, so dass am Ende maximal  $2^{25}$  bis  $2^{40}$  doppelsträngige DNA-Moleküle der gewünschten Sequenz vorliegen. Zur Amplifikation der Prothrombin-cDNA wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase, für die Amplifikation von Teilfragmenten des Prothrombingens aus genomischer DNA dagegen die *Taq*-Polymerase verwendet. Die PCR-Ansätze wurden in sterile 0,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert und mit dem gleichen Volumen Mineralöl überschichtet. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem DNA Thermal Cycler durchgeführt. Zunächst wurden die optimalen Temperaturbedingungen für die Amplifikation der spezifischen DNA-Fragmente in analytischen Reaktionsansätzen getestet. Dabei wurde die Anlagerungstemperatur in der Regel im Bereich der Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer gewählt. Je 10 µl PCR-Ansatz wurden auf einem analytischen Agarosegel überprüft. Anschließend wurde eine präparative PCR durchgeführt, die Ansätze wurden vereint und mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* Enzym, Primer und Nukleotide entfernt. Für die nachfolgende Klonierung wurden die Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Die PCR-Produkte konnten dann zur Ligation eingesetzt werden.

#### Reaktionsansatz mit *Pfu*-Polymerase

<b>10 x <i>Pfu</i>-Puffer:</b>	200 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	KCl
	60 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1 % (v/v)	Triton X-100
	100 µg/ml	Nuklease-freies BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	ad 100,0 µl	
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	10,0 µl	1 x
DMSO	10,0 µl	10 % (v/v)
dNTPs (5 mM)	10,0 µl	500 µM
DNA-Template (0,5 µg/µl)	1,0 µl	5 ng/µl
Forward-Primer (0,1 mM)	1,0 µl	1 µM
Reverse-Primer (0,1 mM)	1,0 µl	1 µM
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	2,0 µl	0,05 U/µl
gesamt	100,0 µl	

### Zyklusparameter:

30 bis 40 Zyklen:

Denaturierung: 1 min bei 94 °C

Hybridisierung: 2 min bei 60 bis 66 °C

DNA-Synthese: 3 min bei 72 °C

Kühlung bei 4 °C.

### Reaktionsansatz mit *Taq*-Polymerase Mix

**10 x *Taq*-Puffer:** 100 mM Tris/HCl, pH 8,3  
 500 mM KCl  
 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,01 % (w/v) Gelatine

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	ad 50,0 µl	
10 x <i>Taq</i> -Puffer	10,0 µl	1 x
dNTPs (5 mM)	2,0 µl	200 µM
DNA-Template (0,5 µg/µl)	0,5 µl	5 ng/µl
Forward-Primer (0,1 mM)	0,5 µl	1 µM
Reverse-Primer (0,1 mM)	0,5 µl	1 µM
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	0,05 U/µl
gesamt	50,0 µl	

**Zyklusparameter:**

Denaturierung:	7 min bei 95 °C
40 Zyklen:	
Denaturierung:	1 min bei 94 °C
Hybridisierung:	1 bis 2 min bei 58 bis 70 °C
DNA-Synthese:	1 bis 3 min bei 72 °C
DNA-Synthese:	5 min bei 72 °C
Kühlung bei 4 °C.	

**5.1.2.2 Reinigung von PCR-Produkten**

<b>Puffer PB :</b>	3	N	NaI
	4	M	NaClO <sub>4</sub>
	5	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,1	% (w/v)	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
<b>Puffer PE:</b>	70	% (v/v)	Ethanol
	100	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
<b>Puffer EB :</b>	10	mM	Tris/HCl, pH 8,5

Die Reinigung der PCR-Ansätze von Polymerase und Nukleotiden wurde mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* nach dem Anwendungsprotokoll der Firma *QIAGEN* durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit 5 Volumenanteilen Puffer PB versetzt und auf *QIAquick-Zentrifugensäulen* geladen. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000 x g und Raumtemperatur wurde das Eluat verworfen und die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die Säule 5 min an der Luft getrocknet und die DNA mit 30 bis 50 µl Puffer EB eluiert.

**5.1.2.3 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren**

<b>1 x Reaktionspuffer:</b>	50 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,9
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	DTT

Um eine unerwünschte Rezirkularisierung von linearisiertem Vektor zu vermeiden, wurden die terminalen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal*) entfernt.

**Reaktionsansatz:**

linearisierte Vektor-DNA (10 - 15 µg)	89,5 µl
10 x Reaktionspuffer	10,0 µl
<u>alkalische Phosphatase (10 U/µl)</u>	<u>0,5 µl</u>
gesamt	100,0 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde EDTA in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt und 10 min bei 75 °C erhitzt. Nach einer PCI-Extraktion, einer Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol und anschließender Präzipitation mit Ethanol wurde die Plasmid-DNA in 100 µl ddH<sub>2</sub>O rückgelöst, mit Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration: 1 x) und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

**5.1.2.4 Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol**

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen DNA-Lösung wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und 5 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die untere organische Phase mit dem gleichen Volumen ddH<sub>2</sub>O reextrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt.

**5.1.2.5 Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol**

Um Phenolreste oder Restriktionsenzyme zu entfernen, wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (25:1) versetzt und 5 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (obere wässrige Phase) wurde abgenommen und aufbewahrt. Die untere Phase wurde mit einem Volumenanteil ddH<sub>2</sub>O reextrahiert und zur Phasentrennung 5 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden beide Überstände vereinigt.

**5.1.2.6 Fällung von DNA mit Ethanol**

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 7,0 (Endkonzentration: 0,3 M) und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol wurde die DNA 20 min bei 10.000 x g und 4 °C präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, jeweils 5 min zentrifugiert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in einem adäquaten Volumen an TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8; 0,1 mM EDTA) oder ddH<sub>2</sub>O rückgelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.1.2.7 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden mittels Klenow-Enzym

<b>1 x <i>E. coli</i> Polymerase I-Puffer:</b>	10,0 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	5,0 mM	MgCl <sub>2</sub>
	7,5 mM	DTT

Für die Ligation inkompatibler DNA-Enden wurden 5'-überhängende Enden mit Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I Large Fragment) aufgefüllt.

#### Reaktionsansatz:

DNA (30 µg)	84,5 µl
10 x <i>E. coli</i> Polymerase I-Puffer	10,0 µl
dNTPs (je 5 mM, Endkonz.: 200 µM)	4,0 µl
<u>Klenow-Enzym (5 U/µl)</u>	<u>1,5 µl</u>
gesamt	100,0 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 25 °C inkubiert, mit 25 µl 5 x Auftragspuffer versetzt, 10 min bei 75 °C inaktiviert und das Fragment aus einem präparativen Agarosegel isoliert.

### 5.1.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

<b>1 x T4-Ligase-Puffer:</b>	50 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	DTT
	1 mM	ATP
	50 µg/ml	BSA

Zur Herstellung von Vektorkonstrukten wurden die mit Restriktionsenzymen vorbehandelten Vektoren und PCR-Produkte oder DNA-Fragmente über das Enzym T4-DNA-Ligase miteinander ligiert (Lehman, 1974; Sambrook et al., 1989). Komplementäre, von demselben Enzym erzeugte Einzelstrangenden können eine Basenpaarung eingehen und dauerhaft durch das Enzym DNA-Ligase, das die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle katalysiert, zusammengefügt werden. Im Gegensatz zu der DNA-Ligase aus *E. coli* kann die T4-DNA-Ligase (*New England Biolabs*, USA) auch Restriktionsfragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) verbinden. Da die Verwendung zweier unterschiedlicher Schnittstellen die Anzahl der Rezirkulationen des Vektors verringert, erfolgte in diesem Fall keine Dephosphorylierung des Vektors. Ein weiterer Vorteil der Verwendung zweier verschiedener Restriktionsstellen ist die gerichtete Klonierung des Inserts.

Vektor- und Insert-DNA wurden nach dem Restriktionsverdau über ein präparatives Agarosegel gereinigt und mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN)* aus dem Gel

isoliert. Die Vektor-DNA wurde mit dem 3- bis 4-fachen molaren Überschuß freier Enden an Insert-DNA in 1 x T4-Ligase-Puffer mit 400 U T4-Ligase bei der Ligation kohäsiver Enden bzw. 2000 U T4-Ligase bei glatten Enden in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht inkubiert. Die Ansätze wurden bei Ligation kohäsiver Enden über Nacht bei 16 °C inkubiert, um störende Einflüsse durch die thermische Eigenbewegung der DNA-Moleküle zu minimieren. Blunt-end-Ligationen wurden dagegen bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **5.1.3 Transformation von Bakterien**

Als kompetent bezeichnet man Zellen, die in der Lage sind, in Lösung befindliche DNA aufzunehmen. Eine Methode besteht darin, Zellen und Plasmid-DNA in einer Lösung aus Calciumchlorid zu mischen und dann die Zellen einem kurzen Hitzeschock auszusetzen (Cohen et al., 1972; Dagert et al., 1979). Bei diesem Verfahren bindet das Salz an die Zellwände der Bakterien und induziert dort Poren durch Kristallbildung. Eine weitere Transformationsmethode ist die Elektroporation oder Elektrotransformation (Dower et al., 1988; Wirth et al., 1989). Durch Anlegen einer elektrischen Spannung werden auch hier Löcher in der Zellwand erzeugt. Für die Elektroporation benötigt man eine Zellsuspension, aus der durch Waschen mit ddH<sub>2</sub>O die Ionen des Mediums entfernt wurden. Durch den hohen elektrischen Widerstand der Suspension kann die Elektroporation bei genügend hoher Spannung ohne Kurzschluss durchgeführt werden.

#### **5.1.3.1 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen**

Die kompetenten Bakterienstämme DH5α, JM109, SCS110 und TOP10F' wurden bei -75 °C gelagert. Die Transformation wurde nach den Anwendungsprotokollen der Hersteller durchgeführt. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol (bei SCS110 und TOP10F') und 2 bis 3 µl Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 bis 45 s bei 42 °C (JM109, SCS110, TOP10F') bzw. 20 s bei 37 °C (DH5α) inkubiert (Hitzeschock). Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 250 µl SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Je 50 und 200 µl Zellsuspension wurden zur Selektion auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 5.1.3.2 Präparation von *E. coli*-Zellen für die Elektrotransformation

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 10 ml Übernachtskultur eines für die Transformation geeigneten Bakterienstammes (DH5 $\alpha$ , JM109) in 1 l 2xYT-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1,0 bei 37 °C im Bakterienschüttler (225 rpm) inkubiert. Nach Abkühlung für 15 bis 30 min auf Eis wurden die Bakterien 20 min bei 4.000 x g und 4 °C sedimentiert. Es folgten zwei Waschschrirte in 1 l und 500 ml kaltem ddH<sub>2</sub>O mit nachfolgender Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, in ein Falcon-Röhrchen überführt und erneut sedimentiert. Die salzfreien Bakterien wurden in 1 bis 3 ml 10 % Glycerin resuspendiert, in 120  $\mu$ l-Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -75 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 5.1.3.3 Elektrotransformation

Für die Elektroporation wurden 2 bis 3  $\mu$ l Ligationsansatz mit 40  $\mu$ l auf Eis aufgetauter elektrokompenter Bakterienzellen in einem vorgekühlten Eppendorfgefäß gemischt und 1 min auf Eis gesetzt. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine eisgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte in einer Gene-Pulser-Apparatur bei 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F und 2,5 kV. Nach Anlegen eines elektrischen Impulses betrug die Zeitkonstante  $\tau$  im Idealfall 4,5 bis 5 ms. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen 5 min bei 3.500 rpm und Raumtemperatur sedimentiert, 900  $\mu$ l des Überstandes abgenommen und das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert. Zur Selektion wurden die Zellen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (100  $\mu$ g/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit 24 bis 48 Kolonien je 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft, über Nacht bei 37 °C geschüttelt und zur Überprüfung der Klonierung Plasmid-Minipräparate hergestellt.

