

Aus dem
Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des
DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erhard Seifried

Eine Methode zur Diagnostik von Mutationen im Protein C-Gen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Sven Schmidt
aus Mühlheim am Main

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. E. Seifried
Korreferent: PD Dr. M. Rauschmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 2009

Meinen Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rolle des Protein C im Gerinnungssystem	1
1.2	Entdeckung und geschichtliche Entwicklung	5
1.3	Funktion und Interaktion von Protein C mit Thrombozyten,	8
1.4	Organisation des Protein C-Gens	11
1.5	Struktur des Proteins	13
1.6	Einteilung des PC-Mangels	15
1.7	Diagnostik des Protein C-Mangels	15
1.8	Aufgabenstellung und Ziel	19
2	Material	20
2.1	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Puffer und Lösungen für die DNA Isolierung	21
2.1.3	Lösungen und Chemikalien für die PCR und Sequenzierreaktion	22
2.1.4	Chemikalien und Lösungen für die Gelelektrophorese	23
2.1.5	Sonstige Chemikalien	23
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	23
2.2	Untersuchungskollektiv	25
3	Methoden	27
3.1	Leukozyten- und DNA-Isolierung	27
3.1.1	Leukozytenisolierung	27
3.1.2	DNA-Isolierung (Aussalzmethode)	28
3.1.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	28
3.2	Sequenzspezifische Amplifikation der Exone des Protein	29
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.2.2	Reaktionsansatz der 1. PCR	30
3.2.3	Thermocycler-Programm der 1.PCR	31
3.3	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.3.1	Herstellung eines 2 %-igen Agarosegels	32
3.3.2	Elektrophorese	32
3.4	Färbung und Photodokumentation	33
3.5	Aufreinigung des Amplifikats	33
3.6	Taq Cycle Sequencing und direkte Sequenzierung	34
3.6.1	Prinzip der asymmetrischen, linearen Einzelstrangsynthese	34
3.6.2	Prinzip der Sequenziergeräte (Modell ABI 373A und ABI Prism 310)	36
3.6.3	Fluoreszenz-Farbstoffe	37
3.6.4	Sequenzierprimer	38
3.6.5	Taq Cycle Sequencing-Reaktionsansatz	39
3.6.6	Thermocycler-Programm	39

3.7	Ethanol­fällung	40
3.8	Lösen des Pellets	40
3.8.1	Sequenziergerät Modell ABI 373A	40
3.8.2	Sequenziergerät ABI Prism 310	40
3.9	Herstellung des Elektrophoresegels und Laufpuffers	41
3.9.1	System ABI 373A	41
3.9.2	System ABI Prism 310	41
3.10	Elektrophoreseparameter	42
3.10.1	System ABI 373A	42
3.10.2	System ABI Prism 310	42
3.11	Auswertung der Sequenzierdaten	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Primerdesign und Amplifikation des PC-Gens mittels PCR	44
4.2	Zusammenfassung der Sequenzierer­gebnisse	48
4.2.1	Polymorphismen in den Exons und Introns des PC-Gens	49
4.2.2	Polymorphismus Exon 1	50
4.2.3	Polymorphismus Exon 6	50
4.2.4	Polymorphismus Exon 8	51
4.2.5	Polymorphismus Intron G	52
4.3	Mutationen in den kodierenden Exons	53
4.3.1	Mutation im Exon 4	54
4.3.2	Mutationen im Exon 9	56
4.3.3	Exon 9-Mutation an der Position 8554	57
4.3.4	Exon 9-Mutation an der Position 8608	60
4.3.5	Exon 9-Mutation an der Position 8689	61
4.3.6	Exon 9-Mutation an der Position 8743	63
4.3.7	Exon 9-Mutation an der Position 8826	64
4.4	Mutationen in den Introns des PC-Gens	66
5	Diskussion	68
5.1	Identifikation von Mutationen im Protein C-Gen bei Thrombophilie-Patienten	68
5.2	Etablierung der molekulargenetischen Untersuchungen des Protein C-Gens	69
5.3	Polymorphismen im Protein C-Gen bei Thrombosepatienten und gesunden Individuen	70
5.4	Mutationen im Protein C-Gen bei Thrombosepatienten	71
5.5	Mutationen im Exon 4 des Protein C-Gens bei Thrombosepatienten	72
5.6	Mutationen im Exon 9 des Protein C-Gens bei Thrombosepatienten	73
5.7	Insertionen in der Protein C-Gensequenz bei Thrombosepatienten	75
5.8	Molekulargenetische Untersuchungen des Protein C-Gens: Ein Ausblick	76
6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis	80

1 Einleitung

1.1 Rolle des Protein C im Gerinnungssystem

Thromboembolische Erkrankungen nehmen einen führenden Platz in der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik ein. In Deutschland führen Thromboembolien jährlich zu 100.000 Todesfällen. Die jährliche Inzidenz der Phlebothrombose beträgt etwa 1 : 1.000, wobei etwa bei 50 % der Patienten eine hereditäre Ursache nachweisbar ist (MILETICH et al. 1993).

Die Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichtes wird durch ein komplexes Zusammenspiel von gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Faktoren gewährleistet (GROSS et al. 1987). Eine gesteigerte Gerinnungsaktivierung führt ebenso wie eine verminderte Hemmung der Gerinnung zu Thrombosen. Dagegen führen eine gesteigerte Gerinnungshemmung oder die verminderte Aktivierung der Gerinnung zu vermehrter Blutungsneigung (MAMMEN 1991).

Störungen dieses Zusammenspiels können ihre Ursache in angeborenen Gendefekten haben, die zu einer Strukturveränderung und damit zu einem Funktionsverlust der jeweiligen Gerinnungsfaktoren führen. Hingegen sind erworbene Gerinnungsstörungen bekannt, zu denen man z.B. Tumore, schwere Infektionen mit septischem Krankheitsbild, Zustände nach einer Operation oder auch die Einnahme von Östrogenen zählt (SEIFRIED et HEINRICH 2000). Studien belegen, dass maligne Erkrankungen zu prokoagulatorischen Veränderungen führen, die klinisch eine Häufung thromboembolischer Komplikationen bedingen (FRICKE et al. 1994, HORROWITZ et BRENNER 2008, KU et al. 2008).

In den vergangenen fünf bis sechs Jahrzehnten wurden verschiedene angeborene und erworbene Defekte mit Mangelzuständen im Gerinnungs- und Fibrinolyse-system identifiziert, die mit einer Thromboseneigung einhergehen (BURSTEIN et al. 1996). Seit Mitte der sechziger Jahre, beginnend mit dem durch Egeberg be-

schriebenen, vererbten Antithrombin (AT) III-Mangel, wurden nach und nach weitere Mediatoren des Gerinnungssystems in die Suche nach Risikofaktoren miteinbezogen, die Patienten für venöse Thrombosen empfänglich machen (EGEBERT et al. 1965). Studien bei Mitgliedern von Familien mit quantitativen oder qualitativen Störungen des Gerinnungssystems belegen den Zusammenhang von vererbten (hereditären) Defekten und Thrombophilie (AICH et al. 1995, ALLART et al. 1993). Besonders jüngere Patienten mit erstmaliger, spontaner Thrombose und familiärer Belastung können Träger eines hereditären Gendefektes im Protein C- (PC), Protein S- (PS) oder ATIII-Gen sein (D'ANGELO et al. 1996). Des Weiteren finden sich Risikofaktoren wie die Hyperhomocysteinämie, der Lupus- oder Antikardiolipin-Antikörper, die mit einer erhöhten Thrombosehäufigkeit einhergehen. Klinisch zeichnen sich die Betroffenen durch das Auftreten von Beinvenenthrombosen oder atypisch lokalisierten Thrombosen in der Pfortader, den Nierenvenen, der Mesenterialgefäße oder der Zerebralgefäße aus. Vorwiegend aber ist die venöse Strombahn betroffen, doch wurden auch arterielle Thrombosen beschrieben.

Mit dem Lebensalter steigt bei Trägern von Gendefekten mit Thrombophilieneigung auch die Häufigkeit klinischer Manifestationen. Das Erstereignis einer Thrombose tritt häufig spontan auf. Oft werden die Patienten zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr symptomatisch (ROSENDAL et al. 1999) und etwa 50 % der Betroffenen haben eine oder mehrere thrombotische Ereignisse erlitten. Bei Vorliegen eines Defektes des ATIII, PC oder PS, beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Erleiden einer Thrombose bis zum 60. Lebensjahr, annähernd 80 - 90 % (PABINGER et SCHNEIDER 1996). Miletich *et al.* schätzen eine Häufigkeit bei homozygotem Defekt von etwa 1 pro 160.000 Geburten (MILETICH et al. 1987), wogegen Malar *et al.* eine Häufigkeit von 1 pro 500.000 angibt (MALAR et ADCOCK 1989).

In Untersuchungen mit großen Patientenzahlen konnten bei Patienten mit thrombotischen Ereignissen in etwa 8% ein hereditärer Mangel der Inhibitoren ATIII, PS oder PC verantwortlich gemacht werden (HACH-WUNDERLE 1991, FELEZ et al. 1987). Mit der Entdeckung der Faktor V-Leiden-Mutation sowie der Prothrombin-Mutation konnten die beiden häufigsten hereditären Risikofaktoren beschrieben werden (BERTINA et al. 1994, POORT et al. 1996). Mit diesen Hauptrisikofaktoren

ließen sich bei Patienten mit Thrombosen, diese in bis zu 80 % ätiopathogenetisch erklären. In einem Kollektiv von Patienten mit Thrombosen beträgt, wie man heute weiß, die Prävalenz des PC-Mangels zwischen 2,6 % und 11,5 %, wogegen die Faktor V-Leiden-Mutation eine Prävalenz bis zu 50 % und die der Prothrombin-Mutation bis zu 7,1 % erreicht (REES et al. 1995, HILLARP et al. 1997). Die Prävalenz des Antithrombin-Mangels bei Patienten in Japan mit tiefen Venenthrombosen wird mit 5,6 % angegeben (SAKATA et al 2004).

Tabelle 1: Prävalenzen verschiedener Thrombophilieparameter

Hereditäre Mutation	Asymptomatische Bevölkerung in %		Patienten mit Thrombosen in %	
APC-Resistenz	6	RIDKER <i>et al.</i> 1995	52	GRIFFIN <i>et al.</i> 1993
PC-Mangel	0,2	TAIT <i>et al.</i> 1995	3,3	HACH-WUNDERLE 1991
ATIII-Mangel	0,02	TAIT <i>et al.</i> 1994	2	HACH-WUNDERLE 1991
PS-Mangel	16	BEAUCHAMP <i>et al.</i> 2004	13	KOSTER <i>et al.</i> 1993
Prothrombinmutation	2	ROSENDAAL <i>et al.</i> 1998	7,1	HILLARP <i>et al.</i> 1997

In der zentralen Rolle eines antikoagulatorisch wirkenden Gerinnungsfaktors (ESMON 1983) übt das PC als eine Vitamin K-abhängige Serin-Protease seine Funktion auf Phospholipidoberflächen aus. Sein Hauptbildungsort ist die Leber. Der größte Teil des PC, ca. 85 %, zirkuliert im Plasma in der Zwei-Ketten-Form. 10 – 15 % des Plasma-PC liegen in der Ein-Ketten-Form vor (MILETICH et al. 1983). Beide Formen zirkulieren in der inaktiven Form und besitzen wahrscheinlich die gleiche Aktivität (FOSTER et al. 1987). Nach Eppstein *et al.* beträgt die Plasmakonzentration bei einer Halbwertszeit von 6-8 Stunden etwa 3-5 mg/l (EPPSTEIN et al. 1984). Das PC wird über einen Komplex aus Thrombin (KIESIEL et al. 1977) und Thrombomodulin (ESMON et OWEN 1981) aktiviert. Nach diesem Schritt wird es als „aktiviertes Protein C“, kurz „APC“ bezeichnet. Das APC wirkt der Fibrinbil-

dung und damit der Gerinnungskaskade entgegen, in dem es die aktivierten Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa proteolytisch inaktiviert (SUSUKI et al. 1983, FULLCHER et al. 1984). Die Wirkung des PC ist von Ca^{2+} -Ionen, negativ geladenen Phospholipidoberflächen, dem Protein S und einem weiteren Rezeptor, dem Endothelialen Protein C-Rezeptor, kurz „ERCP-Rezeptor“, abhängig (WALKER 1983 1984, FUKODOME et al. 1994).

Für praktisch alle Vitamin-K abhängigen Gerinnungsfaktoren wie die Faktoren II, VII, IX, X, oder das PS sind genetische Defekte gezeigt worden, die ihre Funktion oder Expression beeinflussen (MANUCCI 2000). Genetische Defekte am PC-Gen können autosomal vererbt oder durch spontane Mutation entstehen. Es gibt homozygote und heterozygote Merkmalsträger. Man unterscheidet zwischen „klinisch autosomal-dominanten“ und „klinisch autosomal-rezessiven“ Formen. Letztere haben kein erhöhtes Risiko für Thromboembolien. Ihre Prävalenz beträgt in etwa 1 : 200 (MILETICH et al. 1984, SALOMON et al. 2008).

Die homozygote Form manifestiert sich meist schon in den ersten Lebensstunden bis Tagen und zeigt schwerste thrombotische Störungen, häufig in Ausprägung einer *Purpura fulminans* an den inneren Organen, den Augen, dem Gehirn sowie großflächigen Nekrosen der Haut (AICH et al. 1995, MALAR et al. 1989). Bei heterozygoten Merkmalsträgern manifestieren sich Thrombosen später, vorrangig zwischen dem 2. und 3. Lebensjahrzehnt und die Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter.

Warum einige Merkmalsträger klinisch unauffällig bleiben, ist nicht sicher geklärt. Es wird vermutet, dass mehrere heterogene, thrombogene Auslöser zusammenwirken, und damit eine Thrombogenese begünstigen (REITSMA et al. 1991, ANDRE et al. 1987). Oft handelt es sich um Spontanthrombosen, in anderen Fällen liegen anamnestisch auch geringfügige Auslöser im Sinne eines kleinen operativen Eingriffs (z.B. Appendektomie) zugrunde. Hauptort der Manifestation von Thrombosen ist die venöse Strombahn. Die selteneren arteriellen Thrombosen betreffen vorwiegend die zerebralen und die mesenterialen Gefäße.

Tabelle 2: Häufigkeit der Symptome bei heterozygotem PC-Mangel (MALAR et al. 1990)

Symptome	Rate
Tiefe Venenthrombose	45%
Lungenembolie	33%
Thrombophlebitis	17%
Mesenterialvenenthrombose	1%
Nierenvenenthrombose	1%
Myokardinfarkt	2%

Auf molekulargenetischer Ebene hat die Polymerasenkettenreaktion (PCR) zusammen mit Sequenziertechniken die Möglichkeit eröffnet, den Nachweis von Mutationen mit hoher Präzision und Sicherheit zu erbringen (WITT 1994).