### 5.1.4 Isolierung von genomischer DNA

Die Präparation von genomischer DNA aus kultivierten Zellen bzw. humanem Blut erfolgte mit dem *QIAamp Blood Kit*. Pro Präparation wurde eine konfluente 100 mm-Zellkulturschale (ca.  $4 \cdot 10^6$  Zellen) eingesetzt. Alternativ wurden 200  $\mu$ l EDTA-Blut eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, mit Trypsin abgelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 200  $\mu$ l PBS<sup>-</sup> resuspendiert und die genomische DNA nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

### 5.1.5 Radioaktive Markierung von DNA

<b>STE-Puffer:</b>	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100	mM	NaCl
	1	mM	EDTA

Die radioaktive Markierung von spezifischen DNA-Proben für die Detektion in Southern und Northern Blot Analyse erfolgte mittels „Random Priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983). Es wurde das High Prime DNA Labeling Kit verwendet. Zunächst wurden 50 bis 100 ng dsDNA-Fragmente in einem Volumen von 8 µl für 5 min bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für die Reaktion wurden 4 µl High Prime Reaktionsgemisch inklusive 12-mer Random Primer Mischung, 1 Einheit/µl Klenow-Polymerase und 5 x stabilisierter Reaktionspuffer in Glycerin, 50 % (v/v), 3 µl dATP, dGTP, dTTP Mischung und 5 µl 50 µCi [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP, 3000 Ci/mMol zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend durch Zugabe von 50 µl STE-Puffer das Klenow-Enzym inaktiviert. Freie Nukleotide wurden mittels Gelfiltration über eine NucTrap-Säule von der markierten Probe abgetrennt. Dazu wurde das Reaktionsgemisch auf die mit 100 µl STE-Puffer äquilibrierte Säule pipettiert und die markierte DNA-Probe mit 70 µl STE-Puffer eluiert.

### 5.1.6 Southern Blot Analyse

<b>Depurinierungslösung:</b>	0,25 N	HCl
<b>Denaturierungslösung:</b>	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH
<b>Neutralisierungslösung:</b>	0,5 M	Tris/HCl, pH 7,0
	1,5 M	NaCl
<b>20 x SSC:</b>	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat, pH 7,0

Restriktionsfragmente wurden in einem 0,8 %igem TBE-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Waschen des Geles in ddH<sub>2</sub>O erfolgte eine 30-minütige Inkubation in Depurinierungslösung. Daran schloß sich eine zweimalige Behandlung mit Denaturierungslösung zur Einzelstrangbildung der DNA und die Äquilibration des Geles auf einen pH-Wert von 7,4 mit Neutralisierungslösung an.

Der Southern-Transfer (Southern, 1975 und 1979) der DNA erfolgte mittels Kapillarblot in 20 x SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond N<sup>+</sup>). Durch UV-crosslinking (0,12 J pro cm<sup>2</sup>) wurde die DNA auf der Membran fixiert. Anschließend wurde

die Membran in 2 x SSC gewaschen und 1 ½ h bei 68 °C in einer Hybridisierungsröhre mit *QuikHyb Hybridization Solution* prähybridisiert. Eine radioaktiv markierte DNA-Probe (Kap. 5.1.5) wurde mit 200 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml) 10 min auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der DNA-Probe auf Eis wurden 1 bis  $1,5 \cdot 10^6$  cpm pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rollen für 1 h bei 68 °C.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Probe wurde die Nylonmembran dreimal bei Raumtemperatur mit 1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und mindestens zweimal 15 min bei 60 °C mit 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS unter Kontrolle der Restaktivität auf dem Filter gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte für 6 h mit einer Verstärkerfolie bei -75 °C.

### 5.1.7 Northern Blot Analyse

#### 5.1.7.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

**Lösung D:**

4	M	Guanidinthiocyanat
0,025	M	Natriumcitrat pH 7,0
0,5	% (w/v)	N-Lauroyl Sarcosin
0,1	M	β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch zugesetzt)

**1 x PBS<sup>-</sup>, pH 7,4:**

3,4	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
17,8	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
145,0	mM	NaCl

pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA nach Chomczynski und Sacchi (1987) wurden konfluente Zellen einer Zellkulturschale zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und unter Zugabe von Lösung D mit einem Zellschaber abgelöst. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4 und 1 Volumen wassergesättigtem Phenol versetzt und 5 min gemischt. Nach Zugabe von 1/5 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (49:1 v/v) wurde erneut 2 min gemischt und 10 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, die RNA mit 1 Volumen Isopropanol für 20 min bei -20 °C gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 10.000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, mit 300 µl Lösung D versetzt, erneut mit 1 Volumen Isopropanol präzipitiert und nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol in ddH<sub>2</sub>O rückgelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20 °C.

Alternativ wurde die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen mit Trireagenz nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 5.1.7.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit. Je 100 mg Schweineleber wurden in 1 ml RLT-Puffer mit 1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Schwingmühle (Mixer Mill) homogenisiert, einer Proteinase K-Behandlung unterzogen und die RNA nach dem Anwendungsprotokoll des Herstellers über Anionen-Austauschsäulen isoliert. Gleichzeitig konnte eine DNase I-Behandlung mit dem RNase-Free DNase Set durchgeführt werden.

### 5.1.7.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

**Agarosegel:**

1,5	% (w/v)	Agarose
0,04	M	Triethanolamin pH 7,5
2	mM	EDTA
8,3	% (v/v)	37 % Formaldehyd
0,1	% (w/v)	SDS

**Laufpuffer:**

0,04	M	Triethanolamin pH 7,5
2	mM	EDTA
8,3	% (v/v)	37 % Formaldehyd

**2 x Auftragspuffer:**

0,08	M	Triethanolamin pH 7,5
4	mM	EDTA
15	% (v/v)	37 % Formaldehyd
82,5	% (v/v)	Formamid (deion.)
4	% (w/v)	Ficoll 400
0,2	% (w/v)	Bromphenolblau

Für RNA-Gele (Lehrach et al., 1977; Nagamine et al., 1983) wurden 1,5 % Agarose in 0,04 M Triethanolamin, 2 mM EDTA-Lösung durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 8,3 % (v/v) einer 37 %igen Formaldehydlösung und 0,1 % (w/v) SDS zugegeben und das Gel gegossen. 10 bis 15  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit 1 Volumen 2 x Auftragspuffer versetzt, 10 min bei 65 °C denaturiert und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 ½ h bei 70 V in Triethanolamin-Laufpuffer. Zur Bestimmung der Transkriptgrößen dienten bei Gesamt-RNA die 28 S und 18 S rRNA-Banden als interner Standard. Die Moleküllänge der 28 S rRNA beträgt 4718 Nukleotide und die der 18 S rRNA 1874 Nukleotide.

### 5.1.7.4 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

**20 x SSC:**

3	M	NaCl
0,3	M	Natriumcitrat pH 7,0

**Methylenblau-Lösung:**

0,04	% (w/v)	Methylenblau
0,5	M	Natriumacetat pH 5,2

Der RNA-Transfer erfolgte mittels Kapillarblot (Thomas, 1980 und 1983) für 16 h auf eine Nylonmembran. Dazu wurde zunächst das Gel  $\frac{1}{2}$  bis 1 h in 20 x SSC äquilibriert und mit der Oberseite nach unten auf Whatman-Filterpapier, das in ein Pufferreservoir mit 10 x SSC reicht, aufgelegt. Die Nylonmembran wurde zunächst in ddH<sub>2</sub>O, anschließend in 10 x SSC äquilibriert und dann luftblasenfrei auf das Agarosegel gelegt, mit zwei in 10 x SSC getränkten Whatman-Filterpapieren und einem Papiertuchstapel bedeckt und mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Nach 16 h wurde die RNA durch UV-crosslinking (0,12 J pro cm<sup>2</sup>) fixiert und die Membran mehrere Male mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Überprüfung der Transfereffizienz und der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde der Filter mit Methylenblau-Lösung für 2 min gefärbt und die ribosomale RNA durch sukzessives Entfärben mit 40 % Ethanol sichtbar gemacht (Herrin und Schmidt, 1988). Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Scanners oder einer Kamera festgehalten.

#### 5.1.7.5 Hybridisierung

Zur Hybridisierung (Khandjian, 1987) wurde eine Nylonmembran mit immobilisierten Nukleinsäuren mindestens  $\frac{1}{2}$  h bei 68 °C in einer Hybridisierungsröhre mit *QuikHyb Hybridization Solution* prähybridisiert. Eine radioaktiv markierte DNA-Probe (Kap. 5.1.5) wurde mit 200 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml) 10 min auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der DNA-Probe auf Eis wurden 1 bis  $1,5 \cdot 10^6$  cpm pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rollen für 1 bis 16 h bei 68 °C. Zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Probe wurde die Nylonmembran dreimal bei Raumtemperatur mit 1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und mindestens zweimal 15 min bei 60 °C mit 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS unter Kontrolle der Restaktivität auf dem Filter gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte mit einem Kodak X-OMAT AR-Film für 3 bis 48 h mit einer Verstärkerfolie bei -75 °C. Zur Quantifizierung der Signale wurde die Membran mit einem Storage Phosphor Screen exponiert und mit einem PhosphorImager SF (Programm ImageQuant) ausgewertet.

#### 5.1.8 Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit

Die Stabilität einer spezifischen mRNA wurde mit der *RNA synthesis inhibitor-chase method* (Egyhazi, 1974 und 1976, Sehgal und Tamm, 1978) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Inhibition der RNA-Transkription durch unterschiedliche Inhibitoren. Verwendet wurden Actinomycin D, das die gesamte RNA-Synthese in der Zelle durch Interkalierung in die DNA

blockiert und 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Benzimidazol (DRB), ein Analogon von Adenosin, das selektiv und reversibel die Synthese heterogener, nukleärer RNA, ein Vorläufer cytoplasmatischer mRNA, durch Blockierung der RNA-Polymerase II hemmt. Die Abbaugeschwindigkeit oder die Halbwertszeit einer mRNA kann dann durch Quantifizierung der Transkriptmenge über einen bestimmten Zeitraum hinweg bestimmt werden, da keine neue RNA synthetisiert wird. Dazu wurden subkonfluente Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit Actinomycin D oder DRB in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  (Kern et al. 1997) bzw. 20  $\mu\text{g/ml}$  (Nanbu und Nagamine, 1997) zur Inhibition der Transkription behandelt und 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten  $t = 0, 2, 4, 8$  und 24 h wurden die Zellen lysiert und die RNA wie unter Kapitel 5.1.7.1 beschrieben isoliert. Je 10  $\mu\text{g}$  der RNA nach DRB-Behandlung wurden mittels Northern Blot Hybridisierung mit der zu untersuchenden Sonde und nachfolgender Quantifizierung der Signalstärke im PhosphorImager untersucht und die Halbwertszeit der mRNA berechnet. Dazu wurden die Rohdaten in Abhängigkeit von der Dauer der Actinomycin D bzw. DRB-Behandlung halblogarithmisch in einem Diagramm aufgetragen und die exponentielle Regression  $N = N_0 \cdot e^{-I t}$  bestimmt (Microsoft EXCEL). Die Halbwertszeit wurden dann berechnet nach  $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{I}$ . Anschließend wurden die Halbwertszeiten der verschiedenen Versuche

gemittelt und die Standardabweichung  $s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 \cdot (\sum x)^2}{n \cdot (n-1)}}$  mit Hilfe von Microsoft EXCEL

berechnet.

## 5.1.9 Überprüfung von mRNA 3'-Enden mittels RT-PCR

### 5.1.9.1 DNase-Behandlung von Gesamt-RNA

Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA wurde zunächst eine DNase-Behandlung der RNA durchgeführt. Dazu wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus stabil transfizierten Zelllinien eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  in 40 mM Tris pH 7,5, 6mM  $\text{MgCl}_2$  unter Zugabe von 10 U DNase I für 30 min bei 37 °C. Zur Entfernung der DNase wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und 2 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die untere organische Phase mit dem gleichen Volumen  $\text{ddH}_2\text{O}$  reextrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt. Um Phenolreste zu entfernen, wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen

Chloroform versetzt und 2 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (obere wässrige Phase) wurde abgenommen und aufbewahrt. Die untere Phase wurde mit einem Volumenanteil ddH<sub>2</sub>O reextrahiert und zur Phasentrennung 2 min bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden beide Überstände vereinigt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat, pH 4 und 1 Volumen Isopropanol wurde die RNA mindestens 20 min bei -20 °C gelagert und anschließend für 15 min bei 10.000 x g und 4 °C präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 15 min zentrifugiert und getrocknet. Die RNA wurde in 20 µl ddH<sub>2</sub>O rückgelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.1.9.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Für die reverse Transkription nach Kotewicz et al., 1985 und 1988, von DNase-behandelter Gesamt-RNA aus transfizierten Zelllinien wurden jeweils drei Ansätze mit verschiedenen Oligonukleotiden H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C bzw. H-T<sub>11</sub>G hergestellt. Zunächst wurden 0,2 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 19 µl 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend für 10 min bei 37 °C äquilibriert. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit 0,2 µM Oligonukleotiden H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C oder H-T<sub>11</sub>G, 20 µM dNTPs, 25 mM Tris/HCl pH 8,3, 37,6 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT und 100 Units MMLV reverse Transkriptase für 50 min bei 37 °C. Durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

### 5.1.9.3 Spezifische Amplifikation des 3'-Endes

Die Amplifikation des 3'-Endes der rekombinanten Kaninchen β-Globin-Prothrombin-cDNA aus pCMVβ*Xho* bzw. pCMVβ*Xho*-mut erfolgte mittels PCR mit einem spezifischen β-Globin forward Primer P<sub>2</sub>I glo fw, der komplementär zu einer Sequenz 110 bis 90 bp vor der *Xho* I-Stelle des Vektors pCMVβ*Xho* ist, und einem entsprechend dem RT-PCR-Ansatz gewählten Oligo-dT-Primer H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>-C oder H-T<sub>11</sub>G. Für die PCR-Reaktion wurden 50 µl-Ansätze mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001 % (v/v) Gelatine, 200 µM dNTPs, je 0,2 µM forward und reverse Primer, 1 µl RT-Ansatz und 2,5 Units *Taq* DNA Polymerase.

#### Zyklusparameter:

- Denaturierung: 5 min bei 95 °C
- 40 Zyklen:

- Denaturierung: 1 min bei 94 °C
- Hybridisierung: 1 min bei 37 °C
- DNA-Synthese: 1 min bei 72 °C
- DNA-Synthese: 7 min bei 72 °C
- Kühlung bei 4 °C.

Je 10 µl PCR-Ansatz wurden auf einem 2 %igem analytischen Agarosegel überprüft und 1,5 µl PCR-Ansatz in die Ligation eingesetzt.

#### 5.1.9.4 TA-Klonierung und Sequenzierung der Fragmente

Für die Sequenzierung und damit Identifizierung der 3'-Prozessierung der rekombinanten Kaninchen  $\beta$ -Globin 3'-cDNA-Fragmente wurden die PCR-Ansätze zunächst in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 mittels TA-Klonierung inseriert. Der Vorteil einer TA-Klonierung besteht darin, dass keine weiteren Modifizierungen oder Restriktionen des PCR-Produktes notwendig sind und es damit direkt in die Ligation eingesetzt werden kann. Das Prinzip besteht darin, dass die *Taq*-Polymerase einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende von PCR-Produkten anheftet. Da der linearisierte Vektor an beiden Enden einzelne 3'-Desoxythymidinreste trägt, erlaubt dies die effiziente Ligation von Vektor und Insert. Die Ligationsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 6 mM Tris/HCl, pH 7,5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA (*bovine serum albumin*), 7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,1 mM ATP, 2 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin, 50 ng linearisiertem Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 und 1,5 µl PCR-Produkt für 72 h bei 14 °C. Anschließend wurden kompetente TOP10F'-Bakterienzellen mit je 2 µl Ligationsansatz transformiert (Kap. 5.1.3.1). Zur Selektion wurden die Zellen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurden Plasmid-Minipräparate hergestellt (Kap. 5.1.1.2). Da sich an beiden Seiten der Insertionsstelle des Vektors *EcoR* I-Stellen befinden, konnten positive Klone nach Restriktion der Plasmide mit *EcoR* I und Auftrennung der Restriktionsfragmente in einem analytischen Agarosegel identifiziert werden. Diese Klone wurden für eine anschließende automatische Sequenzierung mit dem Sequenzierautomaten *LI-COR DNA Sequencer 4200* oder bei der Firma *SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen* ausgewählt.

### 5.1.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

<b>Sequenzgel 66 cm, 0,2 mm:</b>	21,0 g	Urea
	5,0 ml	10 x TBE (Low Salt)
	5,8 ml	RapidGel XL 40 %
	30,0 ml	ddH <sub>2</sub> O
	200,0 µl	APS 10 %, frisch ansetzen
	50,0 µl	TEMED

<b>10 X TBE-Puffer (Low Salt):</b>	1340,0 mM	Tris
	450,0 mM	Borat
	25,0 mM	EDTA

**Laufpuffer:** 0,8 x TBE-Puffer (Low Salt)

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip der Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977) mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP*. Für jedes Plasmid wurden vier Sequenzreaktionen mit 0,2 µg Plasmid-DNA, 14,3 % (v/v) DMSO, 0,1 µM IRDye™700- oder IRDye™800-Farbstoff 5'-modifizierte Primer und unterschiedlichen Reaktionsgemischen mit den Didesoxynukleotiden ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP angesetzt. Diese vier Reaktionsansätze wurden einer PCR mit folgendem Temperaturprofil unterzogen:

- Denaturierung: 2 min bei 95 °C
- 30 Zyklen:
  - Denaturierung: 30 s bei 95 °C
  - Hybridisierung: 30 s bei 58 °C
  - DNA-Synthese: 1 min bei 68 °C
- Kühlung bei 4 °C.

Die Proben wurden anschließend mit 6 µl *Formamide loading dye* versetzt und je 1 µl PCR-Ansatz auf ein 66 cm langes, 0,2 mm dickes Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,8 x TBE (Low Salt). Die Elektrophorese erfolgte für 14 h bei 2800 V, 40 mA, 55 W und 45 °C in einem Sequenzierautomaten *LI-COR DNA Sequencer 4200*. Die Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte vollautomatisch durch Laserdetektion und nachfolgender Sequenzierung mit dem Computerprogramm *e-Seq*.

## 5.2 Sequenzrecherche und Datenbanken

Für die Sequenzrecherche wurden öffentlich zugängliche Datenbanken und Suchprogramme benutzt. Das Programm BLASTN (Altschul et al., 1997), zugänglich über die Internetseite

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), bietet Zugang zu den Datenbanken DDBJ, EMBL und GenBank (Tab. 7) und deckt damit einen Großteil der bekannten Sequenzen ab. Für das Einpflegen neuer Sequenzen in die Datenbank GenBank wurde das Programm BankIt, ebenfalls zugänglich über NCBI, verwendet.

**Tab. 7: Sequenzdatenbanken und Internetadressen.**

Datenbank	Lokalisation	Referenz	Internet-Adresse
DDBJ	DNA Databank of Japan, Mishima (Japan)	Tateno et al., 2000	<a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp">http://www.ddbj.nig.ac.jp</a>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg	Stoesser et al., 2001, 2002	<a href="http://www.embl-heidelberg.de">http://www.embl-heidelberg.de</a>
GenBank	GenBank at NCBI, National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA)	Benson et al., 2002	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

## 5.3 Zellkultur

### 5.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellkultivierung erfolgte unter aseptischen Bedingungen (Sterilbank) bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Es wurden sterile Einmalartikel und sterilisierte Glaswaren (8 h bei 200 °C) verwendet. Plastikmaterialien und Lösungen wurden 30 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert

#### Humane Endothelzellen (HUVEC)

**Medium:** Waymouth-Medium mit 20 % FCS, 1 % RDGF, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Humane umbilikale venöse Endothelzellen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Bernd Pötzsch nach der Methode von Jaffe (1973) isoliert. Der für die Kultivierung der Zellen notwendige RDGF (Retina derived growth factor) wurde ebenfalls in dieser Arbeitsgruppe nach Klagsburn (1987) präpariert. Die Zellen wurden auf gelatinebeschichteten Petrischalen kultiviert. Zur Beschichtung wurden die Schalen 2 h bei 4 °C mit einer 0,2 %igen Gelatinelösung (in 0,9 %iger NaCl-Lösung) inkubiert.

## Hepatozyten

**Medium:** M199-Medium mit 3 % FCS, 0,5 nM Insulin, 5 nM Dexamethason, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

**Waschmedium:**

10	mM	HEPES/NaOH, pH 7,35
144	mM	NaCl
4,8	mM	KCl
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	g/l	BSA

pH auf 7,35 einstellen, sterilfiltrieren.

**Präperfusionsmedium:**

120	mM	NaCl
4,8	mM	KCl
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
24,4	mM	NaHCO <sub>3</sub>
0,25	mM	EGTA

mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> begasen, pH 7,35

**Perfusionsmedium:**

5	mM	HEPES/NaOH, pH 7,35
120	mM	NaCl
4,8	mM	KCl
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
24,4	mM	NaHCO <sub>3</sub>
4	mM	CaCl <sub>2</sub>
380	mg/l	Collagenase

mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> begasen, pH 7,35

Die Präparation und Kultivierung von primären Hepatozyten aus männlichen Wistar-Ratten (Gewicht ca. 200 g) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Katz, Zentrum für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt. Die Isolierung der Hepatozyten (Seglen, 1973) nach Öffnung der Bauchhöhle erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, einer nicht-rezirkulierenden *in situ* Perfusion über eine Kanüle in der *vena portae* mit Präperfusionsmedium und einer rezirkulierenden *in situ* Perfusion über die *vena portae* mit Collagenase-haltigem Perfusionsmedium zum Auflösen des Zellverbandes. Dazu wurde das aus der Kanüle in der *vena cava inferior* austretende Perfusionsmedium über ein Schlauchsystem in ein Sammelgefäß zurückgeleitet und nach Oxygenierung und Temperierung auf 37 °C in die *vena portae* zur Leber zurückgeführt. Thorakal wurde die *vena cava inferior* durch eine Ligatur unterbunden und damit ein Rückfluss des Perfusionsmediums zum Herzen verhindert. Anschließend wurde die aufgequollene Leber aus dem Tier herauspräpariert, und die Zellen wurden aus dem Gewebeverband gespült. Bindegewebe und Kapselbestandteile wurden vorsichtig entfernt.

Die Zellsuspension wurde filtriert, um sie von Bindegewebsresten und Zellaggregaten zu befreien. Durch mehrfaches Waschen und Zentrifugieren (3 min bei 15 x g) wurden Nichtparenchymzellen und Zelltrümmer mit dem Überstand entfernt. Das Hepatozytensediment wurde im vierfachen Volumen Waschmedium aufgenommen und mit Medium M199, supplementiert mit 3 % FCS und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, im Verhältnis 1:15 verdünnt. Zur besseren Anheftung der Zellen in den Gewebekulturschalen enthielt das Medium während der ersten 4 h der Inkubation zusätzlich 5 nM Insulin und 50 nM Dexamethason. Jeweils 3 ml der Zellsuspension, was einer Menge von ca.  $2,5 \times 10^6$  Zellen entsprach, wurden in Gewebekulturschalen von 60 mm Durchmesser pipettiert. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel. Das Standardmedium enthielt eine geringere Konzentration an Insulin und Dexamethason von 0,5 nM bzw. 5 nM. DRB-Experimente wurden 16 bis 20 h nach Kulturbeginn durchgeführt.

### **Glatte Muskelzellen (SMC)**

**Medium:** M199 mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, Amphotericin.

Vaskuläre glatte Muskelzellen aus der Maus wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus T. Preissner isoliert (Kanse, 1995). Glatte Muskelzellen aus Schweineaorta wurden nach der Methode von Kubin et al., 2003, isoliert.

### **Medien für die Zellkultur**

**CCL-13-Zellen:** DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Streptomycin.

**CL-48-Zellen:** DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Streptomycin.

**COS-1-Zellen:** DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Streptomycin.

**HeLa-Zellen:** RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Streptomycin.

**HepG2-Zellen:** RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Streptomycin.

**SK-HEP-1-Zellen:** RPMI-Medium mit 20 % FCS (Anfangskultur 40 %), 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Streptomycin.

### 5.3.2 Zellpassage

**1 x HBS, pH 7,55:** 137 mM NaCl  
4 mM KCl  
11 mM Glucose  
10 mM HEPES  
pH 7,55 mit 1 M NaOH einstellen, sterilfiltrieren.

**Trypsin/EDTA:** 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,6  
5 mM EDTA  
0,720 % (v/v) NaCl  
0,005 % (v/v) Trypsin  
sterilfiltrieren.

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit 1 x HBS (37 °C) gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung 2 bis 5 min im Zellkulturschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inaktiviert. HUVEC und HepG2-Zellen wurden im Splittungsverhältnis 1:3 unter Zugabe von frischem Medium auf neue Schalen verteilt.

### 5.3.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

#### Einfrieren

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit 1 x HBS gewaschen, trypsiniert und mit FCS-haltigem Medium versetzt. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 500 x g (Beckman TJ-6) sedimentiert. Die Zellen einer 94 mm-Schale wurden in 1 ml Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und in ein steriles Einfrierröhrchen überführt. Die Einfrierröhrchen wurden zunächst auf 4 °C abgekühlt, 2 h bei -20 °C eingefroren und über Nacht bei -75 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden sie in flüssigem Stickstoff (-196 °C) bis zur Wiederverwendung aufbewahrt.

#### Auftauen

Die Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut, in eine Zellkulturschale mit 10 ml Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO zu entfernen.

### 5.3.4 *Mycoplasmen-Test*

Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf eine Infektion mit Mycoplasmen getestet. Dazu wurden die Zellen mindestens drei Tage in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Der Zellüberstand wurde dann mit dem Mycoplasma PCR ELISA-Test von *Boehringer Mannheim* nach dem Anwendungsprotokoll des Herstellers auf eine Kontamination mit Mycoplasmen untersucht.