Im Zuge der Weiterentwicklung von PCR-Techniken sind für das PC-Gen eine Vielzahl von Mutationen gefunden worden, die in einer Datenbank zusammengefasst wurden (REITSMA et al. 1993, REITSMA et al. 1995). Von 331 Einträgen, und 160 Mutationen machen 107 eingetragene Missense-Mutationen den häufigsten Mutationstyp aus. Der Typ I-Mangel findet sich etwa 7x häufiger als der Typ II-Mangel. Für alle Bereiche des PC-Gens werden Mutationen beschrieben. Der Großteil der beschriebenen Mutationen liegt im Exon 9, welches auch das größte Exon ist. Die Fortführung der Mutationsanalysen und Fallreportagen bringt immer wieder neue Mutationen hervor. Eine Aktualisierung der Datenbank der bisher detektierten Mutationen existiert bisher nicht.

1.2 Entdeckung und geschichtliche Entwicklung

Der Begriff „Protein C“ wurde erstmals von den Arbeitsgruppen um Stenflo und Kisiel beschrieben (STENFLO 1976, KISIEL et al. 1977). Bereits im Jahre 1960 untersuchte die Arbeitsgruppe um Seegers und Mammen einen Bestandteil des

Blutes, welchen man als „Autoprothrombin II-A“ bezeichnet hatte (MAMMEN et al. 1960). 1967 konnte die Arbeitsgruppe um Marciniak *et al.* das Autoprothrombin II-A isolieren, dem sie eine gerinnungsverlängernde Wirkung zuschrieben (MARCI-
NIAK et al. 1967) Im Jahre 1979 zeigte Seegers *et al.*, dass es sich bei dem Auto-
prothrombin II-A und dem von Stenflo entdeckten Blutbestandteil, dem PC, um das
gleiche Protein handelte (SEEGERS et al. 1979). Die Bezeichnung von Stenflo
setzte sich als gängiger „*Terminus technicus*“ durch.

Kisiel *et al.* beschrieben 1979 die Isolierung von PC aus humanem Plasma sowie
die Zweikettenform (leichte und schwere Kette) mit einem Molekulargewicht von
62.000 Dalton (KIESIL 1979). Im Jahre 1981 wurde durch Griffin *et al.* erstmals ein
hereditärer Defekt des PC beschrieben (GRIFFIN et al. 1981). Angehörige einer
Familie zeigten eine Häufung von klinisch manifesten Thrombosen. Mittels eines
Tests wurde bei den Mitgliedern der Familie die Menge von PC-Antigen im Blut
bestimmt. Das Testergebnis zeigte erniedrigte Werte. Man vermutete einen Verer-
bungsmechanismus von genetisch defektem PC, der zur Thrombogenese prädis-
poniert. Der genaue Grund dieses Defektes (auf molekulargenetischer Ebene)
konnte zu dieser Zeit noch nicht analysiert werden. Unterstützung fand dieser Be-
fund im Jahre 1982 durch die Beschreibung eines PC-Mangels bei Mitgliedern ei-
ner holländischen Familie (BERTINA et al. 1982).

Neben der Bedeutung von Phospholipidoberflächen und Kalzium (Ca^{2+})-Ionen be-
legten Malar *et al.* sowie Fulcher *et al.* den antikoagulatorischen Effekt von huma-
nen PC durch Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa (MALAR et al. 1982, FUL-
CHER et al. 1982). Im selben Jahr gelang es, neben der Funktion des Thrombins
als Aktivator des PC das endothelzellgebundene Thrombomodulin (TM) zu be-
schreiben, welches kalziumabhängig mit dem Thrombin einen Thrombin/TM-
Komplex bildet. TM steigert als Kofaktor des Thrombin dessen PC-aktivierende
Wirkung um das 20 – 30.000 fache (ESMON et al. 1982). Eine fibrinolytische Wir-
kung des PC wiesen van Hinsbergh *et al.* 1985 in einer plasminogenaktivierenden
Eigenschaft nach. Sie fanden heraus, dass das APC einen Inhibitor des Plasmino-
gens, den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI 1) inaktiviert (HINSBERGH et al.
1995).

Durch Entwicklung von Testmethoden zur Bestimmung der Funktion des PC im Gerinnungssystem konnte in den folgenden Jahren nicht nur eine Vielzahl weiterer PC-Defekte, sondern auch der dominante Vererbungsmodus beschrieben werden (NEGRIER et al. 1993, HORELLOU 1984, BERTINA et al. 1984, SALA et al. 1984, BROEKMANN et al. 1983).

Die gesamte Sequenz der cDNA des humanen PC wurde 1985 veröffentlicht (BECKMANN et al. 1985). Im selben Jahr konnten Foster *et al.* die komplette Nukleotidsequenz des humanen PC-Gens beschreiben (FOSTER et al. 1985). Vergleiche der Struktur und Sequenz des humanen PC mit anderen Spezies wie Affen, Schweinen wie auch Hunden ergaben große Homologien (MURAKAWA et al. 1994). Die Homologie der Aminosäuresequenz und die Organisation der Intron-Exon Grenzen der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X oder das PC lässt einen gemeinsamen Vorfahren dieser Faktoren vermuten (LONG 1986).

Der aktivierten Form des PC, wurde im Jahre 1993 durch Dahlbäck *et al.* ein neuer, für das Risiko einer Thrombose entscheidender Funktionszustand zugeschrieben. Dieser neue Risikofaktor wurde „aktivierte Protein C-Resistenz“, kurz „APC-Resistenz“, genannt. Bertina *et al.* konnten hierfür eine Punktmutation im Faktor V-Gen verantwortlich machen. Durch die Mutation wird die Inaktivierung des Faktor V durch das APC verhindert. Die APC-Resistenz wurde namentlich von der Faktor V-Leiden-Mutation, benannt nach der Stadt Leiden, abgelöst (BERTINA et al. 1994). Untersuchungen an größeren Kollektiven wiesen diesen Defekt als einen der Hauptrisikofaktoren für die Thrombophilie aus. Hieraus errechnet sich von Patienten mit thrombotischen Ereignissen eine weltweite Prävalenz von 18,2 % (AXELLSON et ROSEN 1997, siehe Tabelle 1).

1.3 Funktion und Interaktion von Protein C mit Thrombozyten, Endothelien und Gerinnungsfaktoren

Eine auch heute noch gültige Erklärung der Gerinnungskaskade lieferte die Arbeit von Davie *et al.*, der die Fibrinbildung als einen unumkehrbaren, kaskadenartigen Ablauf beschrieb (DAVIE et RATNOFF 1964). Verletzungen der Gefäßwand setzen am Ort der Schädigung die Bildung eines hämostatischen Pfropfs in Gang. Initial wird nach Verletzung an der Endothelschicht subendotheliales Kollagen, ADP und der „von Willebrand-Faktor“ freigesetzt, woran sich Thrombozyten anheften. Das in der Leber produzierte Prothrombin bildet mit den Faktoren Xa und Va auf Phospholipidoberflächen von sich anheftenden Thrombozyten einen Prothrombinase-Komplex, welcher die Umwandlung vom Prothrombin zum Thrombin bewirkt. Thrombin selbst vermag kalziumabhängig die Faktoren V, VIII und XIII zu aktivieren. Über weitere Aktivierungsschritte wird letztlich Fibrin gebildet und zu einer Netzstruktur transformiert, was dem „Plättchenthrombus“ seine Stabilität gibt (TOLENTINO et BALOU 2002).

Über Rezeptoraktivierung auf Thrombozytenmembranen werden durch das Thrombin intrazellulär Signaltransduktionen eingeleitet („Thrombozytenaktivierung“), was eine Exkretion von Wachstumsfaktoren zur Folge hat, die in den Granula der Thrombozyten gespeichert sind. Diese Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor, epidermal growth factor, insulin like growth factor, u.a.) sind für das den Plättchenthrombus umgebende Milieu und die nachfolgenden lokalen Reparatur- und Proliferationsmechanismen bedeutsam. Als Schutzmechanismus vor ungebremster Thrombusbildung besitzt das Gerinnungssystem antikoagulatorisch wirkende Mechanismen, zu denen das PC und das PS gezählt werden. Sie wirken der übermäßigen Fibrinbildung entgegen und haben somit den Charakter einer "Bremse" des Gerinnungssystems (TOLENTINO et BALOU 2002).

Aufgrund der Komplexität dieser Wechselwirkungen wurde die Funktion des PC im Gerinnungssystem als „PC-System“ bezeichnet. Das PC unterliegt in seiner Kontrollfunktion wiederum selbst Kontrollmechanismen (ESMON 1987).

Ein wichtiger Regulator der Hämostase stellt das Thrombomodulin (TM) dar. TM wurde in Lymphgefäßen, in der Plazenta, auf Thrombozyten sowie Granulozyten nachgewiesen. In der Gefäßstrombahn besteht eine Verteilungsdysbalance von TM zugunsten der Verteilungsdichte in kapillären Gefäßabschnitten (MURAYAMA et al. 1985). Esmon *et al.* beobachteten eine Verringerung der prokoagulatorischen Wirkung des Thrombins nach Bindung an das endothelmembrangebundene TM (ESMON et al. 1982). Das PC kann an diesen membranständigen Thrombin/TM-Komplex anlagern und damit zu APC transformiert werden (Abb. 1).

APC wirkt auf allen Phospholipidoberflächen, besonders auf Endothelmembranen oder Thrombozytenmembranen. Es inaktiviert die Faktoren Va und VIIIa innerhalb von wenigen Minuten über Proteolyse. Kofaktor des APC ist das PS, benannt nach der Stadt Seattle in den USA (WALKER 1980). Als ein wichtiges Antikoagulans liegt PS im Plasma zu 40 % frei und zu 60 % gebunden an C4b-Bindungsprotein vor. PS steigert die Wirkung des APC um das 2-6fache (LU et al. 1996). Lu *et al.* sowie Salem *et al.* zeigten einen weiteren APC Kofaktor. Nach APC-vermittelter Inaktivierung des Faktor Va konnten sie Faktor V-Fragmente nachweisen, welche die APC-Aktivität im Sinne einer positiven Rückkopplung steigerten (SALEM et al. 1983).

In das PC-System ist ein Rezeptor, der "Endothelzell-PC-Rezeptor" (kurz: EPCR) eingeschaltet, der sowohl PC als auch APC auf Endotheloberflächen bindet. Die PC-Aktivierung an dem Thrombin-TM-Komplex ist wiederum eng an die Bindung des APC zum EPCR-Rezeptor gekoppelt. Experimentell belegten Kurosawa *et al.* diese Hypothese durch Blockade des EPCR-Rezeptors, was in einer starken Inhibition der PC-Aktivierung resultierte (FUKODOME et al. 1995).

Untersuchungen zur Interaktion von Lymphozyten und PC konnten eine EPCR-Expression auf Lymphozytenoberflächen zeigen. Die Bindung des PC und APC an diesen Lymphozytenmembranen bremst Migrationseigenschaften von Lymphozyten, unterdrückt die Zytokin- und Immunglobulinexpression und nimmt immunmodulatorische Aufgaben ein (FEISTRITZER et al. 2006).

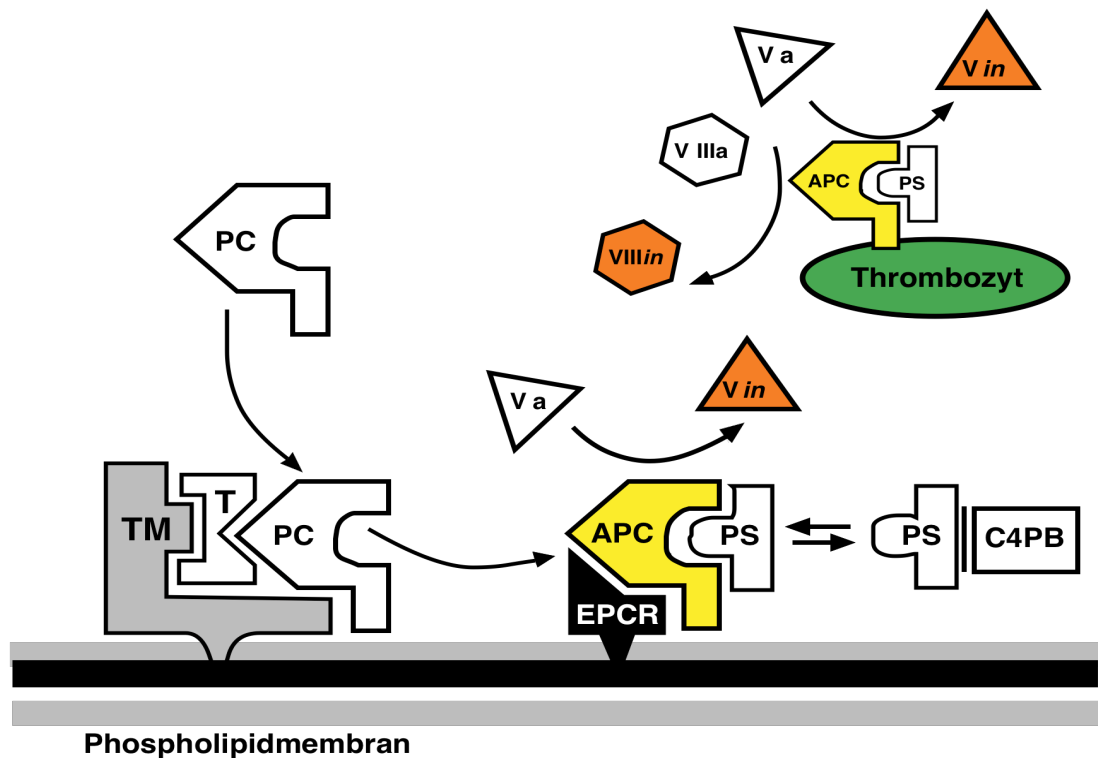


Abbildung 1: Darstellung der Interaktion des PC im Gerinnungssystem. Durch Bindung des PC an den T/TM Komplex wird PC aktiviert. APC bindet an den EPCR. Die APC-Wirkung wird über Bindung mit freiem PS getriggert, das zuvor aus der Bindung mit dem C4-bindenden Protein abgelöst werden muss. Die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa ist an die Kalzium-abhängige Kopplung des APC an Phospholipidoberflächen gebunden. Modifiziert nach Esmon *et al.*

Wie Sakata *et al.* zeigten, hat APC neben der Spaltung von Gerinnungsfaktoren eine fibrinolytische Wirkung, in dem es PAI-1 hemmt (SAKATA *et al.* 1985). Die Inaktivierung des APC erfolgt über eine enzymatische Spaltung. Bedeutsam scheint hier die Wirkung durch zwei physiologische, enzymatisch wirkende Inaktivatoren zu sein, dem α 1-Antitrypsin und dem PC-Inhibitor (COMP *et al.* 1991).