## 5.4 Analyse regulatorischer Sequenzen mittels Luciferase-Reportergenkonstrukten

Die Untersuchung möglicher regulatorischer 5'- und 3'-Sequenzen des Prothrombingens erfolgte mittels transienter Transfektion verschiedener Reportergenkonstrukte in eukaryotische Zellen. Hierfür wurde der Plasmidvektor pGL3 Basic der Firma *Promega* verwendet. Dieser Vektor enthält Luciferase aus *Photinus pyralis* als Reportergen (Wood et al., 1984; de Wet et al., 1985 und 1987). Verschieden lange 5'- und 3'-PCR-Fragmente (Kap. 5.1.2.1) des Prothrombingens wurden kloniert und die Expression des Reporterplasmids als Lumineszenz-Signal in einem Luminometer bestimmt. Zur Normalisierung des Signals wurde gleichzeitig der Plasmidvektor pRL-TK transient cotransfiziert. Dieser Vektor kodiert für die Luciferase aus *Renilla reniformis* (Matthews et al., 1977), die im Vergleich zu der Luciferase aus *Photinus pyralis* unterschiedliche Substrate zur Katalisierung der Lumineszenz-Reaktion benötigt. Dies macht es möglich, beide Lumineszenzsignale in den Zellen sequentiell zu quantifizieren, wobei die *Renilla*-Luciferase als interne Kontrolle von Transfektionseffizienz, Aufschluss der Zellen und weiteren experimentell bedingten Variabilitäten dient.

### 5.4.1 *Transiente Transfektion*

**1 x PBS<sup>-</sup>, pH 7,4:**      3,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                 17,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                 145,0 mM NaCl  
                                 pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren.

HepG2- und HeLa-Zellen wurden mit dem Lipofectin-Reagenz (Felgner et al., 1987) transient transfiziert. Dazu wurden konfluente Zellen im Verhältnis 1:2 (HepG2-Zellen) bzw. 1:3 (HeLa-Zellen) auf 35 mm-Zellkulturschalen passagiert und für 3 bis 5 Tage bei HepG2-Zellen oder 24 h bei HeLa-Zellen bis zu einer Konfluenz von 50 bis 70 % kultiviert. Vor der

Transfektion wurden die Zellen mit antibiotikafreiem Medium (RPMI-Medium, versetzt mit 2 mM Glutamin) gewaschen. Der Einsatz von 3  $\mu$ l Lipofectin-Reagenz und die Cotransfektion von je 1  $\mu$ g pGL3 Basic-Reportergenplasmid und pRL-TK-Vektor erwiesen sich in Vorversuchen als optimal. Für die Transfektion wurden dementsprechend je 1  $\mu$ g Reporterplasmid und 1  $\mu$ g pRL-TK-Vektor mit 100  $\mu$ l Opti-MEM I-Medium gemischt. In einem zweiten Gefäß wurden 3  $\mu$ l Lipofectin-Reagenz mit 100  $\mu$ l Opti-MEM I-Medium 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden Lipofectin-Gemisch und Plasmidverdünnung vermischt, weiterhin 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 0,8 ml antibiotikafreiem Medium versetzt und auf die Zellen pipettiert. Nach 7 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium (RPMI-Medium, 10 % FCS, 2 mM Glutamin) ersetzt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 0,5 ml PLB-Lysepuffer nach Angaben des Herstellers lysiert. Die Zelllysate wurden bis zur Bestimmung der Reportergenaktivität im Luminometer bei -75 °C aufbewahrt. Alternativ wurden transient transfizierte Zellen zur Bestimmung der Reportergen-mRNA-Halbwertszeit (Kap. 5.1.8) mit nachfolgender Northern Blot Analyse (Kap. 5.1.7) eingesetzt. Hierfür wurden  $\beta$ -Globin-Reportergenkonstrukte und zur Normalisierung der Vektor pRL-TK eingesetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte nach DRB-Behandlung mit Trireagenz.

#### **5.4.2 Bestimmung der Genexpression des Luciferase-Reporters**

Die Quantifizierung der Lumineszenzsignale wurde mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* im Luminometer durchgeführt. Dazu wurden im Luminometer zu 20  $\mu$ l Zelllysate aus Kap. 5.4.1 zunächst 100  $\mu$ l Luciferase Assay Reagent II zur Messung der *Photinus*-Luciferaseaktivität injiziert. Die Messung erfolgte über ein Intervall von 10 s. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wurden direkt im Anschluss an die erste Messung weitere 100  $\mu$ l Stop & Glo Reagent injiziert. Dieses Reagenz stoppt die Lumineszenz des Reporters und aktiviert gleichzeitig die *Renilla*-Luciferase. Nach Quantifizierung der *Renilla*-Luciferaseaktivität über ein Intervall von 10 s, wurde ein von der Transfektionseffizienz unabhängiger, relativer Wert des Luciferase-Reporters berechnet.

## 5.5 Stabile Expression von Reportergenkonstrukten in eukaryotischen Zellen

Für die stabile Transfektion von Reportergenplasmiden wurden verschiedene Methoden optimiert, um eine möglichst gute Transfektionseffizienz zu erreichen. Benutzt wurden die Elektroporationsmethode (Wong und Neumann, 1982; Neumann et al., 1982; Potter et al., 1984), das FuGENE 6 Transfection Reagent und das Lipofectin-Reagenz. Für stabile Transfektionen wurden Plasmide Endotoxin-frei präpariert (Kap. 5.1.1.3). Vor der Transfektion wurden Reportergenplasmide durch eine präparative Restriktion (Kap. 5.1.1.5.1) linearisiert und die Restriktionsansätze durch Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Fällung (Kap. 5.1.2.5 und Kap. 5.1.2.6) gereinigt. Für die Selektion wurden Plasmide mit Neomycinresistenzgen entweder cotransfiziert oder es wurden Expressionsvektoren mit Neomycinresistenzgen verwendet. Selektioniert wurde in Medium mit Zusatz von 0,3 bis 1,5 mg/ml G418.

### 5.5.1 Stabile Transfektion mittels Elektroporation

Rekombinante Kaninchen  $\beta$ -Globin-Reportergenkonstrukte wurden für die Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit stabil in HepG2-Zellen transfiziert. Dazu wurde der Selektionsvektor pSV2neo, der eukaryotischen Zellen eine Neomycin-Resistenz vermittelt, cotransfiziert. HepG2-Zellen wurden in der logarithmischen Phase geerntet (50 - 70 % Konfluenz), zweimal mit HBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (Kap. 5.3.2) überschichtet. Nach 2 bis 3 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Trypsin durch Zugabe von HBS inaktiviert und die Zellzahl im Cell Counter bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension pelletiert (4 min bei 500 x g), nochmals mit HBS gewaschen und eine Zellzahl von  $1,4 \cdot 10^7$  mit HBS eingestellt. Pro Elektroporationsansatz wurden 500  $\mu$ l Zellsuspension (entspricht  $7 \cdot 10^6$  Zellen) mit 2  $\mu$ g pSV2neo-Plasmid und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Globin-Reporterkonstrukt (Verhältnis 1:10) gemischt, in eine 0,4 cm-Elektroporationsküvette pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Elektroporation bei 260 V und 960  $\mu$ F wurde das Zell-DNA-Gemisch nochmals gemischt. Nach Anlegen eines elektrischen Impulses betrug die Zeitkonstante  $\tau$  im Idealfall 34 ms. Die Zellen wurden erneut 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, in 10 ml RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin und Penicillin-Streptomycin resuspendiert und in einer 100 mm-Zellkulturschale bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen 1:4 passagiert und bis zur Ausbildung von singulären Klonen in

Selektionsmedium (1,5 mg/ml G418) kultiviert. Anschließend wurden 60 bis 500 Klone gepoolt und die so entstandenen Zelllinien unter Selektionsdruck weiter kultiviert.

### **5.5.2 Stabile Transfektion mit FuGENE 6**

Zusätzlich zu der Elektroporationsmethode wurden HepG2-Zellen mit  $\beta$ -Globin-Reporterkonstrukte und SV2neo mittels FuGENE 6-Reagenz cotransfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden 9  $\mu$ l FuGENE 6-Reagenz direkt in 91  $\mu$ l serumfreies Medium (RPMI-Medium mit 2 mM Glutamin) pipettiert, worauf sich eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur anschloß. Diese Lösung wurde tropfenweise in eine DNA-Lösung aus 5  $\mu$ g Reporterkonstrukt und 0,5  $\mu$ g Selektionsplasmid pSV2neo pipettiert, das Transfektionsgemisch weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 in Selektionsmedium (RPMI-Medium mit 1 mg/ml G418, 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 40 U/ml Penicillin, 40  $\mu$ g/ml Streptomycin) gesplittet, zwischen 60 und 200 Klone vereinigt und die Zellen weiterhin unter Selektion mit G418-haltigem Medium kultiviert.

### **5.5.3 Stabile Transfektion mit Lipofectin**

Für die stabile Transfektion von HepG2- und COS-1-Zellen mit der rekombinanten Prothrombin-cDNA wurde der Säugerexpressionsvektor pcDNA3 verwendet. Da dieser Vektor das Neomycin-Resistenzgen trägt war keine Cotransfektion notwendig. Für die Transfektion wurden 10  $\mu$ l Lipofectin-Reagenz mit 100  $\mu$ l Opti-MEM I-Medium 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2  $\mu$ g linearisierter Plasmid-DNA (Restriktion mit *Ssp* I), verdünnt in 100  $\mu$ l Opti-MEM I-Medium, gemischt. Nach 15 min wurden 1,8 ml serumfreies RPMI- oder DMEM-Medium, supplementiert mit 2 mM Glutamin, zu dem Lipofectin-DNA-Gemisch pipettiert und subkonfluente Zellen in 60 mm-Zellkulturschalen damit überschichtet. 16 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden weitere 24 h mit RPMI- bzw. DMEM-Vollmedium, inklusive 10 % FCS und 2 mM Glutamin, kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 1:4 in 100 mm-Zellkulturschalen passagiert und bis zur Ausbildung singulärer Klone unter Zusatz von 0,8 mg/ml Neomycin (G418) selektioniert. 500 bis 2000 Klone wurden vereinigt und die so entstandenen Zellpopulationen unter Selektionsmedium für Northern Blot und Western Blot Analysen weiter kultiviert.

## 5.6 Proteinanalytische Methoden

### 5.6.1 Lyse von Säugerzellen mit RIPA-Puffer

<b>RIPA-Puffer:</b>	20	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150	mM	NaCl
	1,0	% (v/v)	Nonidet P-40
	0,5	% (w/v)	Natriumdeoxycholat
	1	x	Complete™ Proteasen-Inhibitoren-Cocktail.

Konfluente HepG2- oder HUVEC-Zellen wurden je einmal mit HBS (Kap. 5.3.2) und PBS<sup>-</sup> (Kap. 5.4.1) gewaschen, mit RIPA-Puffer überschichtet und 30 min bei 4 °C geschüttelt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Lysate von der Kulturschale (Ø 94 mm oder Ø 145 mm) abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C wurde der Überstand aliquotiert und bis zur Verwendung bei -75 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry (1951) mit Hilfe eines von der Firma *Pierce* erhältlichen Tests.

### 5.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

<b>BSA-Standardlösungen</b>	0,025 µg/µl, 0,05 µg/µl, 0,1 µg/µl, 0,15 µg/µl und 0,2 µg/µl BSA in 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
<b>Pierce-Reagenz:</b>	1:50 BCA Protein Assay Reagenz B in BCA Protein Assay Reagenz A

Der Proteingehalt der Probe wurde bestimmt, indem 20 µl einer geeigneten Verdünnung in einer ELISA-Platte mit 200 µl Pierce-Reagenz versetzt und nach 30 min Inkubation bei 37 °C die Extinktion bei 550 nm gegen einen Leerwert gemessen wurde. Anschließend wurde die Konzentration anhand der durch die Standardwerte definierten Eichgeraden berechnet.

### 5.6.3 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

<b>6 x SDS-Auftragspuffer:</b>	0,35	M	Tris/HCl, pH 6,8
	10,28	% (w/v)	SDS
	36	% (v/v)	Glycerin
	0,6	M	DTT
	0,012	% (w/v)	Bromphenolblau

Eine 10 µg entsprechende Menge Säugerzelllysate wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und mit 4 µl 6 x SDS-Auftragspuffer versetzt. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteinproben für 10 min bei 96 °C erhitzt.

### 5.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

**1 x SDS-Laufpuffer:**

50	mM	Tris
384	mM	Glycin
0,2	% (w/v)	SDS

**Rotiphorese Gel 30:**

30	% (w/v)	Acrylamid
0,8	% (w/v)	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid

#### Pipettierschema für 2 Minigele:

Acrylamid	Trenngel			Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	5 %
ddH <sub>2</sub> O	4,5 ml	3,85 ml	3,2 ml	5,65 ml
Rotiphorese Gel 30	2,7 ml	3,35 ml	4,0 ml	1,65 ml
3 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	2,4 ml
50 % (v/v) Glycerin	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl	200 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden Trenngel zwischen 8 % und 12 % Acrylamid gewählt. Die Größe der Gele betrug 90 mm x 60 mm x 0,75 mm. Zur Herstellung des Gels wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser mit Filterpapier abgesaugt, das Sammelgel gegossen und der Kamm gesteckt. Nach 30 min wurde das Gel in die Apparatur (Protean II-Minigelapparatur) eingesetzt, mit SDS-Laufpuffer überschichtet, und die Proteinproben wurden in die gespülten Geltaschen aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein Standard gefärbter Proteine definierter Größe mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte 1 ½ bis 2 ½ h bei einer konstanten Spannung von 100 V bis zum Auslaufen der Bromphenolblaubande des Auftragspuffers.

### 5.6.5 Western Blot Analyse

Für immunologische Nachweisverfahren wurden die Proteine mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die spezifische Erkennung des jeweiligen Proteins erfolgte durch einen Primärantikörper, an den ein POD-gekoppelter Sekundärantikörper bindet. Zur Immunodetektion wurde das ECL-System verwendet. Die ECL-Detektionsreagenzien enthalten Luminol. Durch die von der Wasserstoffperoxidase katalysierte Oxidation von Luminol gelangen Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Übergang der Elektronen in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie in Form von Licht abgestrahlt. Durch Emissionsverstärker kann das Signal auf einem Film (X-OMAT AR) sichtbar gemacht werden.

#### 5.6.5.1 Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran

<b>Blotpuffer:</b>	20	mM	Tris
	216	mM	Glycin
	20	% (v/v)	Methanol

Für den Elektrotransfer wurden in einer Gelkassette luftblasenfrei ein Fiberglaspolster, zwei Lagen Filterpapier, die mit Blotpuffer benetzte Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel, zwei Lagen Filterpapier und ein weiteres Fiberglaspolster übereinander geschichtet. Die Kassette wurde verschlossen, zusammen mit einem Kühlaggregat in die Blotzelle eingesetzt und mit Blotpuffer überschichtet. Der Transfer erfolgte unter Kühlung bei 100 V über eine Zeitdauer von 1 ½ h. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung (1:5 verdünnt in PBS) sichtbar gemacht und zur weiteren Auswertung fotokopiert. Die Membran wurde dann durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wieder entfärbt.

#### 5.6.5.2 Immunodetektion von Proteinen

<b>1 x PBS, pH 7,3:</b>	140,0	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10,1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran in 10 % Magermilch (w/v) in 1 x PBS bei Säugerzelllysaten bei 4 °C über Nacht inkubiert. Vor Zugabe des Primärantikörpers wurden die in Magermilch blockierten Membranen einmal mit 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration

---

von 1:500 bis 1:10000 in 0,1 % Tween/PBS zugesetzt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rollinkubator inkubiert. Nach 4 bis 5 Waschschritten in 0,1 % Tween/PBS wurde der Sekundärantikörper zugegeben (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, POD-gekoppelt: 1:10000; Kaninchen-anti-Maus-IgG, POD-gekoppelt: 1:5000) und ½ h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde 4-5-mal mit 0,1 % Tween/PBS und einmal mit PBS gewaschen. Die beiden ECL-Detektionsreagenzien wurden 1:1 gemischt (je 2,5 ml) und die Membran 1 min darin geschüttelt. Die Membran wurde luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette fixiert. Die Belegung des Blots mit einem Kodak X-OMAT AR-Film erfolgte in der Dunkelkammer je nach Stärke des Signals für 1 s bis 30 min.

## 6 Zusammenfassung

Der G20210A-Polymorphismus im humanen Prothrombingen liegt in der 3'-UTR der mRNA und betrifft das letzte Nukleotid. Die Mutation führt bei Patienten zu einer erhöhten Plasma-Prothrombinkonzentration und zu einer verstärkten Thromboseneigung. Das Thromboserisiko ist für diese Patienten 1,3- bis 6,6-fach erhöht. Die Mutation beeinflusst aufgrund ihrer Lage nicht die Struktur des Proteins. Deshalb wurde postuliert, dass die erhöhte Prothrombinkonzentration bei betroffenen Patienten durch eine verlängerte Halbwertszeit der Prothrombin-mRNA, durch eine verbesserte Transkriptions-, Translations- oder Polyadenylierungseffizienz verursacht wird. Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus ist Voraussetzung für die Entwicklung von therapeutischen Strategien.

Zur Untersuchung der Hypothese der mutationsbedingten höheren Stabilität der Prothrombin-mRNA wurden sowohl Wildtyp als auch 20210A 3'-Prothrombinbereich mit 97 bp 3'-UTR und 143 bp 3'-flankierende Region vor das 3'-Poly A-Signal eines  $\beta$ -Globinreporterplasmids inseriert. Dieses Vektorsystem ermöglicht aufgrund der hohen Halbwertszeit der Globin-mRNA die Messung des Einflusses der 3'-Prothrombinregion auf die Stabilität der Reporter-mRNA. Die G20210A-Mutation an der Polyadenylierungsstelle des Prothrombingens führte in  $\beta$ -Globinexpressionsstudien und bei rekombinanter Expression in verschiedenen Zelllinien nicht zu einer veränderten Halbwertszeit im Vergleich zur Wildtyp-mRNA. Sowohl die endogene Prothrombin-mRNA als auch  $\beta$ -Globin-Prothrombin-Hybride wiesen eine hohe Halbwertszeit von 17 bis 50 h in primären Leberzellen und verschiedenen Zelllinien auf. Dabei war die Stabilität der mRNA abhängig von der Art der verwendeten Konstrukte und vom Differenzierungsstatus der Zellen.

Die Polyadenylierung erfolgte bei den  $\beta$ -Globinkonstrukten nicht an der Poly A-Stelle der Prothrombin 3'-Region, sondern ausschließlich an der stromabwärts gelegenen Poly A-Stelle des Reporterplasmids. Nach Exzision der Vektor-Poly A-Stelle war eine unvollständige Prozessierung zu beobachten. Diese Daten weisen auf ein schwaches Polyadenylierungssignal oder auf fehlende *cis*-regulatorische Elemente in der 3'-Prothrombinregion hin. Die Verlängerung der 3'-flankierenden Prothrombinregion führte zur Reduzierung der Transkriptzahl auf zwei Transkripte, von denen das kleinere vermutlich die korrekt an Position 20210 polyadenylierte mRNA, das größere dagegen die Prä-mRNA oder ein inkorrekt prozessiertes Transkript repräsentierten. Demnach enthält die erweiterte 3'-

---

flankierende Region zusätzliche regulatorische Elemente, die jedoch nicht zu einer 100 %igen Polyadenylierung führen.

Der Vergleich von Wildtyp- und 20210A-Transkriptmengen zeigte bei  $\beta$ -Globinreportersystemen und bei rekombinanter mRNA einen erhöhten Anteil an polyadenylierter mRNA bei der Mutante. Diese Verschiebung zugunsten der korrekt prozessierten und damit für die anschließende Translation funktionellen mRNA führte bei Überexpression der mutierten Variante zu einer gegenüber dem Wildtyp 4-fach erhöhten Proteinkonzentration. Die Insertion der verlängerten 3'-Prothrombinregion in ein Luciferasereportersystem führte in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Befunden bei der Mutante zu einer erhöhten Luciferaseaktivität.

Alle Daten sprechen dafür, dass der erhöhte Prothrombinplasmaspiegel bei Patienten mit der G20210A-Transition im Prothrombingen durch eine verbesserte Polyadenylierungseffizienz der Prä-mRNA hervorgerufen wird. Der damit verbundene Anstieg der Prothrombin-mRNA-Menge könnte bei Patienten zu einer vermehrten Translation und Proteinbildung führen. Diese Befunde stimmen mit dem bei Mutationsträgern erhöhten Plasmagehalt an Prothrombin überein. Die weitere Untersuchung der beteiligten *cis*-regulatorischen Sequenzelemente und der daran bindenden Faktoren könnte zu einem besseren Verständnis von Mutationen in der 3'-untranslatierten Region weiterer Gene führen, die eine Erhöhung der mRNA-Menge zur Folge haben und als Grundlage für zukünftige Therapien dienen.

## 7 Abkürzungen und Symbole

### A

A	Adenin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>AU-rich element</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat

### B

Bis	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid
bp	Basenpaare ( <i>base pairs</i> )
BSA	<i>bovine serum albumin</i>

### C

c	Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
C/EBP	<i>CCAAT enhancer binding protein</i>
CIP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
CMV	Cytomegalovirus
CTP	Cytidin-5'-triphosphat

### D

$\emptyset$	Durchmesser
Da	Dalton
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidintriphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
ddTTP	2',3'-Dideoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRB	5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Benzimidazol
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol

### E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure

---

EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>
EtBr	Ethidiumbromid
<b>F</b>	
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
<b>G</b>	
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<b>H</b>	
h	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HNF-1	<i>hepatocyte-specific nuclear factor-1</i>
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
<b>I</b>	
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid
<b>K</b>	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
kV	Kilovolt
<b>L</b>	
l	Liter
$\lambda$	Wellenlänge
LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithiumacetat
<b>M</b>	
m	Meter
M	Molar [mol/l]
mA	Milliampere
MCS	Polylinkerregion ( <i>multiple cloning site</i> )
$\mu$ F	Mikrofarad
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter

---

mM	Millimolar [Millimol/l]
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
<b>N</b>	
Na	Natrium
Natriumdeoxycholat	Deoxycholsäure Natriumsalz (3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -Cholansäure Natriumsalz)
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<b>O</b>	
OD	Optische Dichte (Absorption)
<i>ori</i>	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
<b>P</b>	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RDGF	Retina derived growth factor
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
POD	Peroxydase
<b>R</b>	
REMSA	<i>RNA Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Reverse Transkription
<b>S</b>	
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>T</b>	
t	Zeit
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA

---

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
Tween	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)

**U**

U	Einheiten ( <i>units</i> )
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

**V**

V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vol.	Volumen

**W**

w/v	Gewichtsprozent
-----	-----------------

## 8 Literaturverzeichnis

- Aden D. P.**, Fogel A, Plotkin S., Damjanov I. und Knowles B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.  
Nature 283: 615-616
- Altschul S. F.**, Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.  
Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402
- Alwine J. C.** (1985): Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins.  
Mol. Cell. Biol. 5: 1034-1042
- Arhin G. K.**, Boots M., Bagga P. S., Milcarek C. und Wilusz J. (2002): Downstream sequence elements with different affinities for the hnRNP H/H' protein influence the processing efficiency of mammalian polyadenylation signals.  
Nucleic Acids Res. 30: 1842-1850
- Arruda V. R.**, Annichino-Bizzacchi J. M., Goncalves M. S. und Costa F. F. (1997): Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease.  
Thromb. Haemost. 78: 1430-1433
- Bachmann F.** (1994): Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin. Aus Bloo A. L., Forbes C. D., Thomas D. P. und Tuddenham E. G. D. (eds.): Haemostasis and Thrombosis  
3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone: 576-613
- Baker T. K.**, Carfagna M. A., Gao H., Dow E. R., Li Q., Searfoss G. H. und Ryan T. P. (2001): Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes.  
Chem. Res. Toxicol. 14: 1218-1231
- Bancroft J. D.**, Schaefer L. A. und Degen S. J. F. (1990): Characterization of the Alu-rich 5'-flanking region of the human prothrombin-encoding gene: identification of a positive cis-acting element that regulates liver-specific expression.  
Gene 95: 253-260
- Bancroft J. D.**, McDowell S. A. und Degen S. J. F. (1992): The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells.  
Biochemistry 31: 12469-12476
- Banfield D. K.** und MacGillivray R. T. A. (1992): Partial characterization of vertebrate prothrombin cDNAs: amplification and sequence analysis of the B chain of thrombin from nine different species.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2779-2783
- Barnhart M. I.** (1960): Cellular site for prothrombin synthesis.  
Am. J. Physiol. 199: 360-366
- Bashirullah A.**, Cooperstock R. L. und Lipshitz H. D. (2001): Spatial and temporal control of RNA stability.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7025-7028
- Baumhueter S.**, Courtois G. und Crabtree G. R. (1988): A variant nuclear protein in dedifferentiated hepatoma cells binds to the same functional sequences in the beta fibrinogen gene promoter as HNF-1.  
EMBO J. 7: 2485-2493
- Beelman C. A.** und Parker R. (1994): Differential effects of translational inhibition *in cis* and *in trans* on the decay of the unstable yeast *MFA2* mRNA.  
J. Biol. Chem. 269: 9687-9692