Eine weitere Bedeutung hat das PC-System im Verlauf systemischer Entzündungsreaktionen, insbesondere bei septischen Infektionen und der disseminierten intravasalen Gerinnung, kurz „DIG“ (ESMON *et al.* 1991). Im Rahmen von lokalen Entzündungen oder einer Sepsis kann die Bildung von neutralisierenden Antikörpern zu einer Verminderung der zirkulierenden PC- und PS-Konzentrationen führen. In Korrelation zum Schweregrad einer Infektion werden durch proteolytische Aktivität der Bakterienenzyme besonders Gerinnungsinhibitoren wie das PC und

das PS vermindert, was im Labortest an einem Antigen- und Aktivitätsabfall messbar wird (HEIDINGER et al. 1993, MALAR et al. 1985). Die messbare Konzentration von TM ist dagegen bei der DIG erhöht, was man auf die TM-Freisetzung aus geschädigtem, endothelialem Gewebe zurückführt (ASAKURA et al. 1991).

1.4 Organisation des Protein C-Gens

Das für das PC kodierende Gen liegt auf dem Locus q13q14 des Chromosoms 2 (PATRICCHIANI et al. 1989), und umfasst etwa 11 200 Basen mit einer Promotorregion, 9 kodierenden Exons und 8 dazwischen liegenden Intronbereichen (Intron A-H) (PLUTZKY et al. 1986). Die Länge der Exons variiert zwischen 25 und 587 Basen, die der Introns von 92 bis 2668 Basen. Nach Transkription und Spleißen hat die mRNA eine Länge von 1795 Bp (FOSTER et al. 1986).

Im Bereich des 5`-Endes finden sich eine Promotorregion mit zwei „TATA“-Boxen (Erkennungssequenz für den RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor) beginnend bei Position -1785 sowie -1853. Es folgt ein mehrere hundert Basen langer, nicht kodierender Abschnitt. (FOSTER et DAVIE 1986, PLUTZKY et al. 1986) .

Untersuchungen zur Promotorregion haben mehrere Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren gezeigt. Neben Bindungsstellen für den „hepatic nuclear factor 1“ (HNF 1) und HNF 3, HNF 6 konnten eine leberspezifische „Protein C-enhancer region“ PCE-1,-2,-3-Region, sowie eine Sp1-Bindungsstelle gefunden werden, die in unterschiedlichem Maße an der Transkription des Gens beteiligt sind. Mutationsbestimmungen in diesen Regionen zeigten reduzierte Transkriptionsraten (MIAO et al. 1996, SPEK et al. 1998).

Nach Translation hat die Prä-Proform des einkettigen PC-Peptids eine Länge von 461 Aminosäuren. Diese Prä-Proform besteht aus einem hydrophoben Signalpeptid und einem Propeptid zusammengesetzt ist. Das Signalpeptid (AS -42 bis -25) enthält Informationen, die für das Umschreiben und die Sekretion notwendig sind.

Es wird durch Proteolyse abgespalten. Das Propeptid (AS -24 bis -1) enthält die Erkennungssequenz für die Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung der 9-Glu-Domänen (FOSTER et al. 1987).

Der Rest vom Exon 3 (AS 1-37) enthält 9 Glutaminsäuren, die nach der Carboxylierung als Gla- oder Glu-Domäne bezeichnet werden. Das Exon 4 (AS 38 bis 45) kodiert für ein Zwischenpeptid. Das Exon 5 (AS 46 bis 91) und Exon 6 (AS 92 bis 136) kodieren für die beiden EGF-Domänen. Das Exon 7 (AS 137 bis 184), 8 (AS 185 bis 223) und ein großer Teil des Exon 9 (AS 224 bis 419) kodieren für die katalytische Protease-Region. Am 3'Ende des Exon 9 bleibt ein 296 Basen langer Abschnitt untranslatiert, der die Terminationssequenz enthält (FOSTER et DAVIE 1986, PLUTZKY et al. 1986).

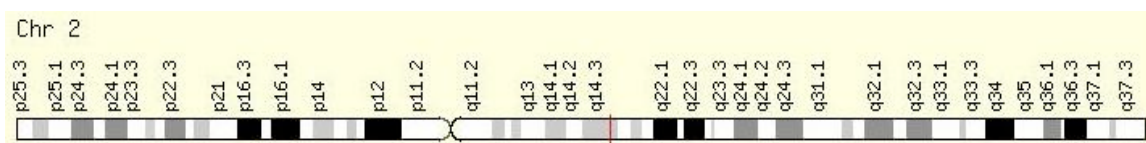


Abbildung 2: Darstellung des Locus von PC auf dem Chromosom 2

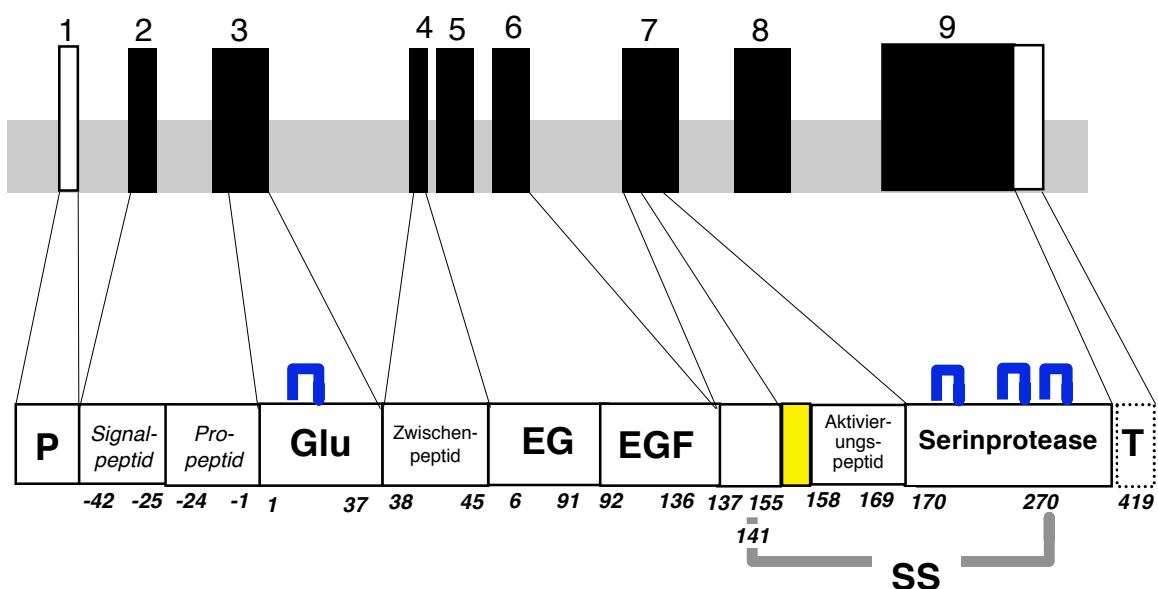


Abbildung 3: Darstellung des Aufbaus des PC Gens und der kodierenden Peptidsequenz. Die Lage der Kringeldomäne ist blau markiert. Die leichte und schwere Kette sind über eine Disulfidbrücke zwischen der Aminosäure 141 und 270 verbunden. Das Exon 1 (Promotorregion) und ein 296 Basen langer Abschnitt des Exon 9 (Terminationssequenz) bleiben untranslatiert. Die hellgrauen Flächen zeigen die Introns. Modifiziert nach Witt.

1.5 Struktur des Proteins

Das PC kann als Aneinanderreihung von vielen, in der Evolution konservierten Domänen betrachtet werden (FOSTER et al. 1986). Aus der Reihung der Domänen entstand eine homologe Grundstruktur, die anderen Komponenten des Hämostasesystems auffallend ähnlich sind. Foster *et al.* konnten eine auffallend große Übereinstimmung zum Faktor IX zeigen, der eine nahezu identische Struktur wie das PC aufweist. Neben den Gemeinsamkeiten im Aufbau unterschiedlicher Gerinnungsfaktoren gibt es eine große Übereinstimmung der Nukleotidsequenz des PC-Gens mit anderen Säugetieren wie Affe, Schwein oder Ratte. Ein Vergleich der katalytischen Domäne des PC unter 9 Säugetierarten zeigten Homologien zum humanen PC von 79 % (Ratte) bis zu 97 % (Rhesus-Affe) (MURAKAWA et al. 1994).

Nach der Translation durchläuft das Prä-Pro-Leader-Peptid als Einzelstrang-Protein intrazellulär eine Reifung (β -Hydroxylierung, γ -Carboxylierung, Proteolyse und Glykosylierung), wodurch letztlich eine Zweikettenform entsteht. Eine leichte Kette mit einer Länge von 155 AS (21.000 Dalton) und eine schwere Kette (262 AS, 41.000 Dalton) werden über eine Disulfidbrücke verbunden (MURAKAWA 1994).

Im Bereich des N-terminalen Endes der leichten Kette befinden sich in den Aminosäuren 1-37, neun Glutaminsäurereste (Gla-Domänen: Aminosäuren 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26 und 29), die nach der notwendigen γ -Carboxylierung und Umwandlung in Gla-Domänen für die Kalzium-abhängige Bindung des Proteins an die Phospholipidoberflächen verantwortlich sind (CHEUNG et al. 1989).

Es folgen ein kurzes Zwischenpeptid (AS 38-45) und zwei EGF-Domänen. Die EGF-Domänen werden von den Aminosäuren 46-91 und 92-137 gebildet. Sie sind an der Bildung der Tertiärstruktur sowie des PC-Thrombin-TM Komplexes beteiligt (WITT 1994).

Durch Spaltung der Peptidbindung zwischen Aminosäure Arg157 und Thr158 entsteht aus dem Einzelstrang das Zweikettenmolekül, das durch eine Disulfidbrücke (Cys141-Cys277) verbunden ist. Eine zusätzliche Abspaltung der AS 156 und 157

verkürzt die Länge der leichten Kette auf 155 Aminosäuren (STENFLO 1982). Disulfidbrückenbildungen zwischen den Cysteinpaaren 17-22, 50-63, 59-78, 80-89, 98-109, 105-118 sowie 120-133 tragen zur Tertiärstrukturbildung bei, wodurch sich schleifenähnliche Strukturen ausbilden (WACEY et al. 1993).

Die 262 AS lange schwere Kette beinhaltet ein Aktivierungspeptid (AS 158-169) sowie das katalytische Zentrum der Serinproteinase (AS 170-419). Durch Spaltung zwischen den AS 169-170 erfolgt die Abspaltung des 12 Aminosäuren langen Aktivierungspeptids (AS 158-169). Den Großteil des Proteins bildet die katalytische Domäne (AS 170-419). Sie enthält drei für Serinproteinasen typische, katalytische Aminosäuren His211, Asp257 sowie Ser360. Zwischen den Cysteinpaaren 196-212, 331-345 und 356-384 bilden sich ketteninterne Disulfidbrücken aus, die zur Bildung der Tertiärstruktur beitragen. Die posttranslationale Glykosylierung erfolgt an den Asparaginsäureresten 97 und 248 (FOSTER et a. 1985).

Nach seiner Aktivierung, inaktiviert das PC unter dem Einfluss von PS und Ca^{2+} (WALKER 1981) die Faktoren Va (MALAR et al. 1982) und VIIIa (VEHAR et DAVIE 1980). Die Bindungsstelle für den Kofaktor PS wird im Exon 5 vermutet (WITT 1994). Exon 7, 8 und 9 kodieren für die katalytische Domäne des Proteins. Hier finden sich die Erkennungssequenzen für die Faktor Va- und VIIIa-Bindung.

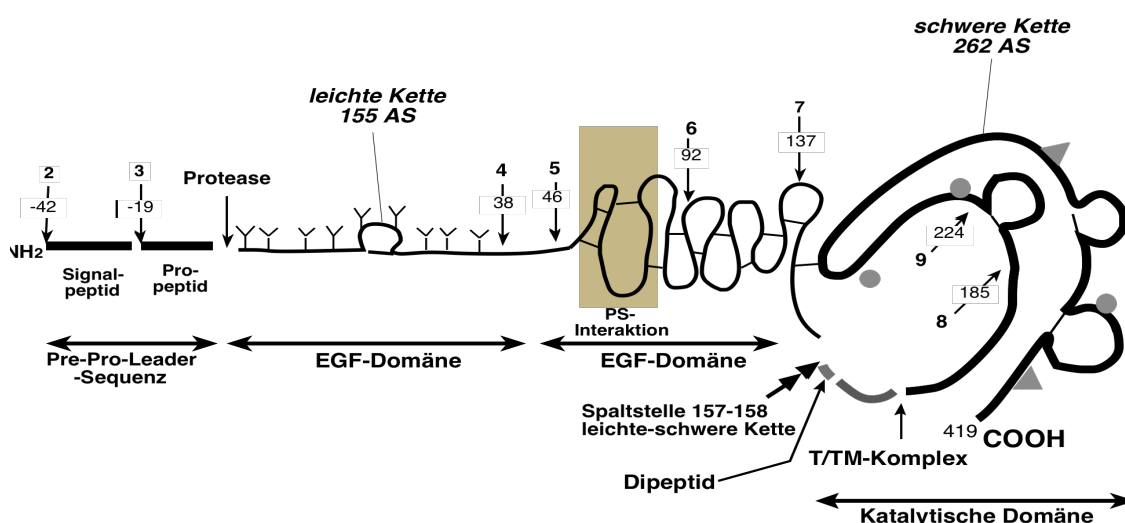


Abbildung 4: Schematische Darstellung der PC-Struktur auf Proteinebene. Zu erkennen ist der Aufbau aus der leichten und schweren Kette sowie das Dipeptid. Der Beginn eines Exons ist mit der Position der ersten Aminosäure angegeben. Graue Dreiecke markieren Kohlenhydratseitenketten, graue Punkte zeigen die Aminosäuren His 211, Asp 257 und Ser 360 des katalytischen Zentrums. Die dreidimensionale Darstellung würde ein weitaus komplizierteres strukturiertes Protein darstellen. Modifiziert nach Witt.

1.6 Einteilung des PC-Mangels

Übergreifend werden PC-Defekte in angeborene (Synonym: hereditär) und erworbene Störungen eingeteilt. Nach dem genetischen Vererbungsmodus kann der PC-Mangel homozygot, heterozygot oder „compound“ heterozygot vererbt werden. Beim „compound“-Mangel finden sich mehrere Mutationen, die sich in ihren Wirkungen im Sinne einer Triggerung ergänzen können (BECKMANN et al. 1985).

Wie beim Mangel von ATIII oder PS kann auch beim PC mit geeigneten Labor-tests eine Einteilung nach dem Phänotyp vorgenommen werden. Es werden die Antigenkonzentration und die Funktion (=Aktivität) des Proteins bestimmt. Man unterscheidet den **Typ I**- von dem **Typ II**-Mangel (BERTINA et al. 1984). Bei dem **Typ I**-Mangel sind sowohl die PC-Aktivität als auch das PC-Antigen vermindert. Der **Typ II**-Mangel ist ein qualitativer bzw. funktioneller Mangel und zeigt für die Antigenkonzentration normale bis übernormale Werte (s. Tabelle 3) wogegen die Aktivität vermindert ist.