- Beelman** C. A. und Parker R. (1995): Degradation of mRNA in Eukaryotes.  
Cell 81: 179-183
- Benson** D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Rapp B. A. und Wheeler D. L. (2002): GenBank.  
Nucleic Acids Res. 30: 17-20
- Bernstein** P. L., Herrick D. J., Prokipcak R. D. und Ross J. (1992): Control of c-myc mRNA half-life *in vitro* by a protein capable of binding to a coding region stability determinant.  
Genes Dev. 6: 642-654
- Bertina** R. M., Koelemann B. P. C., Koster T., Rosendaal F. R., Dirven R. J., de Ronde H., van der Velden P. A. und Reitsma P. H. (1994): Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.  
Nature 369: 64-67
- Binder** R., Horowitz J. A., Basilion J. P., Koeller D. M., Klausner R. D. und Harford J. B. (1994): Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening.  
EMBO J. 13: 1969-1980
- Birnboim** H. C. und Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523
- Birnboim** H. C. (1983): A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.  
Meth. Enzymol. 100: 243-255
- Bouvet** P. und Wolffe A. P. (1994): A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes.  
Cell 77: 931-941
- Briginshaw** G. F. und Shanberge J. N. (1974): Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification.  
Thromb. Res. 4: 683-690
- Brown** B. D., Zipkin I. D. und Harland R. M. (1993): Sequence-specific endonucleolytic cleavage and protection of mRNA in *Xenopus* and *Drosophila*.  
Genes Dev. 7: 1620-1631
- Brown** K., Luddington R., Williamson D., Baker P. und Baglin T. (1997): Risk of venous thromboembolism with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene.  
Br. J. Haematol. 98: 907-909
- Brown** C. E. und Sachs A. B. (1998): Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation.  
Mol. Cell. Biol. 18: 6548-6559
- Broze** G. J. Jr. und Miletich J. P. (1987): Characterization of the inhibition of tissue factor in serum.  
Blood 69: 150-155
- Broze** G. J. Jr. (1994): The tissue factor pathway of coagulation: factor VII, tissue factor, and tissue factor pathway inhibitor. Aus Bloom A. L., Forbes C. D., Thomas D. P. und Tuddenham E. G. D. (eds.): Haemostasis and Thrombosis.  
Edinburgh, Churchill Livingstone: 349-377
- Burkard** K. T. und Butler J. S. (2000): A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p.  
Mol. Cell. Biol. 20: 604-616
- Butkowski** R. J., Elion J., Downing M. R. und Mann K. G. (1977): Primary structure of human prothrombin 2 and  $\alpha$ -thrombin.

- J. Biol. Chem. 252: 4942-4957
- Capco D. G.**, Wan K. M. und Penman S. (1982): The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition.  
Cell 29: 847-858
- Carter A. M.**, Sachchithananthan M., Stasinopoulos S., Maurer F. und Medcalf R. L. (2002): Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism.  
Thromb. Haemost. 87: 846-853
- Chen C. Y.** und Shyu A. B. (1995): AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.  
Trends Biochem. Sci. 20: 465-470
- Chen F.**, MacDonald C. C. und Wilusz J. (1995): Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal.  
Nucleic Acids Res. 23: 2614-2620
- Chen Z.**, Li Y. und Krug R. M. (1999): Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery.  
EMBO J. 18: 2273-2283
- Chomczynski P.** und Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
Anal. Biochem. 162: 156-159
- Chou Z. F.**, Chen F. und Wilusz J. (1994): Sequence and position requirements for uridylate-rich downstream elements of polyadenylation signals.  
Nucleic Acids Res. 22: 2525-2531
- Chow B. K.-C.**, Ting V., Tufaro F. und MacGillivray R. T. A. (1991): Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene.  
J. Biol. Chem. 266: 18927-18933
- Cohen S. N.**, Chang A. X. Y. und Hsu L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114
- Colgan D. F.** und Manley J. L. (1997): Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation.  
Genes Dev. 11: 2755-2766
- Conne B.**, Stutz A. und Vassalli J. D. (2000): The 3' untranslated region of messenger RNA: a molecular 'hotspot' for pathology?  
Nat. Med. 6: 637-641
- Courtois G.**, Baumhueter S. und Crabtree G. R. (1988): Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7937-7994
- Craig A. W. B.**, Haghghat A. und Yu A. T. K. (1998): Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation.  
Nature 392: 520-523
- Culbertson M. R.** (1999): RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer.  
Trends Genet. 15: 74-80
- Cumming A. M.**, Keeney S., Salden A., Bhavnani M., Shwe K. H. und Hay C. R. (1997): The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a U.K. anticoagulant clinic population.  
Br. J. Haematol. 98: 353-355
- Czaplinski K.**, Ruiz-Echevarria M. J., Gonzalez C. I. und Peltz S. W. (1999): Should we kill the messenger? The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover.

- Bioessays 21: 685-696
- Dagert M.** und Ehrlich S. D. (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.  
Gene 6: 23-28
- Davie E. W.**, Fujikawa K. und Kisiel W. (1991): The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation.  
Biochemistry 30: 10363-10370
- Decker C. J.** und Parker R. (1993): A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation.  
Genes Dev. 7: 1632-1643
- Degen S. J.**, Mac Gillivray R. T. und Davie E. W. (1983): Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin.  
Biochemistry 22: 2087-2097
- Degen S. J. F.** und Davie E. W. (1987): Nucleotide Sequence of the Gene for Human Prothrombin.  
Biochemistry 26: 6165-6177
- Degen S. J. F.** (1992): The prothrombin gene and its liver-specific expression.  
Semin. Thromb. Haemost. 18: 230-242
- Degen S. J. F.** und Sun W. Y. (1998): The biology of prothrombin.  
Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 8: 203-224
- Dehlin E.**, Wormington M., Korner C. G. und Wahle E. (2000): Cap-dependent deadenylation of mRNA.  
EMBO J. 19: 1079-1086
- Dempsey L. A.**, Hanakahi L. A. und Maizels N. (1998a): A specific isoform of hnRNP D interacts with DNA in the LR1 heterodimer: canonical RNA binding motifs in a sequence-specific duplex DNA binding protein.  
J. Biol. Chem. 273: 29224-29229
- Dempsey L. A.**, Li M. J., DePace A., Bray-Ward P. und Maizels N. (1998b): The human HNRNPD locus maps to 4q21 and encodes a highly conserved protein.  
Genomics 49: 378-384
- de Vries H.**, Rügsegger U., Hubner W., Friedlein A., Langen H. und Keller W. (2000): Human pre-mRNA cleavage factor II(m) contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors.  
EMBO J. 19: 5895-5904
- De Wet J. R.**, Wood K. V., Helinski D. R., DeLuca M. (1985): Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7870-7873
- De Wet J. R.**, Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R. und Subramani S. (1987): Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells.  
Mol. Cell. Biol. 7: 725-737
- Dihanich M.**, Kaser M., Reinhard E., Cunningham D. und Monard D. (1991): Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system.  
Neuron 6: 575-581
- DiScipio R. G.**, Hermodson M. A., Yates S. G. und Davie E. W. (1977): A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S.  
Biochemistry 16: 698-706
- DiSimone V.** und Cortese R. (1992): Transcription factors and liver-specific genes.  
Biochim. Biophys. Acta 1132: 119-126

- Dower W. J., Miller J. F. und Ragsdale C. W. (1988):** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.  
Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145
- Edwards-Gilbert G., Veraldi K. L. und Milcarek C. (1997):** Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end?  
Nucleic Acids Res. 25: 2547-2561
- Egyhazi E. (1974):** Actinomycin D and RNA transport.  
Nature 250: 221-223
- Egyhazi E. (1976):** Initiation inhibition and reinitiation of the synthesis of heterogenous nuclear RNA in living cells.  
Nature 262: 319-321
- Esmon C. T. und Jackson C. M. (1974):** The conversion of prothrombin to thrombin. IV. The function of the fragment 2 region during activation in the presence of factor V.  
J. Biol. Chem. 249: 7791-7797
- Esmon C. T. (1983):** Protein C: Biochemistry, physiology, and clinical implications.  
Blood 62: 1155-1158
- Fair D. S. und Bahnak B. R. (1984):** Human hepatoma cells secrete single chain factor X, prothrombin, and antithrombin III.  
Blood 64: 194-204
- Fan X. C. und Steitz J. A. (1998a):** Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the *in vivo* stability of ARE-containing mRNAs.  
EMBO J. 17: 3448-3460
- Fan X. C. und Steitz J. A. (1998b):** HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15293-15298
- Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1983):** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.  
Anal. Biochem. 132: 6-13
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987):** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417
- Fenton J. W., Olson T. A., Zabinski M. P., und Wilner G. D. (1988):** Anion-binding exosite of human  $\alpha$ -thrombin and fibrin(ogen) recognition.  
Biochemistry 27: 7106-7112
- Ferraresi P., Marchetti G., Legnani C., Cavallari E., Castoldi E., Mascoli F., Ardissino D., Palareti G. und Bernardi F. (1997):** The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease.  
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 2418-2422
- Fogh J., Fogh J. M. und Orfeo T. (1977):** One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.  
J. Natl. Cancer Inst. 59(1): 221-226
- Ford L. P., Watson J., Keene J. D. und Wilusz J. (1999):** ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel *in vitro* mRNA deadenylation/degradation system.  
Genes Dev. 13: 188-201
- Frain M., Swart G., Monaci P., Nicosia A., Stampfli S., Frank R. und Cortese R. (1989):** The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain.

Cell 59: 145-157

- Furie B.** und **Furie B. C.** (1992): Molecular and cellular biology of blood coagulation. N. Engl. J. Med. 326: 800-806
- Gallouzi I. E., Brennan C. M., Stenberg M. G., Swanson M. S., Eversole A., Maizels N. und Steitz J. A.** (2000): HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3073-3078
- Gao M., Fritz D. T., Ford L. P. und Wilusz J.** (2000): Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates *in vitro*. Mol. Cell 5: 479-488
- Gao M., Wilusz C. J., Peltz S. W. und Wilusz J.** (2001): A novel mRNA decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. EMBO J. 20: 1134-1143
- Gehring N. H., Frede U., Neu-Yilik G., Hundsdoerfer P., Vetter B., Hentze M. W. und Kulozik A. E.** (2001): Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. Nat. Genet. 28: 389-392
- Gey G. O., Coffman W. D. und Kubicek M. T.** (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res. 12: 264-265
- Gingras A. C., Raught B. und Sonenberg N.** (1999): eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu. Rev. Biochem. 68: 913-963
- Glazner G. W., Yadav K., Fitzgerald S., Coven E., Brennehan D. E. und Nelson P. G.** (1997): Cholinergic stimulation increases thrombin activity and gene expression in cultured mouse muscle. Dev. Brain Res. 99: 148-154
- Gluzman Y.** (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23: 175-182
- Good P. J.** (1995): A conserved family of elav-like genes in vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4557-4561
- Gouble A. und Morello D.** (2000): Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development. Oncogene 19: 5377-5384
- Grabowski P. J. und Black D. L.** (2001): Alternative RNA splicing in the nervous system. Prog. Neurobiol. 65: 289-308
- Grzybowska E. A., Wilczynska A. und Siedlecki J. A.** (2001): Regulatory functions of 3'UTRs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 291-295
- Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. J. Mol. Biol. 166: 557-580
- Hardison R. C., Butler E. T. III., Lacy E., Maniatis T., Rosenthal N. und Efstratiadis A.** (1979): The structure and transcription of four linked rabbit beta-like globin genes. Cell 18: 1285-1297
- Heffelfinger S. C., Hawkins H. H., Barrish J., Taylor L. und Darlington G. J.** (1992): SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. In Vitro Cell Dev. Biol. 28A(2): 136-142
- Herrin D. L. und Schmidt G. W.** (1988): Rapid, reversible staining of Northern blots prior to hybridization.

BioTechniques 6: 196-200

- Hilleren P.** und Parker R. (1999): Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes.  
Annu. Rev. Genet. 33: 229-260
- Honigwachs J.**, Faktor O., Dikstein R., Shaul Y. und Laub O. (1989): Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer.  
J. Virol. 63: 919-924
- Hung H. L.** und High K. A. (1996): Liver-enriched transcription factor HNF-4 and ubiquitous factor Nf-Y are critical for expression of blood coagulation factor X.  
J. Biol. Chem. 271: 2323-2331
- Imataka H.**, Gradi A. und Sonnenberg N. (1998): A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation.  
EMBO J. 17: 7480-7489
- Irwin D. M.**, Robertson K. A. und MacGillivray R. T. A. (1988): Structure and evolution of the bovine prothrombin gene.  
J. Mol. Biol. 200: 31-45
- Jackson D. A.** (1991): Structure-function relationships in eukaryotic nuclei.  
Bioessays 13: 1-10
- Jaffe E. A.**, Nachmann R. L., Becker C. G. und Minick C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbelical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.  
J. Clin. Invest. 52: 2745-2756
- Jamison C. S.** und Degen S. J. F. (1991): Prenatal and postnatal expression of mRNA coding for rat prothrombin.  
Biochem. Biophys. Acta 1088: 208-216
- Jansen R. P.** (2001): mRNA localization: message on the move.  
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2: 247-256
- Kanse S. M.**, Wijelath E., Kanthou C., Newman P. und Kakkar V. V. (1995): The proliferative responsiveness of human vascular smooth muscle cells to endothelin correlates with endothelin receptor density.  
Lab. Invest. 72: 376-382.
- Kern J. A.**, Warnock L. J., McCafferty J. D. (1997): The 3' untranslated region of IL-1beta regulates protein production.  
J. Immunol. 158: 1187-1193
- Khandjian E. W.** (1987): Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membrans.  
BioTechnology. 5: 165-171
- Kim S.** und Nelson P. G. (1998): Transcriptional regulation of the prothrombin gene in muscle.  
J. Biol. Chem. 273: 11923-11929
- Klagsburn M.**, Sullivan R., Smith S., Rybka R. und Shing Y. (1987): Purification of endothelial cell growth factors by heparin affinity chromatography.  
Meth. Enzymol. 14: 95-105
- Knowles B. B.**, Howe C. C., Aden D. P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.  
Science 209: 497-499

- Kotewicz** M. L., D'Alessio J. M., Driftmier K. M., Blodgett K. P. und Gerard G. F. (1985): Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*.  
Gene 35: 249-258
- Kotewicz** M. L., Sampson C. M., D'Alessio J. M. und Gerard G. F. (1988): Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity.  
Nucleic Acids Res. 16: 265-277
- Kotkow** K. J., Deitcher S. R., Furie B. und Furie B. C. (1995): The second kringle domain of prothrombin promotes factor Va-mediated prothrombin activation by prothrombinase.  
J. Biol. Chem. 270: 4551-4557
- Kubin** T., Vogel S., Wetzel J., Hein S., Pipp F., Herold J., Heil M., Kampmann A., Hehlhans S., von der Ahe D., Schaper W. und Zimmermann R. (2003): Porcine aortic endothelial cells show little effects on smooth muscle cells but are potent stimulators of cardiomyocyte growth.  
Mol. Cell. Biochem. 242: 39-45
- Laemmli** U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227: 680-685
- Lagnado** C. A., Brown C. Y. und Goodall G. J. (1994): AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A).  
Mol. Cell. Biol. 14: 7984-7995
- Lane** D. A., Olds R. J., Boisclair M., Chowdhury V., Thein S. L., Cooper D. N., Blajchman M., Perry D., Emmerich J. und Aiach M. (1993): Antithrombin III mutation database: first update.  
Thromb. Haemost. 70: 361-369
- Laroia** G., Cuesta R., Brewer G. und Schneider R. J. (1999): Control of mRNA decay by heat-shock-ubiquitin-proteasome pathway.  
Science 284: 499-502
- Lehman** I. R. (1974): DNA ligase: structure, mechanism and function.  
Science 186: 790-797
- Lehrach** H., Diamond D., Wozney J. M. und Boedtke H. (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.  
Biochemistry 16: 4743-4751
- Lindahl** A. K., Sandset P. M. und Abildgaard U. (1992): The present status of tissue factor pathway inhibitor.  
Blood Coagul. Fibrinolysis 3: 439-449
- Linz** B., Koloteva N., Vasilescu S. und McCarthy J. E. (1997): Disruption of ribosomal scanning on the 5'-untranslated region, and not restriction of translational initiation per se, modulates the stability of nonaberrant mRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
J. Biol. Chem. 272: 9131-9140
- Liu** L. W., Vu T. K., Esmon C. T. und Coughlin S. R. (1991): The region of the thrombin receptor resembling hirudin binds to thrombin and alters enzyme specificity.  
J. Biol. Chem. 266: 16977-16980
- Lodish** H. F. und Small B. (1976): Different lifetimes of reticulocyte messenger RNA.  
Cell 7: 59-65
- Loflin** P. T., Chen C. Y., Xu N. und Shyu A. B. (1999): Transcriptional pulsing approaches for analysis of mRNA turnover in mammalian cells.  
Methods 17: 11-20

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. und Randall R. J. (1951):** Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Ma W. J., Cheng S., Campbell C., Wright A. und Furneaux H. (1996):** Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein.  
J. Biol. Chem. 271: 8144-8151
- Ma W. J., Chung S. und Furneaux H. (1997):** The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA.  
Nucleic Acids Res. 25: 3564-3569
- MacGillivray R. T. A., Degen S. J. F., Chandra T., Woo S. L. C und Davie E. W. (1980):** Cloning and analysis of a cDNA coding for bovine prothrombin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5153-5157
- MacGillivray R. T. A. und Davie E. W. (1984):** Characterization of bovine prothrombin mRNA and its translation product.  
Biochemistry 23: 1626-1634
- Magnusson S., Peterson T. E., Sottrup-Jensen L. und Clayes H. (1975):** Complete primary structure of prothrombin: isolation, structure, and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activation by thrombin. Aus Reich E., Rifkin D. B. und Shaw E. (eds.): Proteases and Biological Control.  
Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratories, 123-149
- Makris M., Preston F. E., Beauchamp N. J., Cooper P. C., Daly M. E., Hampton K. K., Bayliss P., Peake I. R. und Miller G. J. (1997):** Co-inheritance of the 20210A Allele of the Prothrombin Gene Increases the Risk of Thrombosis in Subjects with Familial Thrombophilia.  
Thromb. Haemost. 78: 1426-1429
- Maniatis T., Goodbourn S. und Fischer J. A. (1987):** Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.  
Science 236: 1237-1245
- Mann K. G. und Elion J. (1980):** Prothrombin. Aus Schmidt R. M. (ed.): CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science, Section I: Hematology  
Boca Raton F. L.: CRC Press 3: 15-31
- Markwardt F. (1990):** Hirudin as an inhibitor of thrombin.  
Methods Enzymol. 19: 924-932
- Matthews J. C., Hori K., Cormier M. J. (1977):** Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase.  
Biochemistry 16: 85-91
- McCarthy J. E. G. (1998):** Posttranscriptional control of gene expression in yeast.  
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1492-1553
- Michel Y. M., Poncet D., Piron M., Kean K. M. und Borman A. M. (2000):** Cap-poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation.  
J. Biol. Chem. 275: 32268-32276
- Mignone F., Gissi C., Liuni S. und Pesole G. (2002):** Untranslated regions of mRNAs.  
Genome Biol. 3: REVIEWS0004.1-0004.10
- Mitchell P. J. und Tjian R. (1989):** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.  
Science 245: 371-378
- Mitchell P. und Tollervey D. (2000):** mRNA stability in eukaryotes.

- Curr. Opin. Genet. Dev. 10: 193-198
- Monaci P.**, Nicosia A. und Cortese R. (1988): Two different liver-specific factors stimulate *in vitro* transcription from the human alpha 1-antitrypsin promoter.  
EMBO J. 7: 2075-2087
- Müller-Berghaus G.** (1998): Regulation und Dysregulation des Hämostasesystems. Aus Thomas L.: Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden.  
TH-Books-Verl.-Ges.: 561-580
- Müller-Berghaus G.** und Pötzsch B. (1998): Hämostaseologie; Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.  
Springer-Verl.
- Muhrad D.** und Parker R. (1999): Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance.  
RNA 5: 1299-1307
- Mustafa S.**, Pabinger I. und Mannhalter C. (1995): Protein S deficiency type I: identification of point mutations in 9 of 10 families.  
Blood 86: 3444-3451
- Myer V. E.**, Fan X. C. und Steitz J. A. (1997): Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay.  
EMBO J. 16: 2130-2139
- Nagamine Y.**, Sudol M. und Reich E. (1983): Hormonal regulation of plasminogen activator mRNA production in porcine kidney cells.  
Cell 32: 1181-1190
- Nanbu R.**, Menoud P.-A. und Nagamine Y. (1994): Multiple instability-regulating sites in the 3' untranslated region of the urokinase-type plasminogen activator mRNA.  
Mol. Cell. Biol. 14: 4920-4928
- Nanbu R.** und Nagamine Y. (1997): Mode of transfection influences the stability of ectopically expressed mRNA.  
BBA 1350: 221-228
- Nelsestuen G. L.**, Zytkevich T. H. und Howard J. B. (1974): A mode of action of vitamin K: identification of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin.  
J. Biol. Chem. 249: 6347-6350
- Nelson T.** und Brutlag D. (1979): Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase.  
Methods Enzymol. 68: 41-50
- Neumann E.**, Schaefer-Ridder M., Wang Y. und Hofschneider P. H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.  
EMBO J. 1: 841-845
- Pabinger I.** und Lechner K. (1998): Thrombophilie. Aus Thomas L.: Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden.  
TH-Books-Verl.-Ges.: 594-600
- Patel D. J.**, Bouaziz S., Kettani A. und Wang Y. (1999): Structures of guanine-rich and cytosine-rich quadruplexes formed *in vitro* by telomeric, centromeric and triplet repeat disease DNA sequences. Aus: Neidle S. (ed.): Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure.  
Oxford University Press, Oxford: 389-453
- Patthy L.**, Trexler M., Vali Z., Banyai L. und Varadi A. (1984): Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases.  
FEBS Lett. 171: 131-136

- Patthy L.** (1985): Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules.  
Cell 41: 657-663
- Peng S. S., Chen C. Y. und Shyu A. B.** (1996): Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements.  
Mol. Cell. Biol. 16: 1490-1499
- Peng S. S., Chen C. Y., Xu N. und Shyu A. B.** (1998): RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein.  
EMBO J. 17: 3461-3470
- Pesole G., Mignone F., Gissi C., Grillo G., Licciulli F. und Liuni S.** (2001): Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions.  
Gene 276: 73-81
- Pestova T. V. und Hellen C. U.** (1999): Ribosome recruitment and scanning: what's new?  
Trends Biochem. Sci. 24: 85-87
- Phillips C., Kyriakopoulou C. B. und Virtanen A.** (1999): Identification of a stem-loop structure important for polyadenylation at the murine IgM secretory poly(A) site.  
Nucleic Acids Res. 27: 429-438
- Pollak E. S., Hung H. L., Godin W., Overton G. C. und High K. A.** (1996): Functional characterization of the human factor VII 5' -flanking region.  
J. Biol. Chem. 271: 1738-1747
- Pollak E. S., Lam H. S. und Russell J. E.** (2002): The G20210A mutation does not affect the stability of prothrombin mRNA *in vivo*.  
Blood 100: 359-362
- Poort S. R., Rosendaal F. R., Reitsma P. H. und Bertina R. M.** (1996): A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.  
Blood 88: 3698-3703
- Potter H., Weir L. und Leder P.** (1984): Enhancer-dependent expression of human  $\kappa$  immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7161-7165
- Preissner K. T.** (1996): Heparinoids and cellular interactions in the vascular system.  
Haemostasis 14: 496-502
- Priglinger U. und Binder B. R.** (1998): Das Fibrinolyse-system. Aus Müller-Berghaus G. und Pötzsch B. (1998): Hämostaseologie; Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.  
Springer-Verl.: 381-387
- Proudfoot N. J.** (1991): Poly (A) signals.  
Cell 64: 671-674
- Proudfoot N. J. und Brownlee G. G.** (1976): 3'Non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA.  
Nature 263: 211-214
- Reitsma P. H., Bernardi F., Doig R. G., Gandrille S., Greengard J. S., Ireland H., Krawczak M., Lind B., Long G. L., Poort S. R., Saito H., Sala N., Witt I. und Cooper D. N.** (1995): Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update.  
Thromb. Haemost. 73: 876-889
- Ross J. und Sullivan T. D.** (1985): Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes.