Tabelle 3: Einteilung des Protein C-Mangels

Typ	PC-Konzentration	PC-Aktivität
I	vermindert	vermindert
II	normal	vermindert

1.7 Diagnostik des Protein C-Mangels

Indikationen zur PC-Untersuchung sind u.a. rezidivierende Thromboembolien, Thromboembolien bei jüngeren Patienten, sowie die *Purpura fulminans* oder Cumarin-Nekrosen (WITT 1993). Weitere Indikationen sind idiopathische Thrombosen, Thrombosen ohne Auslöser, Thrombosen an ungewöhnlichen Stellen und stattgefundenen, eventuell zeitlich versetzte arterielle und venöse Thrombosen (De

MOERLOOSE et MANUCCI 1996). Eine erweiterte Familienuntersuchung kann zusätzliche Hinweise auf den Vererbungsmechanismus bringen und eine Mutation bei noch klinisch unauffälligen Genträgern aufdecken.

Als Vitamin K-abhängiges Protein ist die PC-Bildung und damit die Gesamtaktivität bei einer Therapie mit oralen Vitamin K-Antagonisten (Cumarine) vermindert, wodurch man unter oraler Antikoagulation falsch niedrige Werte erhält. Ein PC-Screening sollte daher vor oder nach der Behandlung mit Cumarinen erfolgen. Unter einer Cumaringabe kann man behelfsmäßig bei stabilen Quick- oder INR-Werten einen Quotienten aus PC-Antigen und Prothrombin-Antigen oder PC-Antigen und Faktor X-Antigen bilden. Der Normbereich der Ratio liegt bei 0,90 bis 1,35. Eine Ratio unter 0,5 lässt einen PC-Mangel vermuten (CLOUSE et COMP 1986). Entgegen den Cumarinen beeinflusst Heparin die *in vitro* Tests nicht.

Es ist darauf zu achten, dass auch Infektionserkrankungen zur Messung von falsch niedrigen PC-Werten führen. Falsch niedrige PC-Werte werden bei Neugeborenen gemessen, da sie nur ca. 30 % das PC-Antigen der Erwachsenen erreichen (POLAK et al. 1984). Die Normwerte bei Kindern verändern sich ab dem ersten Lebensjahr. Sie steigen bei Neugeborenen von 17-53% stetig auf 55-111% beim Jugendlichen an. Die Werte von Erwachsenen werden innerhalb der ersten zwei Lebensjahre erreicht (NOVACK-GÖTTL 1994).

Männer haben physiologischerweise etwas höhere PC-Plasmaspiegel. Bei beiden Geschlechtern steigen die Werte mit zunehmendem Alter an (DOLAN et al 1994). Erhöhte Werte finden sich demgegenüber bei Schwangeren vor und nach der Geburt (MANUCCI et al. 1984).

Die Bestimmung der PC-Konzentration (=PC-Antigen) erfolgt immunochemisch mittels ELISA („enzyme linked immuno assay“), ELFA („enzyme linked fluorescent assay“), Rocket-Laurell-Immun-Elektrophorese oder einem Radio-Immunoassay (SELIGSOHN et al. 1984). Gängige Methoden sind die ELISA- oder ELFA-Technik. Die Messangabe erfolgt in % der Norm (THOMAS 1997).

Die Messung der PC-Aktivität erfasst in einem Gerinnungstest die Va- und VIIIa-inaktivierende Kapazität des PC. Als Messgröße dient die aPTT, die von der prokoagulatorischen Kapazität der Faktoren V und VIII abhängig ist. Die Anfang der 80iger Jahre veröffentlichten Tests adsorbierten in einem ersten Schritt das PC an $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Bariumcitrat, und eluierten das Präzipitat anschließend durch Ethylen-ditetraessigsäure (EDTA) oder Natrium-Kalium-Phosphat. Mit oder ohne Zugabe von TM wurde das PC durch Thrombin aktiviert. Nach Zugabe eines chromogenen Substrates (z.B. S2238 oder S2266) erfolgt die Messung des Abbaus in einem PTT-Testsystem oder in einem „Einstufen Xa-Gerinnungstest“.

Bei anderen, auf dem Markt erhältlichen Tests wird Patienten-Plasma mit PC-Mangelplasma gemischt. Dem Gemisch wird ein aPTT-Reagenz zugesetzt, wodurch eine Kontaktaktivierung der Faktoren XII und XI ausgelöst wird. Nach Zugabe von CaCl_2 erfolgt die Zugabe eines PC-Aktivators (Protac: Schlangengift von *Agkistrodon contortix*) wodurch PC aktiviert wird. Der Abbau bewirkt eine Verlängerung der Gerinnungszeit (aPTT), die durch Ablesen der Zeit an einer Standardkurve in % der Norm angegeben wird (THOMAS 1997, FRANCIS 1983).

Die erhaltenen Testwerte sind bei den kommerziell angebotenen Tests unterschiedlich, beziehen sich aber auf Referenzbereiche, die in Untersuchungen an klinisch gesunden Patienten ermittelt wurden. Die untere Grenze des PC-Antigens wurde mit 65-75 %, die obere Grenze mit 124-165 % angegeben (PABINGER-Fasching et al. 1983). Der sogenannte „milde PC-Mangel“ bei Heterozygoten mit Werten zwischen 60-70 % sollte regelmäßig kontrolliert werden.

Tabelle 4: Referenzbereiche der PC-Aktivität und PC-Konzentration von Erwachsenen

Protein C-Aktivität	65-140% der Norm
Protein C-Konzentration	70-140% der Norm

Zusammenfassend ist es derzeit mit keiner Testmethode möglich, die klinische Relevanz molekularbiologisch, charakterisierter und kartierter Defekte vorherzusagen. Auch molekularbiologische Methoden können keine Unterscheidung zwischen einer klinisch relevanten und nicht-relevanten Form des PC-Mangels treffen (MÜLLER-BERGHAUS 2000).

1.8 Aufgabenstellung und Ziel

Aufgrund der dargestellten Situation ist es von Interesse, bei Patienten mit thrombotischen Ereignissen im Rahmen eines Thrombophilie-Screenings nach genetischen Veränderungen im PC-Gen zu suchen und so eine Hilfestellung für die Therapie der Gerinnungsstörung zu bieten. Bei entsprechender Indikation sollen zur Risikoabschätzung auch Untersuchungsproben von Verwandten betroffener Patienten herangezogen werden.

Die zur Untersuchung benötigte genomische DNA soll aus Leukozyten vom Blut betroffener Patienten gewonnen werden. Die gewonnene genomische DNA soll mittels PCR-Technik für die folgende Sequenzierreaktion amplifiziert werden. Mit Hilfe von DNA-Sequenzdatenbanken und bereits beschriebenen PCR-Ansätzen sollen geeignete und neue Primerpaare für die Amplifizierung der kodierenden Exone und der angrenzenden Intron-Bereiche des menschlichen PC-Gens bestimmt werden. Die Reaktionsbedingungen für die PCR soll optimiert werden. Die gewonnene Patienten-DNA muss bei standardisierten Bedingungen durch PCR-Reaktionen amplifiziert werden. Schließlich muss eine geeignete Methodik zur DNA-Sequenzierung erarbeitet und durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse sollen mit vorhandenen Datenbanken verglichen werden, um auch neue Mutationen zu identifizieren sequenzanalytisch zu charakterisieren.

2 Material

2.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

Elektrophoresekammer	Minigel-Elektrophoresekammer (Horizon 58), Fa. GibcoBRL Life Technologies
Glasplatten (25x42 cm)	2 Platten, Fa. PE Applied Biosystems
Magnetrührer	Modell RTC, Fa. IKAMAG
UV-Transilluminator	UV-Transilluminator-Thermobelichter (System Imager), Fa. Renner
Photometer	Modell Spektral-Photometer GeneQuant II, Fa. Pharmacia Biotech
Sequenziergeräte	Modell ABI 373A, Fa. PE Applied Biosystems. Modell ABI Prism 310, Fa. PE Applied Biosys- tems
Spannungsgerät	Elektrophoresis-power-supply (500/500), Fa. Renner
Thermocycler	Modell PTC-100, MJ-Research, Fa. Biozym, Modell PE 9600, Gene Amp PCR-System, Fa. PE Applied Biosystems
Vortex-Mixer	Modell REA X 200, Fa. Heidolph
Vakuumfiltrierer	Modell Atmolit, Fa. Atmos
Vakuumzentrifuge	Modell Univapo 150H, Fa. Uniequip
Zentrifugen	Modell 323K, Fa. Hermle Modell 5415c, Fa. Eppendorf

2.1.2 Puffer und Lösungen für die DNA Isolierung

EDTA-Stammlösung: 0,5 M, pH 8,0	186,1 g EDTA-2H ₂ O Aqua dest. 800 ml, mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen
Erythrozyten-Lysepuffer	8,29 g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 0,037 g EDTA in 1000 ml Aqua dest. lösen
Kern-Lysepuffer	0,1 mM Tris-Cl (pH 7,6) 20 mM NaCl 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0
Proteinase K Puffer	2 % Sodium Dodecyl Sulfat-Lösung 25 mM EDTA pH 8 0,3 M NaCl gelöst in Aqua dest.
Proteinase K (2 mg %) 100 mg, 20 U/mg	Proteinase K wird gelöst in 10mM Tris HCl, pH 7,5, 20 mM CaCl ₂ , 50 % Glycerol, Fa. GIBCO BRL, mit 50 ml Proteinase K Puffer auffüllen Lagerung: -20°C
SDS Puffer 10% pH 7,2	100 g SDS 900 ml Aqua dest. bei 68 °C lösen mit konz. HCl auf pH 7,2 einstellen.
1x TBE Puffer	89 mM Tris-Borsäure 0,5 mM EDTA-Stammlösung pH 8,3 Aqua dest.
TE Puffer	10 ml Tris-HCl-Stammlösung 2 ml EDTA-Stammlösung 0,5 M, pH 8 ad 1000 ml Aqua dest.
Tris-HCl-Stammlösung: 1M, pH 7,5	121,1 g Tris, 800 ml Aqua dest. mit konz. HCl auf pH 7,5 einstellen
Tris-EDTA Puffer (TAE)	1 M Tris-HCl-Stammlösung 0,1 M EDTA-Stammlösung ad 1000 ml Aqua dest.

2.1.3 Lösungen und Chemikalien für die PCR und Sequenzierreaktion

Acrylamid/Bisacrylamid (38 %/2 %)	Lösung, Fa. Roth
Ammoniumpersulfat (APS 10 %)	1 g APS (Fa. Aldrich) in 10 ml H ₂ O lösen
10x PCR-Reaktions Puffer	100 mM Tris HCl (pH 9) 500 mM KCl 15 mM MgCl 1 % (w/v) Triton X-100 0,2 % (w/v) BSA oder Gelatine, Fa. Appligene
dNTP-Mix (10xStock)	dATP (1,25 mM), dCTP (1,25 mM), dGTP (1,25 mM), dTTP (1,25 mM), Fa. Stratagene
EDTA	Fa. Sigma
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	1 g Ethidiumbromid (Fa. Sigma), 100 ml H ₂ O
Formamid	Lösung, Fa. Kodak
Harnstoff (Urea)	Kristallin, Fa. Roth
„Thermo Sequenase dye- Terminator cycle sequencing pre-mix kit“	125 mM Tris HCl (pH 9) 5 mM MgCl ₂ 1,25 mM dITP, 0,25 mM dITP, 0,25 mM dATP, 0,25 mM dCTP, 0,25 mM dTTP 0,25 mM ddITP, 0,25 mM ddATP, 0,25 mM ddCTP, 0,25 mM ddTTP Thermo Sequenase DNA Polymerase „ <i>Thermoplasma acidophilum</i> thermostable inor- ganic pyrophosphate“ (TAP) Nonidet™ P40 Tween™ 20 6,25 % Glycerol Fa. Amersham, Fa. PE Applied Biosystems
Template Supression Re- agent	Fa. PE Applied Biosystems
Tetramethylethyldiamid (Temed, FW 116,2)	Lösung, Fa. Roth

2.1.4 Chemikalien und Lösungen für die Gelelektrophorese

Agarose-Gel 2 %	0,6 g Agarose, Pharmacia 30 ml TBE Puffer
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	1 g Ethidiumbromid (Fa. Sigma), 100 ml H ₂ O
Lade Puffer	250 µl Bromphenolblau 250 µg Xylencyanol 40 g Saccharose ad 100 ml HPLC Wasser
Elektrophorese-Puffer	1x TBE Puffer, siehe oben
Molekulargewichtsmarker	123 Bp Längenstandard, Fa. Gibco BRL

2.1.5 Sonstige Chemikalien

Ethanol absolut (99.9 %)	Fa. Merck
Ethanol 70 %	Fa. Merck
HPLC Wasser	Fa. JT Baker
Gesättigte NaCl-Lösung	350 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.
Trizma-Puffer (Tris)	Lösung, Fa. Sigma

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml PCR Reaktions-Gefäß	Fa. Sarstedt
1,5 ml Eppendorf Gefäß	Fa. Eppendorf
2,0 ml Eppendorf Gefäß	Fa. Eppendorf
50 ml Steril-Röhrchen	Fa. Greiner

Eiswanne	Fa. Fisher Scientific
Latex-Handschuhe	Fa. Hartmann
Pipetten, Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf
Putztücher	Kimwipes, Fa. Kimberly/Clark

2.2 Untersuchungskollektiv

Es wurde die molekulargenetische Untersuchung des PC-Gens an einem Kollektiv von 43 Personen durchgeführt. Dieses setzte sich aus einem Kontroll- (10 Personen) und einem Patientenkollektiv (33 Patienten) zusammen. Das Kontrollkollektiv wurde aus klinisch gesunden, nicht verwandten Personen zusammengestellt. Einschlusskriterien waren eine negative Anamnese bezüglich venöser Thromboembolien (Beinvenen, Pulmonalvenen). Das Kontrollkollektiv diente zur Validierung der Methodik. Die Gruppe umfasste 5 weibliche und 5 männliche, gesunde Personen.

Einsendungen erfolgten sowohl im Rahmen eines familiären Screenings, wobei in einer Familie vier Mitglieder untersucht wurden, es wurden aber auch Einzelproben untersucht. Die Untersuchung erfolgte nach Zusendung aus unterschiedlichen Kliniken in Deutschland:

- **Universitätsklinik Homburg/Saar** (Abt. Klinische Hämostaseologie): 18 Proben, davon 12 nicht verwandte Patienten, sowie zwei familiäre Untersuchungen mit je 1x4 und 1x2 Angehörigen.
- **Universitätsklinik Frankfurt/M** (Klinik für Pädiatrie): 12 Proben, davon 4 nicht verwandte Patienten, sowie von drei Familien je 1x2 und 2x3 Einsendungen.
- **Universitätsklinik Frankfurt/M** (ZIM, Abt. Angiologie): 1 Probe
- **Klinik Ludwigshafen**: 2 Proben verwandter Patienten.

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die einzelnen Patienten aufgelistet:

Tabelle 5: Patientenkollektiv. Soweit vorliegend ist das Geburtsdatum sowie das Geschlecht angegeben. Das Kollektiv besteht aus 17 Einzelproben und 16 Proben, die von 6 Familien stammen (2-4 Proben/Familie).

<i>Laufende Nummer</i>	<i>interne Nummer</i>	<i>Name</i>	<i>geboren am</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Verwandschaft</i>
1.	F1	S., G.	n.d.	W	Einzelprobe
2.	F2	L., B.	n.d.	W	Einzelprobe
3.	F3	M., U.	n.d.	W	Einzelprobe
4.	F4	M., M.	n.d.	M	Einzelprobe
5.	F5	K., E.	n.d.	W	Einzelprobe
6.	F10	D., E.	n.d.	W	Einzelprobe
7.	F11	W., K.	n.d.	M	Einzelprobe
8.	F70	F., N.	01.03.1976	W	Einzelprobe
9.	F65	S., H.	08.09.1941	M	Einzelprobe
10.	F540	W.,K.	03.08.1970	W	Schwester von 11.
11.	F541	W., G.	08.11.1967	M	Bruder von 10.
12.	F548	F., G.	23.03.1941	W	Einzelprobe
13.	F549	W., A.	19.10.1954	M	Einzelprobe
14.	F555	S., M.	20.03.1982	W	Tochter von 16.
15.	F556	K., M.	14.02.1984	M	Sohn von 16.
16.	F557	K., M.	26.04.1955	W	Mutter von 14. und 15.
17.	F558	K., M-R.	08.12.1952	M	Vater von 14. und 15.
18.	F563	W., J.	24.05.1963	M	Einzelprobe
19.	F30	H., M.	24.04.1975	W	Einzelprobe
20.	F7	E., F.	05.07.1988	M	Einzelprobe
21.	F14	G., P.	19.04.1994	M	Einzelprobe
22.	F15	W., I	30.07.1946	W	Mutter von 23.
23.	F16	W., M.	20.10.1980	W	Tochter von 22.
24.	F17	G., M.	11.08.1988	W	Einzelprobe
25.	F6	B., K.	26.08.1979	M	Sohn von 26.
26.	F20	B., D.	25.02.1965	W	Mutter von 27. und 25.
27.	F8	B., V.	12.12.1991	W	Tochter von 26.
28.	F554	M., B.	02.07.1981	W	Einzelprobe
29.	F560	H., D.	09.03.1974	M	Sohn von 31.
30.	F561	H. F	24.06.1982	M	Sohn von 31.
31.	F562	H., U.	18.09.1942	W	Mutter von 29. und 30.
32.	FF11	H., S.	25.01.1982	W	Tochter von 33.
33.	F512	H., A.	22.07.1954	M	Vater von 32.

3 Methoden

3.1 Leukozyten- und DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus Leukozyten nach der Methode von Miller und Dykes (MILLER et DYKES 1988). Für die Methode wurde 6-8 ml humanes, peripher-venöses Blut benötigt, das durch Zusatz von EDTA oder Heparin antikoaguliert wurde. Aus dem Vollblut wurden die kernhaltigen Leukozyten gewonnen, welche die genomische DNA enthalten. Nach der Leukozytenisolierung wurden die Zellen durch hypotone Pufferlösungen lysiert. Durch Proteinase K-Zugabe wurden Proteine verdaut und durch Zugabe einer gesättigten Salzlösung sowie nachfolgender Ethanolfällung, die hochmolekulare DNA ausgefällt.

3.1.1 Leukozytenisolierung

Das Volumen des Patientenblutes wurde mit der dreifachen Menge Erythrozyten-Lysepuffer versetzt, gut gemischt, und für 30 min bei 4 °C inkubiert, um eine komplette Lyse der Erythrozyten zu erreichen. Nach der Lyse wurde der Ansatz für 10 min bei 2500 UpM zentrifugiert und anschließend der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Leukozytensediment wurde aufgeschüttelt, in 4 ml des Erythrozyten-Lysepuffers resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde nochmals für 10 min bei 2.500 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das pelletierte Leukozytensediment wurde durch Aufschütteln vom Boden abgelöst.

3.1.2 DNA-Isolierung (Aussalzmethode)

Dem aufgeschüttelten Leukozytensediment wurden 3 ml Kern-Lysepuffer (4 °C) zugegeben und durch Schütteln vermischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl SDS-Puffer (10 %) und 600 µl Proteinase K (20 mg/ml). Der Verdau erfolgte durch Inkubation über Nacht im Wasserbad bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden 1,2 ml gesättigte NaCl-Lösung zugeben, kräftig geschüttelt und für 10 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und nochmals 2x zentrifugiert, bis der Überstand klar war. Zu dem klaren Überstand wurde eiskaltes Ethanol absolut im Verhältnis 4 Teile Ethanol absolut plus 1 Teil Überstand zugegeben. Zum Ausspindeln der gelösten DNA wurde das Falconröhrchen geschwenkt, bis die ausgespindelte DNA sichtbar wurde. Das DNA-Knäuel wurde mit einer Eppendorfspitze in ein 50 ml-Röhrchen mit 70 % Ethanol (4 °C) überführt und vorsichtig gewaschen. Die gewaschene DNA wurde anschließend in einem mit 1 ml TE Puffer gefüllten Reaktionsgefäß bei 40 °C für etwa 2-3 Stunden gelöst. Nach dem Lösen wurde die Konzentration sowie der Reinheitsfaktor der DNA photometrisch bestimmt.

3.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Vor jeder Messung wurde die Kalibrierung der Messapparatur durch Bestimmung des Nullpunktes der Lösung (TE-Puffers), in der die DNA gelöst wurde, durchgeführt. Die Absorption wurde sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm gemessen. Aus beiden Werten wurde der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet, der den Reinheitsfaktor (Ratio) der DNA angibt. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Werte kleiner 1,7 deuten auf eine Verunreinigung mit z.B. Proteinen hin, während Werte größer 1,9 auf RNA-Verunreinigungen schließen lassen. Die Konzentration wurde mit nachstehender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \frac{\text{OD 260 nm} \times 50 (\mu\text{g/ml}) \times 500 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}}$$

Die gemessene DNA-Konzentration wurde bei entsprechend hohen Konzentrationen mit TE-Puffer verdünnt und auf Konzentrationswerte zwischen 80-120 ng/ μ l eingestellt. Die DNA wurde in beschrifteten 0,5 ml Eppendorf Gefäßen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.2 Sequenzspezifische Amplifikation der Exone des Protein C-Gens (1.PCR)

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Da heute in vielen Bereichen der Medizin und Forschung die PCR ihre Anwendung findet, soll hier auf die Prinzipien der PCR eingegangen werden: Die von Karry B. Mullis entwickelte und 1994 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnete Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der man ausgesuchte Genabschnitte beliebig vervielfältigen kann (MULLIS et FALOONA 1987). Bei der Methode kommt der Untersucher mit einer winzigen Menge genetischen Materials aus. Durch zyklische Vermehrung erhält man von einer Zielsequenz („Target“) genügend Untersuchungsmaterial, um damit Sequenzanalysen durchführen zu können. Einen Schub erhielt die Nutzung der PCR durch die Entdeckung einer thermostabilen Polymerase, des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) (SAIKI et al. 1985), wodurch eine „automatisierte“ Anwendung möglich wurde.

Als Ausgangsmaterial kann Einzelstrang- sowie Doppelstrang-DNA dienen, in der sich eine gesuchte Zielsequenz befindet. Die Zielsequenz wird durch 2 Gensequenzen eingerahmt, die den Startern (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) als „An-dockstellen“ dienen. Die Amplifikation erfolgt in mehreren Zyklen. Üblicherweise werden 30 bis 40 Zyklen durchlaufen. Ein Zyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung (siehe Abbildung 4). Die Temperatur-Zeit-Profile dieser drei Schritte werden für jedes Primerpaar individuell ausgetestet und optimiert.

Die Polymerase verlängert die angelagerten Primer durch komplementäre Anlagerung der Basen (dNTP's), wodurch nach und nach eine Einzelstrangkette gebildet wird. Die Richtung der Kettenbildung erfolgt je nach Leserichtung der Polymerase durch Phosphodiesterbindung z.B. vom 3'Ende einer Base zum 5'Ende seiner nachfolgenden Base. Die neu synthetisierten Einzelstränge werden durch nachfolgende Hitzeeinwirkung abgetrennt. Durch Anlagerung des Gegenstrangprimers und seiner Verlängerung, wird aus dem erst einseitig begrenzten Strang ein zweites Ende bestimmt. Da jeder neu geschriebene Einzelstrang als Zielsequenz für eine erneute Primeranlagerung dient, steigt die Anzahl der Kopien exponentiell an ($=2^n$, n = Anzahl der PCR-Zyklen).

3.2.2 Reaktionsansatz der 1. PCR

Die PCR wurde mit einem 10x PCR Reaktionspuffer angesetzt, der bereits Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) enthält. Das Magnesium dient als Kofaktor für die *Taq*-Polymerase. Für die Amplifikation der Exons 4-5 wurden im 50 μl Reaktionsansatz 3 μl des Puffers eingesetzt. Die Amplifikation der Exons 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 9 erfolgte mit 5 μl des 10x Puffers. Der dNTP-Mix wurde auf eine Konzentration von 5 mM (1,25 mM pro dNTP) eingestellt. Die Endkonzentrationen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers wurden auf 5 pmol/ μl eingestellt. Der Reaktionsansatz hatte ein Endvolumen von 50 μl , und wurde auf Eis nach folgendem Schema pipettiert:

- 31,8 μl HPLC Wasser
- 5 μl Reaktions Puffer (10x Puffer)
- 5 μl dNTP-Mix
- 1 μl 5'Vorwärts-Primer (5 pM)
- 1 μl 3'Rückwärts-Primer (5 pM)
- 0,2 μl *Taq*-Polymerase (5 Units/ μl)
- 6 μl genomische DNA (80-120 ng/ μl)

3.2.3 Thermocycler-Programm der 1.PCR

Die PCR wurde in einem 96 Well-Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt. Die Deckelheizung vermindert die Verdunstungsablagerung am Gefäßdeckel, so dass ein Überschichten des Reaktionsansatzes mit Öl nicht nötig war. Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz temporär bei -20 °C gelagert.

Für die Amplifikation der Exons wurden drei unterschiedliche Thermocycler-Programme (Namen: PC 1, PC 2, PC 3) verwendet. Unterschiede bestehen nur in der Anlagerungstemperatur. In folgenden Tabellen wurden die Programmnamen den Exons und den jeweiligen Anlagerungstemperaturen zugeordnet:

Tabelle 6: Primeranlagerungstemperatur der einzelnen Programme.

Programm	Exon	Anlagerungs- temperatur
PCR-PC 1	1, 2, 4-5, 7	60 °C
PCR-PC 2	8	56 °C
PCR-PC 3	3, 6, 9	62 °C

Tabelle 7: Programme der PCR

Schritte	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94 °C	3 min
2. Denaturierung	94 °C	25 sec
3. Anlagerung	56 °C - 60 °C - 62 °C	50 sec
4. Verlängerung	72 °C	50 sec
Schritte 2.-4. 34x wiederholen		
5. Verlängerung	72 °C	3 min

3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis der amplifizierten Gen-Abschnitte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgender Ethidiumbromid Färbung. Das gelöste Amplifikat ist negativ geladen (Anion) und durchwandert im elektrischen Feld zur Anode ein Agarosegel. Die Wanderung erfolgt mit einer Geschwindigkeit, die von der Gelzusammensetzung, der Molekularmasse und dem angelegten Strom abhängig ist. Ein mitlaufender Molekulargewichtsmarker (123 Bp Leiter) ermöglicht später die Bestimmung der Amplifikatgröße.

3.3.1 Herstellung eines 2 %-igen Agarosegels

Die Agarose (0,6 g) und der 1x TBE-Puffer (30 ml) wurden in einem Becherglas unter Rühren so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die gelöste Agarose wurde in die entsprechende Gelelektrophoresekammer blasenfrei gegossen und die Kämme in die vorgesehenen Halterungen gesteckt. Das Aushärten des Gels war nach etwa 30 min abgeschlossen.

3.3.2 Elektrophorese

Zur Beurteilung des Molekulargewichtes wurden in die erste Geltasche 3 μ l des Molekulargewichtsmarkers pipettiert. Drei μ l des PCR-Amplifikates wurden in einer Extrakavität mit 1 μ l Laufpuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 mA und 130 Volt für 30 min.

3.4 Färbung und Photodokumentation

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Färbung in einem Ethidiumbromidbad (50 μ l Ethidiumbromid in 100 ml TBE-Puffer). Das Gel wurde für 8 bis 10 min gefärbt und anschließend in einer Dunkelkammer unter UV-Licht fotodokumentiert. Das Ethidiumbromid ist ein karzinogener Fluoreszenzfarbstoff, der sich zwischen die doppelsträngige DNA an die Basen Guanin und Cytosin anlagert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge 300 nm) wird orange-rotes Licht emittiert. Die Lichtemission ist abhängig vom GC-Gehalt des Amplifikates und lässt eine begrenzte Quantifizierung der Amplifikation zu. Das Gel wurde abschließend mit einer CCD-Kamera digital fotografiert und abgespeichert (siehe Ergebnisse).

3.5 Aufreinigung des Amplifikats

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification System“ (Fa. QIAGEN, Deutschland). Es ist ein Gelsäulen-System, um PCR-Produkte von Sequenzen mit Längen kleiner 100 Basen, Primern, Salzen oder anderen PCR-Verunreinigungen abzutrennen. Das gesamte PCR-Produkt wurde über die Säule aufgereinigt (50 μ l - 3 μ l aus der Gelelektrophorese = 47 μ l).

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der PE-Puffer wurde vor Gebrauch mit 96 %-igem Ethanol (Raumtemperatur) versetzt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 1 min bei 13.000 UpM. Das PCR-Produkt wurde in dem Reaktionsgefäß mit „PB-Puffer“ (Guanidinhydrochlorid) im Verhältnis 1:5 aufgefüllt, gemischt, 2 min inkubiert und anschließend in die Reinigungssäule überführt. Nun wurde für 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Wascheluat wurde verworfen, die Säule und das Eluatgefäß wurden wieder zusammengesteckt. Nun wurden 750 μ l PE-Puffer zupipettiert und für 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Abermals wurde das Eluat verworfen und die Säule erneut 1 min bei 13.000 UpM zentrifu-

giert. Die Säule wurde in ein neues, vorher beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gestellt. Im letzten Schritt wurde das Amplifikat durch Zugabe von 40 μ l EB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5) und zwei-minütiger Inkubation von der Säulenmembran eluiert. Abschließend wurde für 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert und das beschriftete Eppendorf-Gefäße zur Langzeit-Lagerung bei -20 °C eingefroren oder temporär bei 4 °C gekühlt.