Blood 66: 1149-1154

**Ross J.** (1996): Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes.  
Trends Genet. 12: 171-175

**Royle N. J., Irwin D. M., Koschinsky M. L., MacGillivray R. T. A. und Hamerton J. L.** (1987): Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively.  
Som. Cell. Mol. Genet. 13: 285-292

**Rydel T. J., Ravichandran K. G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C. und Fenton J. W.** 2<sup>nd</sup>. (1990): The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin.  
Science 249: 277-280

**Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T.** (1989): Molecular cloning. A laboratory manual.  
2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, New York

**Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R.** (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

**Scherer W. F., Syverton J. T. und Gey G. O.** (1953): Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix.  
J. Exp. Med. 97: 695-710

**Schwartz D. C. und Parker R.** (1999): Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Mol. Cell. Biol. 19: 5247-5256

**Seegers H.** (1979): Prothrombin yesterday and today.  
Prog. Chem. Fibrinolysis Thrombolysis 4: 241-254

**Seglen P. O.** (1973): Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion.  
Exp. Cell. Res. 82:391-398

**Sehgal P. B. und Tamm I.** (1978): Halogenated benzimidazole ribosides: Novel inhibitors of RNA synthesis.  
Biochem. Pharmacol. 27: 2475-2485

**Shaw G. und Kamen R.** (1986): A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.  
Cell 46: 659-667

**Sheehan J. P., Wu Q., Tollefsen D. M. und Sadler J. E.** (1993): Mutagenesis of thrombin selectively modulates inhibition by serpins heparin cofactor II and antithrombin III. Interaction with the anion-binding exosite determines heparin cofactor II specificity.  
J. Biol. Chem. 268: 3639-3645

**Soria J. M., Almasy L., Souto J. C., Tirado I., Borell M., Mateo J., Slifer S., Stone W., Blangero J. und Fontcuberta J.** (2000): Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis.  
Blood 95: 2780-2785

**Southern E. M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. 98: 503-517

**Southern E.** (1979): Gel electrophoresis of restriction fragments.  
Meth. Enzymol. 68: 152-191

**Souto J. C., Coll I., Llobet D., del Rio E., Oliver A., Borrell M. und Fontcuberta J.** (1998): The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population.  
Thromb. Haemost. 80: 366-369

- Sachs A. B.** (1993): Messenger RNA degradation in eukaryotes.  
*Cell* 74: 413-421
- Stauffer D. R., Chukwumezie B. N., Wilberding J. A., Rosen E. D. und Castellino F. J.** (1998): Characterization of transcriptional regulatory elements in the promoter region of the murine blood coagulation factor VII gene.  
*J. Biol. Chem.* 273: 2277-2287
- Stein G. S., van Wijnen A. J., Stein J. L., Lian J. B., Bidwell J. P. und Montecino M.** (1994): Nuclear architecture supports integration of physiological regulatory signals for transcription of cell growth and tissue-specific genes during osteoblast differentiation.  
*J. Cell. Biochem.* 55: 4-15
- Stenflo J., Fernlund P., Egan W. und Roepstorff P.** (1974): Vitamin K-dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2730-2733
- Stenflo J. und Suttie J. W.** (1977): Vitamin K-dependent formation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid.  
*Ann. Rev. Biochem.* 46: 157-172
- Stoesser G., Baker W., van den Broek A., Camon E., Garcia-Pastor M., Kanz C., Kulikova T., Lombard V., Lopez R., Parkinson H., Redaschi N., Sterk P., Stoehr P. und Tuli M. A.** (2001): The EMBL nucleotide sequence database.  
*Nucleic Acids Res.* 29: 17-21
- Stoesser G., Baker W., van den Broek A., Camon E., Garcia-Pastor M., Kanz C., Kulikova T., Leinonen R., Lin Q., Lombard V., Lopez R., Redaschi N., Stoehr P., Tuli M. A., Tzouvara K. und Vaughan R.** (2002): The EMBL nucleotide sequence database.  
*Nucleic Acids Res.* 30: 21-26
- Sun W. Y., Witte D. P., Degen J. L., Colbert M. C., Burkart M. C., Holmback K., Xiao Q., Bugge T. H. und Degen S. J. F.** (1998): Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7597-7602
- Sun W. Y. und Degen S. J.** (2001): Gene targeting in hemostasis. Prothrombin.  
*Front. Biosci.* 6: D222-D238
- Swanson M. S. und Dreyfuss G.** (1988): RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns.  
*EMBO J.* 7: 3519-3529
- Sweeney R., Fan Q. und Yao M. C.** (1996): Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8518-8523
- Tarun S. Z. Jr. und Sachs A. B.** (1996): Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G.  
*EMBO J.* 15: 7168-7177
- Tateno Y., Miyazaki S., Ota M., Sugawara H. und Gojobori T.** (2000): DNA data bank of Japan (DDBJ) in collaboration with mass sequencing teams.  
*Nucleic Acids Res.* 28: 24-26
- Thomas P. S.** (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 5201-5205
- Thomas P. S.** (1983): Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper.  
*Meth. Enzymol.* 100: 255-266
- Thompson A. R., Enfield D. L., Ericsson L. H., Legaz M. E. und Fenton J. W. 2<sup>nd</sup>.** (1977): Human thrombin: partial primary structure.

- Arch. Biochem. Biophys. 178: 356-367
- Timchenko** L. T. (1999): Myotonic dystrophy: the role of RNA CUG triplet repeats.  
Am J. Hum. Genet. 64: 360-364
- Tollefsen** D. M. und Blank M. K. (1981): Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.  
J. Clin. Invest. 68: 589-596
- Tollefsen** D. M., Pestka C. A. und Monafó W. J. (1983): Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate.  
J. Biol. Chem. 258: 6713-6716
- Tosetto** A., Missiaglia E., Frezzato M. und Rodeghiero F. (1999): The VITA project: prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in the general population.  
Thromb. Haemost. 82: 1395-1398
- Treisman** R. (1985): Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5'-element and c-fos 3' sequences.  
Cell 42: 889-902
- Tsiang** M., Lentz S. R., Dittman W. A., Wen D., Scarpati E. M. und Sadler J. E. (1990): Equilibrium binding of thrombin to recombinant human thrombomodulin: effect of hirudin, fibrinogen, factor Va, and peptide analogues.  
Biochemistry 29: 10602-10612
- Vakalopoulou** E., Schaack J. und Shenk T. (1991): A 32-kilodalton protein binds to AU-rich domains in the 3' untranslated regions of rapidly degraded mRNAs.  
Mol. Cell. Biol. 11: 3355-3364
- van der Velden** A. W. und Thomas A. A. (1999): The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development.  
Int. J. Biochem. Cell. Biol. 31: 87-106
- van Hinsbergh** V. W. M. (1988): Regulation of the synthesis and secretion of Plasminogen activators by endothelial cells.  
Haemostasis 18: 307-327
- van Hoof** A. und Parker R. (1999): The exosome: a proteasome for RNA?  
Cell 99: 347-350
- Volloch** V. und Housman D. (1981): Stability of globin mRNA in terminally differentiating murine erythroleukemia cells.  
Cell 23: 509-514
- Wahle** E. und Rügsegger U. (1999): 3'-end processing of pre-mRNA in eukaryotes.  
FEMS Microbiol. Rev. 23: 277-295
- Walz** D. A., Hewett-Emmett D. und Seegers W. H. (1977): Amino acid sequence of human prothrombin fragments 1 and 2.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1969-1972
- Wang** W., Furneaux H., Cheng H., Caldwell M. C., Hutter D., Liu Y., Holbrook N. und Gorospe M. (2000a): HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light.  
Mol. Cell. Biol. 20: 760-769
- Wang** W., Caldwell M. C., Lin S., Furneaux H. und Gorospe M. (2000b): HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation.  
EMBO J. 19: 1-12
- Wang** Z., Day N., Trifillis P. und Kiledjian M. (1999): An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA *in vitro*.  
Mol. Cell. Biol. 19: 4552-4560

- Wang Z.** und **Kiledjian M.** (2000): The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity.  
*Mol. Cell. Biol.* 20: 6334-6341
- Weinstein J. R.,** **Gold S. J.,** **Cunningham D. D.** und **Gall C. M.** (1995): Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA.  
*J. Neurosci.* 15: 2906-2919
- Weiss I. M.** und **Liebhaber S. A.** (1994): Erythroid cell-specific determinants of  $\alpha$ -globin mRNA stability.  
*Mol. Cell. Biol.* 14: 8123-8132
- Welch E. M.** und **Jacobson A.** (1999): An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA.  
*EMBO J.* 18: 6134-6145
- Wells S. E.,** **Hillner P. E.,** **Vale R. D.** und **Sachs A. B.** (1998): Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.  
*Mol. Cell* 2: 135-140
- Wilusz C. J.,** **Wormington M.** und **Peltz S. W.** (2001): The cap-to-tail guide to mRNA turnover.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001 2: 237-246
- Wirth R.,** **Friesenegger A.** und **Fiedler S.** (1989): Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation.  
*Mol. Gen.* 216: 175-177
- Wong T. K.** und **Neumann E.** 1982: Electric field mediated gene transfer.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 584-587.
- Wood K. V.,** **de Wet J. R.,** **Dewji N.,** **DeLuca M.** (1984): Synthesis of active firefly luciferase by *in vitro* translation of RNA obtained from adult lanterns.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 592-596
- Yanisch-Perron C.,** **Vieria J.** und **Messing J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.  
*Gene* 33: 103-119
- Yee J. K.** (1989): A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus.  
*Science* 246: 658-661
- Zarudnaya M. I.,** **Kolomiets I. M.,** **Potyahaylo A. L.** und **Hovorun D. M.** (2003): Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures.  
*Nucleic Acids Res.* 31: 1375-1386
- Zhang W.,** **Wagner B. J.,** **Ehrenman K.,** **Schaefer A. W.,** **DeMaria C. T.,** **Crater D.,** **DeHaven K.,** **Long L.** und **Brewer G.** (1993): Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1.  
*Mol. Cell. Biol.* 13: 7652-7665
- Zhao J.,** **Hyman L.** und **Moore C.** (1999): Formation of mRNA 3'-ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 404-445
- Zivelin A.,** **Rosenberg N.,** **Faier S.,** **Kornbrot N.,** **Peretz H.,** **Mannhalter C.,** **Horellou M. H.** und **Seligsohn U.** (1998): A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene.  
*Blood* 92: 1119-1124

- 
- Zoubine** M. N., Ma J. Y., Smirnova I. V., Citron B. A. und Festoff B. W. (1996): A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle.  
Dev. Biol. 179: 447-457

**Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

Hehlgans S., von der Ahe D., Döhner U., Unkrig C. und Pötzsch B. (1999): Turnover of prothrombin mRNA is not influenced by the 20210A polymorphism.

XVIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Washington, DC; 1999.

Hehlgans S., Döhner U., Müller-Berghaus G., Pötzsch B. und von der Ahe D. (2000): Prothrombin gene expression and mRNA stability.

Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology 32:3. XIth International Vascular Biology Meeting, Geneva, Switzerland, 2000.

Hehlgans S. I., Weiss B., Zeyer A., Doehner U., Müller-Berghaus G., Pötzsch B. und von der Ahe, D. (2002): Homo sapiens prothrombin (F2) gene. Additional 3' flanking sequence information: Xba I fragment, covering part of Intron M, Exon XIV (Acc. No. M17262.1), and 1494 bp 3' flanking region of prothrombin.

Acc. No. AF493953, GenBank Database.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Müller-Berghaus danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeit in der Abteilung Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Kerckhoff-Klinik.

Frau Prof. Dr. G. Klug danke ich vielmals für die Betreuung und Vertretung meiner Arbeit im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. D. von der Ahe, Frau Dr. B. Weiß und Frau Dr. A. Wietelmann danke ich für viele anregende Diskussionen, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und nicht zuletzt für das Korrekturlesen der Arbeit.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. B. Pötzsch, der durch seine Anregungen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Y. Nagamine und seiner Arbeitsgruppe (Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz), insbesondere bei Frau L. Montero, für ihre Hilfe bei der Etablierung von quantitativen Northern Blot Analysen und für die freundliche Überlassung einiger Plasmidvektoren.

Bei Herrn Prof. Dr. N. Katz und seiner Arbeitsgruppe (Zentrum für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) bedanke ich mich für die Isolierung der primären Hepatozyten.

All meinen Freunden und Kollegen an der Kerckhoff-Klinik, die auf recht unterschiedliche Weise zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beitrugen, möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie ermöglichten und mich immer unterstützt haben.

Großen Dank schulde ich Herrn Jochen Nass für seine stete Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner Dissertation, für die Anleitung bei der Präsentation der Versuchsergebnisse, der Erstellung der Grafiken und Abbildungen und für seine unendliche Geduld.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen und dem Betreuer bekannten verwendet habe. Die Zitate wurden dem Wortlaut nach oder sinngemäß aus der Fachliteratur entnommen und sind durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Wöllstadt, 9. Juni 2003

Stephanie Hehlans