3.6 *Taq* Cycle Sequencing und direkte Sequenzierung

3.6.1 Prinzip der asymmetrischen, linearen Einzelstrangsynthese

Das „*Taq* Cycle Sequencing“ ist eine asymmetrisch, lineare und zyklisch ablaufende Einzelstrangsynthese, bei der nach Ablauf der Reaktion unterschiedlich lange Einzelstränge entstehen. Am 3'Ende tragen die Stränge einen detektierbaren Farbstoff. Die Prinzipien dieser Methodik wurden erstmalig durch Sanger *et al.* beschrieben (SANGER *et al.* 1977). Das Amplifikat der 1. PCR dient als Matrize für die zyklische Einzelstrangsynthese. Als Starter dieser Synthese benötigt man einen Oligonukleotidprimer. Für die Sequenzier-Reaktion lassen sich sowohl die Primer der 1. PCR als auch interne, versetzte Primer verwenden. Es wird in Vorwärts- und in Rückwärtsrichtung sequenziert. Neben der Matrize und den Primern verwendet man eine gebrauchsfertige Lösung aus dNTP's und Farbstoff-markierte ddNTP's. Das die Nukleotide einbauende Enzym ist die „Thermo Sequenase DNA Polymerase“.

Der Einbau eines solchen ddNTP-Moleküls erfolgt nach einem statistischen Prinzip. Erfolgt in einem der Zyklen ein ddNTP Molekül-Einbau, wirkt das wie ein Stopp-Signal für eine weitere Verlängerung. Die so gebildeten Einzelstränge unterscheiden sich in ihrer Länge nur durch eine einzige Base. Das kürzeste Einzelstrangfragment ist 1 Base lang (entsprechend einer farbstoffmarkierten Base), das längste Einzelstrangfragment hat exakt die Länge der Matrize. Da nur ein Primer für die Vermehrung von Amplifikaten zu Verfügung steht, steigt die Menge der Produkte nur linear an. Nach Ende der 25 Zyklen kann man eine Aussage über die

Menge der einzelnen gebildeten Einzelstränge treffen, wobei kurze häufiger gebildet werden, als lange (erkennbar an der Sequenzlänge abnehmenden Signalstärke im Elektropherogramm) (Abb. 5). In einem Polyacrylamidgel werden die Einzelstränge ihrer Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Einzelstrangfragmente erfolgt mittels eines Sequenzierautomaten (Abb. 6 und 7).

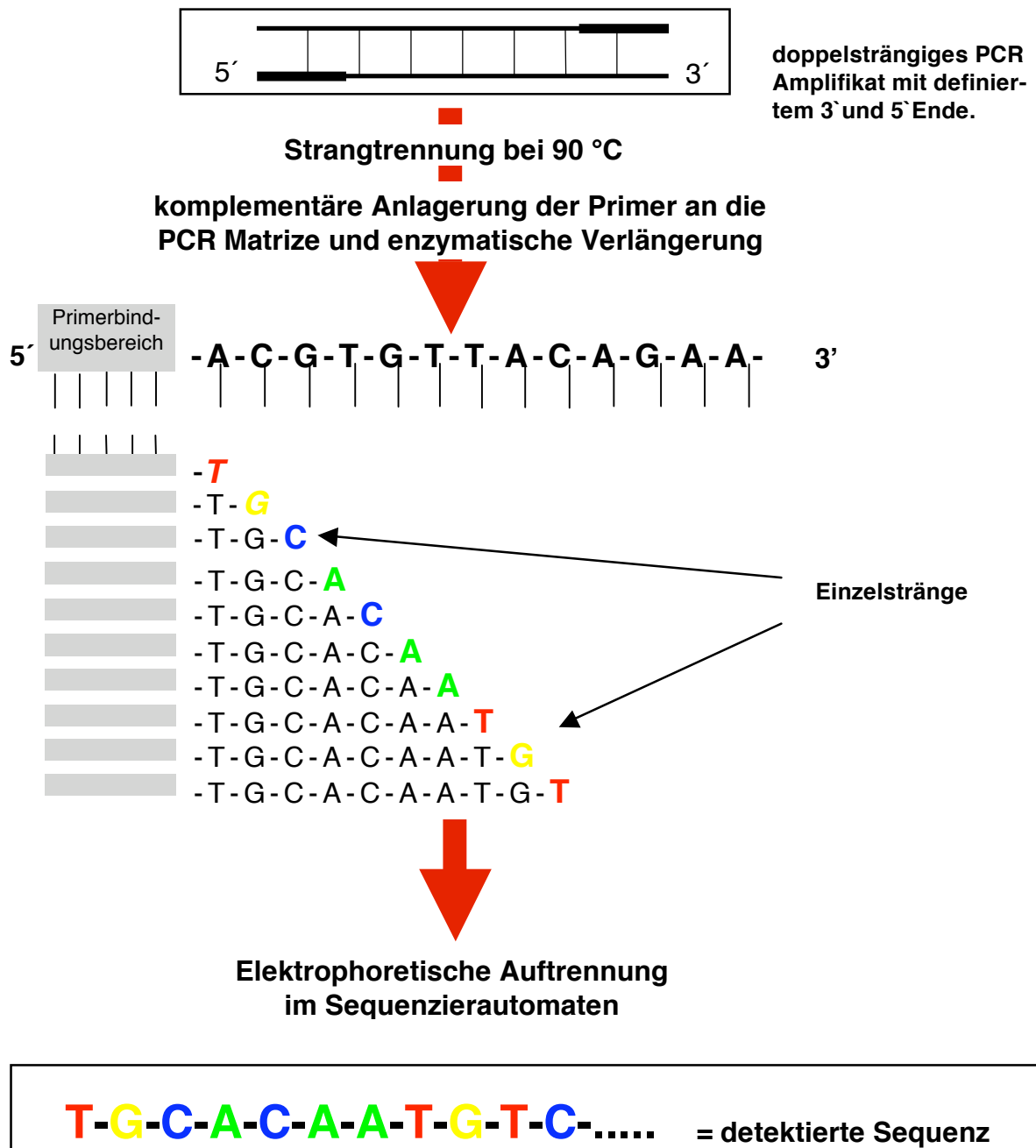


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der Sequenzierung. Das Amplifikat wird in zwei Einzelstränge unter Hitzeeinwirkung getrennt. Nach Primeranlagerung baut die *Thermo Sequenase* solange komplementäre dNTP's ein, bis ein farbstoffgekoppeltes ddNTP-Molekül eingebaut wird. Eine Anlagerung weiterer dNTP's ist dann nicht mehr möglich. Die gemessenen Lichtemissionen werden in einem Computer verrechnet und als zusammenhängende Nukleotidkette dargestellt.

3.6.2 Prinzip der Sequenziergeräte (Modell ABI 373A und ABI Prism 310)

Nachfolgend soll auf die Technik der Detektionssysteme, die Farbstoffe und die Sequenzierprimer eingegangen werden.

Die automatische Sequenzierung wurde mit zwei unterschiedlichen Detektionssystemen durchgeführt. Beide Systeme sind von der Firma PE Applied Biosystems. Sie unterscheiden sich dadurch, dass bei dem System ABI 373A zwischen zwei Glasplatten ein Polyacrylamidgel gegossen wird, in dem System ABI Prism 310 sich das Gel in einer Glaskapillare befindet (Kapillargelelektrophorese). In beiden Fällen werden die PCR Produkte im Stromfeld eines Elektrophoresegels ihrer Länge nach aufgetrennt. Das System 373A gehört der analogen Generation an, während das System ABI Prism 310 zu der digitalen Sequenzergeneration gehört. Als Lichtquelle haben beide Systeme einen 10 mW Argonlaser mit einem Spektrum von 488 - 514 nm.

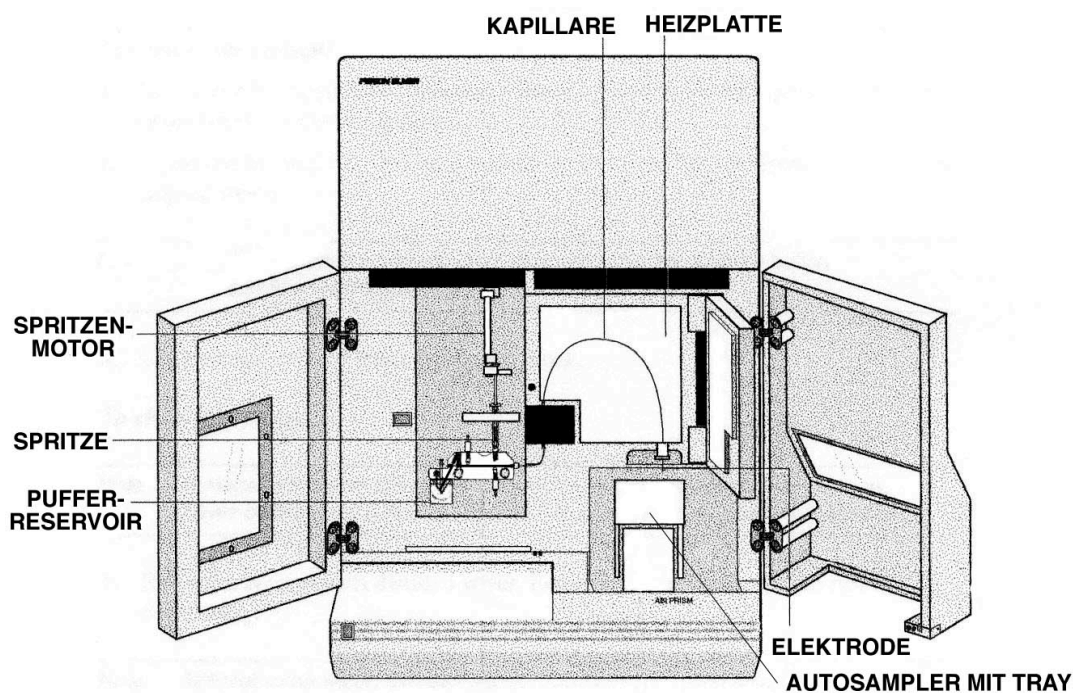


Abbildung 6: Sequenziergerät ABI Prism 310. Die Kapillare taucht in die Probe und läuft entlang einer Heizplatte an der Laser/CCDKamera-Einheit zu einem Kunststoffblock. Der Block ist mit feinen Kanälen durchzogen, an denen eine Spritze mit Gel angeschlossen ist. An den Enden der Kapillare sind Elektroden angebracht, so dass Strom durch die Kapillare fließt und die elektrophoretische Auftrennung der Einzelstränge erzielt wird. Die Kapillare hat im Bereich der Detektionseinheit ein Fenster, das von den Einzelsträngen passiert wird. Trifft der Laserstrahl auf einen Farbstoff, wird dieser zu Emission eines für ihn typischen Lichtquants angeregt. Die gemessenen Signale werden von einer Rechneinheit gesammelt und mittels Software ausgewertet. Die CCD-Kamera ist im Inneren des Gehäuses verborgen.

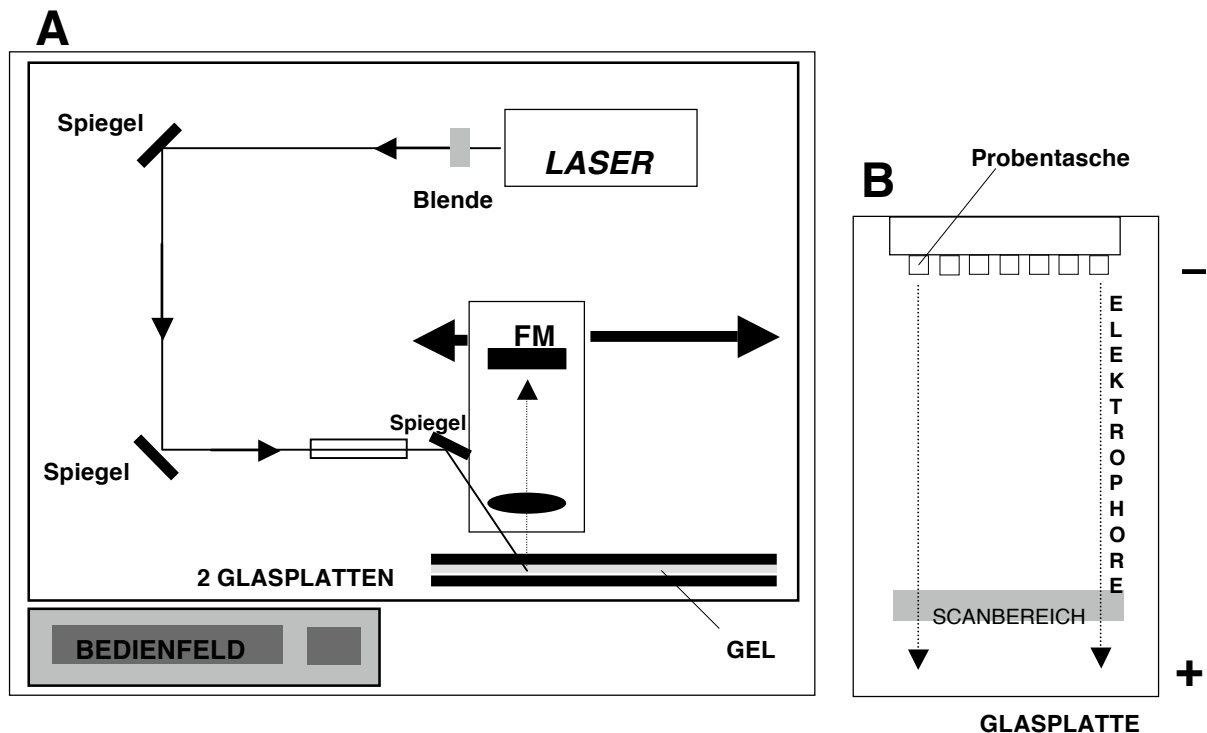


Abbildung 7A: ABI 373A Sequenziergerät. Aufsicht von oben: Das Gerät beinhaltet die Elektrophorese und Detektionseinheit. Ein Argonlaser (488-514 nm) erzeugt einen Laserstrahl, der durch drei Spiegel in einem Winkel von 42° auf das Gel trifft. Auf einem beweglichen Schlitten befinden sich ein Spiegel und ein Filterrad (diskriminiert die einzelnen Farben), sowie der Photomultiplier (FM). Dieser wandelt das reflektierte Lichtsignal in ein digitales Signal um. Der Laser tastet das Gel alle 1,5 s in der Horizontalen ab. Trifft der Laser auf ein $3'$ -markiertes DNA Fragment, so wird der Farbstoff angeregt und emittiert eine Sekundärstrahlung. Diese wird mit einer Linse fokussiert, durch ein Filterrad geleitet und vom Multiplier aufgenommen. Die Daten werden vom Computer mittels einer Software analysiert.

Abbildung 7B: Glasplatten mit Acrylamidgel. Ansicht von vorne: Die in den Taschen befindlichen farbstoff-markierten PCR-Amplifikate migrieren in der Elektrophorese durch das zwischen den Glasplatten befindliche Acrylamidgel. Im Scanbereich detektiert der Laser die wandernden Farbstoffe. Für die Elektrophorese wird oben und unten an den Glasplatten ein Pufferbad angeschlossen, in das die Anode und Kathode eintauchen.

3.6.3 Fluoreszenz-Farbstoffe

Für die Sequenzierung mit den Geräten ABI 373A und ABI Prism 310 werden anstelle der von Sanger verwendeten radioaktiv markierten Basen, Rhodamin-markierte ddNTP's verwendet, wobei das Farbstoffmolekül Rhodamin an das $3'$ -Ende eines Didesoxy-Nukleotidtriphosphates (ddNTP) gekoppelt ist. Entsprechend der vier Basen A, C, T, G entstehen durch chemische Modifikation des Grundge-

rüstes des Rhodaminmoleküls vier Farbstoffe, von denen jeder nach Anregung durch einen Laserstrahl Licht in einem definierten Wellenlängenbereich emittiert. Nachfolgend sind die Basen-Rhodaminmolekül-Verbindungen ihren emittierenden Wellenlängenbereichen zugeordnet (Tab. 8).

Tabelle 8: Sequenzierung-Fluoreszenz Farbstoffe und ihrer Charakteristika.

Farbstoff	Bezeichnung	Base	Emissionsmaximum	Farbe
5-Carboxyrhodamin 6G	JOE	Adenin	555 nm	grün
5-Carboxyrhodamin 110	TAMRA	Guanin	535 nm	gelb
6-Carboxytetramethyl-rhodamin 6G	ROX	Thymin	580 nm	rot
6-Carboxyrhodamin X	FAM	Cytosin	605 nm	blau

Im Falle der Big Dye Terminatoren des Systems ABI Prism 310, ist an das ddNTP-Rhodaminmolekül ein zusätzlicher Fluoreszenz-Farbstoff (Fluorescein) gekoppelt. Wird das Fluorescein durch Laserlicht angeregt, überträgt dieser seine Energie auf den Rhodamin-Farbstoff, wodurch vermehrt Lichtquantenemittiert werden (engl. *energy transfer*) (JU et al. 1995). Aufgrund der stärkeren Lichtemission ist mit den Big Dye Terminatoren eine spezifischere und sensitivere Auswertung möglich.

3.6.4 Sequenzierprimer

Die Sequenzierung der Exone 1, 2, 3, 7, 8 erfolgte mit den gleichen Primern der 1. PCR (Tabelle 10). Für die Sequenzierung des Exon 9 wurden zusätzlich 2 weitere interne Sequenzierprimer verwendet. Das ist notwendig, da sonst die Amplifikat-längen (Exon 9 hat eine Länge von 720 Bp) die Lesekapazität des Sequenziergerätes überschreiten. Die Kapazität einer sicheren Detektion liegt bei einer Länge von maximal 550-600 Basenpaaren. Nach der 1.PCR für das Exon 9 wird eine

Amplifikatlänge von 720 Basen erreicht. Mit den internen Sequenzierprimern erreicht man kleinere Amplifikatlängen, die unter der maximalen Detektionsweite des Gerätes liegen.

3.6.5 Taq Cycle Sequencing-Reaktionsansatz

Für die beiden Systeme wurden unterschiedliche, den Detektionssystemen entsprechende Terminatoren-Kits verwendet. Für das System ABI 373A wurde ein Terminatoren-Mix der Fa. Amersham/Pharmacia angewendet, für das System ABI Prism 310 ein Terminatoren-Mix der Fa. PE Applied Biosystems. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert. Der Ansatz wurde bei 90 °C in den Thermocycler gestellt (Hot Start). Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema auf Eis pipettiert:

- 13 µl HPLC Wasser
- 4 µl Big Dye Mix
- 2 µl PCR Amplifikat
- 1 µl Sequenzierprimer (Konz. 5 pM)

3.6.6 Thermocycler-Programm

Für beide Systeme wurde dasselbe PCR-Programm verwendet.

Tabelle 9: Programm des Taq Cycle Sequencing.

PC-Taq Cycle	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95 °C	30 sec
2. Denaturierung	96 °C	10 sec
3. Anlagerung	50 °C	10 sec
4. Verlängerung	60 °C	3 min
Schritte 2.-4. 24x wiederholen		

3.7 Ethanolfällung

Das gesamte PCR Produkt wird über eine Ethanolfällung aufgereinigt. Es wurden 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße beschriftet. Der 20 μ l Reaktionsansatz wurde mit 80 μ l HPLC Wasser, 10 μ l NaAc (3 M) und 250 μ l Ethanol (99 %) in dem Eppendorf-Gefäß gemischt, für 2 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 15.000 UpM zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet vorsichtig mit 250 μ l Ethanol 70 % gewaschen. Es wurde nun für 5 min bei 15.000 UpM zentrifugiert und der Überstand abermals vorsichtig abpipettiert. In der zuvor aufgeheizten Vakuumzentrifuge wurde das Pellet für etwa 10 min getrocknet. Während des Trocknens wurde die Heizung abgeschaltet, da Hitzeeinfluss die Farbstoffe schädigt.

3.8 Lösen des Pellets

3.8.1 Sequenziergerät Modell ABI 373A

Das getrocknete Pellet wurde mit 5 μ l Formamid (Löse- und Denaturierungsdetergenz) gelöst. Vor dem Beladen wurde das gelöste Amplifikat für 2 min bei 95 °C auf einem Heizblock denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

3.8.2 Sequenziergerät ABI Prism 310

Das getrocknete Pellet wurde sorgfältig in 4 μ l Formamid oder 20 μ l TSR Puffer gelöst und für 90 s bei 95 °C denaturiert. Der TSR Puffer besitzt ausreichende denaturierende Eigenschaften, in dem die doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert. Das gelöste Pellet wurde in spezielle 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die zum Schutz vor Austrocknung mit einem Gummiseptum verschlossen wurden.

3.9 Herstellung des Elektrophoresegels und Laufpuffers

3.9.1 System ABI 373A

Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasplatten sorgfältig und nacheinander mit dem Detergenz Edisomit, Isopropanol und HPLC Wasser gereinigt und bei Raumtemperatur getrocknet. Vor dem Zusammensetzen beider Platten wurden diese auf Reinheit im Sequenzer überprüft und gegebenenfalls nachgereinigt. Vor dem Gießen wurden die Glasplatten mit einem dazwischen liegenden 0,4 mm-Abstandshalter zusammengelegt und mit Klammern fixiert. Für das Gel wurden 23,5 ml HPLC Wasser, 30 g Harnstoff und 10 ml TBE-Puffer bei 50 °C vollständig zu Lösung gebracht. Danach erfolgte die Zugabe von 9 ml Acrylamid sowie eine Vakuumfiltration. Nach Zugabe von 45 μ l Temed sowie von 400 μ l APS wurde die Lösung kurz geschwenkt und das Gel unter Vermeidung von Blaseneinschlüssen zwischen die Glasplatten gegossen. Abschließend erfolgte das Einsetzen des 36-Well-Taschenkamms. Die Polymerisation des Elektrophoresegels war nach 2 Stunden abgeschlossen. Der Laufpuffer wurde vor jedem Lauf neu angesetzt.

3.9.2 System ABI Prism 310

Das Elektrophoresegel in der Kapillare ist ein Fertiggel („POP 6-Polymer“, Lagerung bei 4 °C), welches von der Fa. PE Applied Biosystems angeboten wird. Das Polymer wurde in eine Hamilton-Spritze (1 ml) blasenfrei aufgezogen. Der Analyse-Laufpuffer („310 Genetic Analysis Buffer 10x“) ist ebenfalls als Fertigprodukt zu beziehen. Elektrophoresegel und Laufpuffer müssen nicht vor jedem Lauf neu angesetzt werden, sollten aber nach etwa 150 Proben gewechselt werden.

3.10 Elektrophoreseparameter

Die Sequenziergeräte besitzen unterschiedliche Einstellungen für die Elektrophorese und Fluoreszenz-Detektion. Die Einstellungen wurden für beide Sequenziergeräte unabhängig voneinander mit Referenzproben optimiert und validiert.

3.10.1 System ABI 373A

Elektrophoreseparameter:

- Filtereinstellung: Filter-set A
- Leistung: 20 mW
- Elektrophoresetemperatur: 38 °C
- Laufzeit: 8 Stunden
- Laufpuffer: TBE Puffer (900 ml Aqua dest. plus 100 ml 10x TBE-Puffer)

3.10.2 System ABI Prism 310

Elektrophoreseparameter:

- Kapillare: kurze Kapillare (grün), Länge 47 cm, Durchmesser 75 μm
- Matrix: Seq POP 6 Rapid E
- Softwareeinstellung: Dye Set Any Primer
- Einzugszeit: 50 s
- Einzugsspannung: 2000 Volt
- Laufspannung: 15000 Volt
- Laufzeit: Die Elektrophoresedauer ist abhängig von der Länge des Amplifikates. Laufzeiten zwischen 18 min (bis 250 Bp, z.B. Exon 6) und 40 min (600 Bp, z.B. Exon 4 und 5) wurden verwendet.

3.11 Auswertung der Sequenzierdaten

Die Auswertung erfolgte mittels einer Analyse-Software, die den gesammelten und berechneten Rohdaten die passenden Basen A, C, G, T zuordnet. Die Zuordnung wurde in Form eines Elektropherogramms dargestellt. Die Sequenzanalyse-Software („Sequence-Analysis 3.0“) beschneidet den Anfang und das Ende der Basensequenz. Die beschnittene Sequenz wurde in dem Programm „Sequence Navigator“ mit ihrer Gegenstrang-Sequenz (vorwärts und rückwärts) untereinander geladen und mit der Foster-Konsensussequenz verglichen. Die entstandene Vergleichssequenz (Schattensequenz) zeigte die Sequenzunterschiede („Mismatch“) zum Wildtyp in Form von Sternen an. Übereinstimmungen wurden in Form von Querstrichen markiert. Mismatches können im entsprechenden Allel homozygot oder heterozygot sein. Die genaue Basenposition wurde dann auf die Positionierung nach der „Foster-Wildtypsequenz“ übertragen. Fand sich bei diesem Vergleich ein Mismatch, wurde dieser mit der Datenbank von 1995 für PC-Mutationen ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Primerdesign und Amplifikation des PC-Gens mittels PCR

Aufgrund der Anzahl von 9 Exone des PC-Gens ergibt sich eine theoretische Anzahl von 9 Primerpaaren (9 Vorwärts- und 9 Rückwärts-Primer). Da die Exone 4 und 5 zusammen amplifiziert wurden, reduzierte sich die Anzahl der Primerpaare von 9 auf 8, da die Exone 4 und 5 zusammen amplifiziert werden. Die Exone 1,2 und 8 wurden mit Primern nach Reitsma *et al.* (REITSMA 1991), die Exone 3, 7 und 9 mit Primern nach Witt *et al.*, amplifiziert (WITT 1994). Das Exon 6 wurde mit Primern nach Soria *et al.* amplifiziert (SORIA *et al.* 1995). Für die Exone 4 und 5 konnte mit einem von Reitsma *et al.* veröffentlichten Primerpaar keine befriedigende PCR Amplifikat erzielt werden.

Mittels eines Primer-Design Programms (Primer Express 1.0, Fa. PE Applied Biosystems) wurden daher verschiedene Primerpaare ausgewählt, mit welchen sich die Exone 4, 5 und 6 zusammen amplifizieren ließen. Hierzu wurde die entsprechende Zielsequenz aus dem Internet geladen. Die Sequenzsuche erfolgte über die Online-Datenbank „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>“. Über den Link „Nucleotide“ erfolgt die Eingabe des Suchbegriffes „Protein C and cds“ und das Herunterladen der Sequenz. Die geladene Sequenz konnte nun im Primersuchprogramm bearbeitet werden. Mehrere Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden ausgewählt.

In der experimentellen Phase wurden die einzelnen Vorwärtsprimer zusammen mit ihren Rückwärtsprimern getestet, als auch untereinander gekreuzt. Hiervon konnten schließlich zwei Primerpaare (267F-R3 und 286F-R3) ausgewählt werden, welche nach PCR und elektrophoretischer Auftrennung im Gelbild stringente PCR-Banden ergaben. Die Spezifität des Amplifikates wurde sequenzanalytisch im Sequenzierautomaten überprüft. Das PCR-Amplifikat für das Exon 4-5 hat eine Länge von 546 bzw. 527 Basenpaaren.

Die Optimierung des Temperaturprofils des Thermocycler Programms wurde für die Primerpaare anhand der visuellen Beurteilung der Amplifikatbande des Gelbildes optimiert. Kriterien hierfür waren Bandenstärke, Doppelbanden, unspezifische Extrabanden und die korrekte Bandenhöhe.

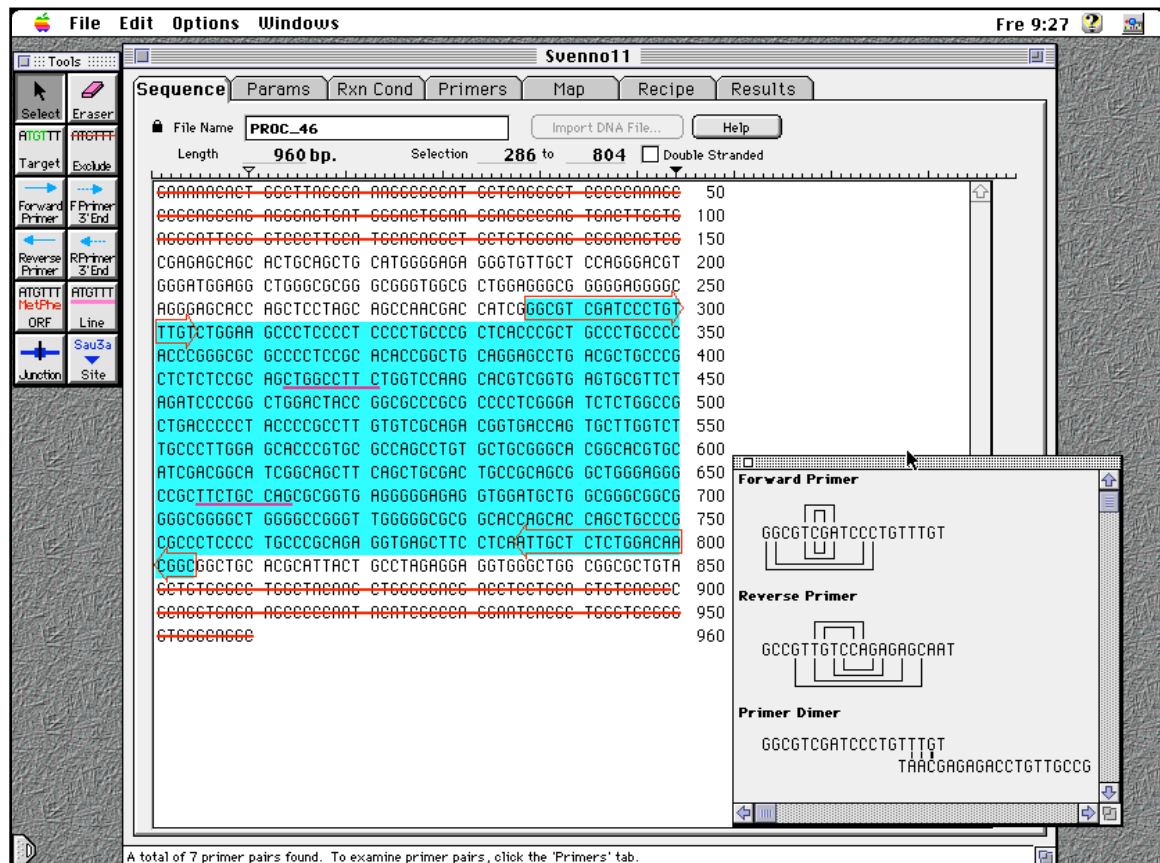


Abbildung 8: Darstellung einer gefundenen Primerpaarung mittels Primer Express 1.0. Das blau markierte Feld zeigt das Amplifikat mit den einrahmenden Primern (rote Pfeile). Rechts unten sind in dem kleinen Fenster intramolekulare Bindungen sowie die Dimer-Bildung zwischen beiden Primern zu erkennen. Je weniger intramolekulare Bindungen und Primerdimer-Bildungen sich aus einer Primersequenz berechnen lassen, desto affiner ist theoretisch die Bindung des Primers an die Zielsequenz.

Die zusammengestellten Primerpaare für die PCR sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Bezeichnungen der Primer richten sich nach den Namen der Exone, die sie flankieren:

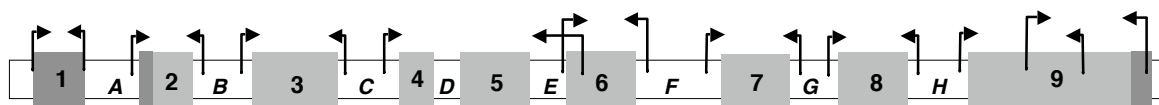


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Lage der Primer. Die Spitze der Pfeile markiert die Amplifikationsrichtung. Exon 4 und 5 werden zusammen amplifiziert. Für das Exon 9 existieren 2 zusätzliche interne Sequenzierprimer. Die untranslatierten Bereiche sind dunkelgrau markiert.

Tabelle 10: Primersequenzen.

Primerbezeichnung	Exon	Oligosequenz 5'-3'	Richtung	Primer 1.PCR	Sequenzierprimer	Startpunkt (Pos.)	Autor
PC 1F	1	GTG CTA GTG CCA CTG TTT GT	vorwärts	x	x	-1590	Reitsma
PC 1R	1	ATC ACC ACC TAG CTC TCT TC	rückwärts	x	x	-1371	Reitsma
PC 2F	2	ACT GCC CGG AGC TCA GAA GT	vorwärts	x	x	-50	Reitsma
PC 2R	2	ATG CCA CCA GGG CCT TGT AG	rückwärts	x	x	130	Reitsma
PC 3F	3	TCG TCC TCC AAC TGC CAT CT	vorwärts	x	x	1128	Witt
PC 3R	3	ATC CTA ATC GCT CCA CTC AG	rückwärts	x	x	1636	Witt
PC 4-5F	4, 5	TAG CAG CCA ACG ACC ATC G	vorwärts	x	x	2816	Schmidt
PC 4-5R	4, 5	CGT GCA GCC GCC GTT G	rückwärts	x	x	3363	Schmidt
PC 6F	6	GCA CCA GCA CCA GCT GCC CG	vorwärts	x	x	3281	Soria
PC 6R	6	CAG CGT GAT TCC TGG GCG AT	rückwärts	x	x	3492	Soria
PC 7F	7	GAC CAA GAC AGG AGG GCA GT	vorwärts	x	x	6055	Witt
PC 7R	7	TTG CGT CCA TCT TTC CCT GA	rückwärts	x	x	6425	Witt
PC 8F	8	CTA AGC CTA TGC CCA TAT GA	vorwärts	x	x	7022	Reitsma
PC8R	8	AAG AAG CCT CTT GCT TAA GC	rückwärts	x	x	7370	Reitsma
PC 9F	9	TCA GGA AAG TGC CAC TGG GGA	vorwärts	x	x	8321	Witt
PC 9R	9	AGG CCG GTG TGC TTG TTA CAT	rückwärts	x	x	9053	Witt
PC 4-6R	4, 5, 6	CTC CCT AGA AAC CCT CCT GA	rückwärts	x		3555	Reitsma

Die PCR-Produkte wurden nach der Elektrophorese in Form eines Gelbildes dokumentiert. Als interne Kontrolle diente ein 123 Bp Basenleiter. Exemplarisch wird in Abbildung 10 das Bandenmuster der Amplifikate dargestellt.

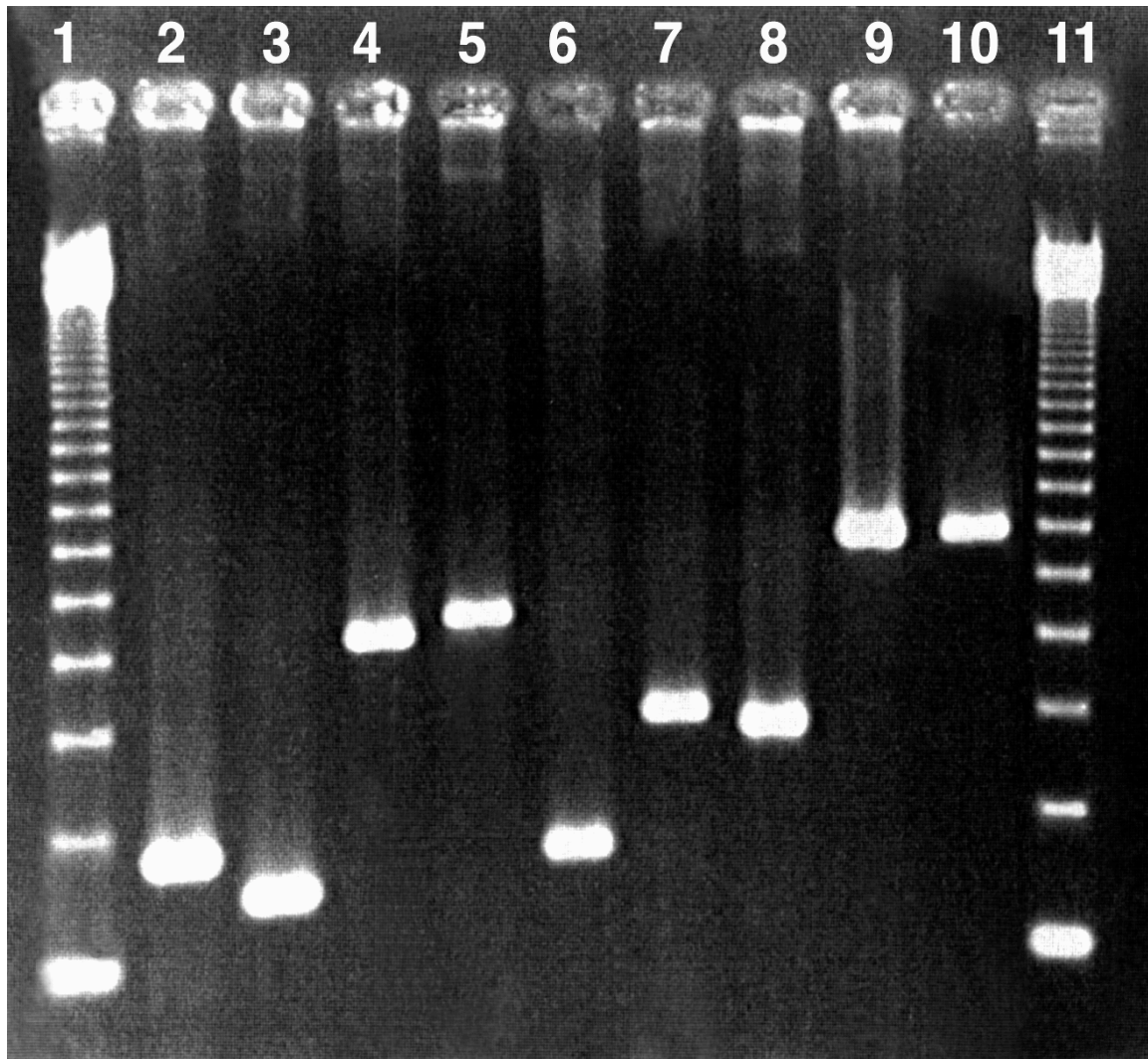


Abbildung 10: Beispiel eines Gelbildes mit Darstellung der amplifizierten Exons. Das kleinste Amplifikat ist das Exon 2, das größte ist das Exon 4-6. Lane 1: 123 Bp-Längenstandard mit 123 Bp und ganzzahligen Vielfachen davon, Lane 2: Exon 1 (220 Bp), Lane 3: Exon 2 (180 Bp), Lane 4: Exon 3 (508 Bp), Lane 5: Exon 4-5 (527 Bp), Lane 6: Exon 6 (222 Bp), Lane 7: Exon 7 (370 Bp), Lane 8: Exon 8 (349 Bp), Lane 9: Exon 9 (731Bp), Lane 10: Exon 4-6 (739 Bp).

4.2 Zusammenfassung der Sequenzierergebnisse

Alle der insgesamt 43 sequenzierten PC-Gene aus Kontroll- und Patientengruppe erbrachten auswertbare Sequenzen. Polymorphismen ließen sich sowohl in der Gruppe der Patienten als auch in der Kontrollgruppe finden (Abb. 11). Mutationen im Bereich der kodierenden Exons waren nur in der Patientengruppe zu finden. Gefundene Mutationen wurden durch Wiederholung der Sequenzierung bestätigt.

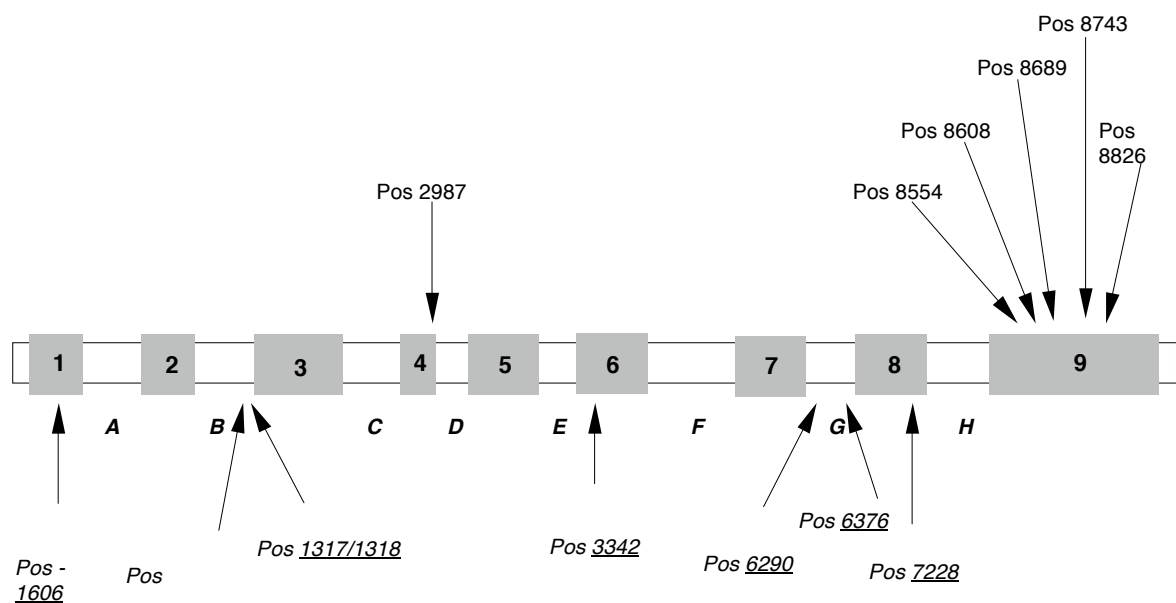


Abbildung 11: Darstellung der gefundenen Polymorphismen und Mutationen im PC-Gen.

Die Exons 1-9 sind als grau markierte Flächen dargestellt. Dazwischen liegen die 8 Introns A-H. Die mutierten Basenpositionen sind oben dargestellt. Die *kursiv* beschrifteten Positionen der Positionen zeigen die Polymorphismen an (unten). Die Positionsbezeichnung bezieht sich auf die Foster-Sequenz.

4.2.1 Polymorphismen in den Exons und Introns des PC-Gens

Es wurden vier verschiedene Polymorphismen im PC-Gen der Patienten- und Kontrollgruppe gefunden (Tabelle 11). Einer lag im Bereich der 5' untranslatierten Region (Promotorregion) des Exon 1 (Position -1476). Die anderen Polymorphismen lagen im Exon 6 (Position 3342), Exon 8 (Position 7228) und Intron G (Position 6376). Die Polymorphismen waren an den Positionen entweder homozygot oder heterozygot. Ein beschriebener Polymorphismus im Exon 9 (Position 8480) konnte nicht nachgewiesen werden (TSAY et al. 1994).

Tabelle 11: Zusammenfassung der identifizierten Polymorphismen im PC-Gen aus Kontroll- und Patientenproben.

Exon/ Intron	DNA Position	AS-Nummer Codon	Mutation	Amino- säure- austausch	Genotyp	Anzahl in Kontroll- gruppe	Anzahl in Patienten- gruppe	Σ = Kontrolle+ Patienten
1	-1476	kein	A->A/T	kein	heterozygot	7	17	24
1	-1476	kein	A->T	kein	homozygot	2	9	11
6	3342	99 TCT (Ser)	TCT->TCG/T	kein	heterozygot	3	9	12
6	3342	99 TCT (Ser)	TCT->TCG	kein	homozygot	0	6	6
F	6376	kein	G->G/T	kein	heterozygot	4	9	13
F	6376	kein	G->T	kein	homozygot	0	1	1
8	7228	214(Asp)	GAT->GAT/C	kein	heterozygot	8	10	18
8	7228	214(Asp)	GAT->GAC	kein	homozygot	1	1	2

4.2.2 Polymorphismus Exon 1

Im Exon 1 (Position -1476) hatten 7/10 in der Kontrollgruppe anstelle der Nukleotidbase A eine Heterozygotie (A->A/T), 2/10 eine Homozygotie (A->T) und 1/10 hatte die Wildtypsequenz (A). In der Patientengruppe waren 17/34 heterozygot und 9/34 homozygot für den Polymorphismus; 8/34 Patienten hatten die Wildtypsequenz. Exemplarisch ist in Abbildung 12 das Elektropherogramm für den Polymorphismus im Exon 1 dargestellt.

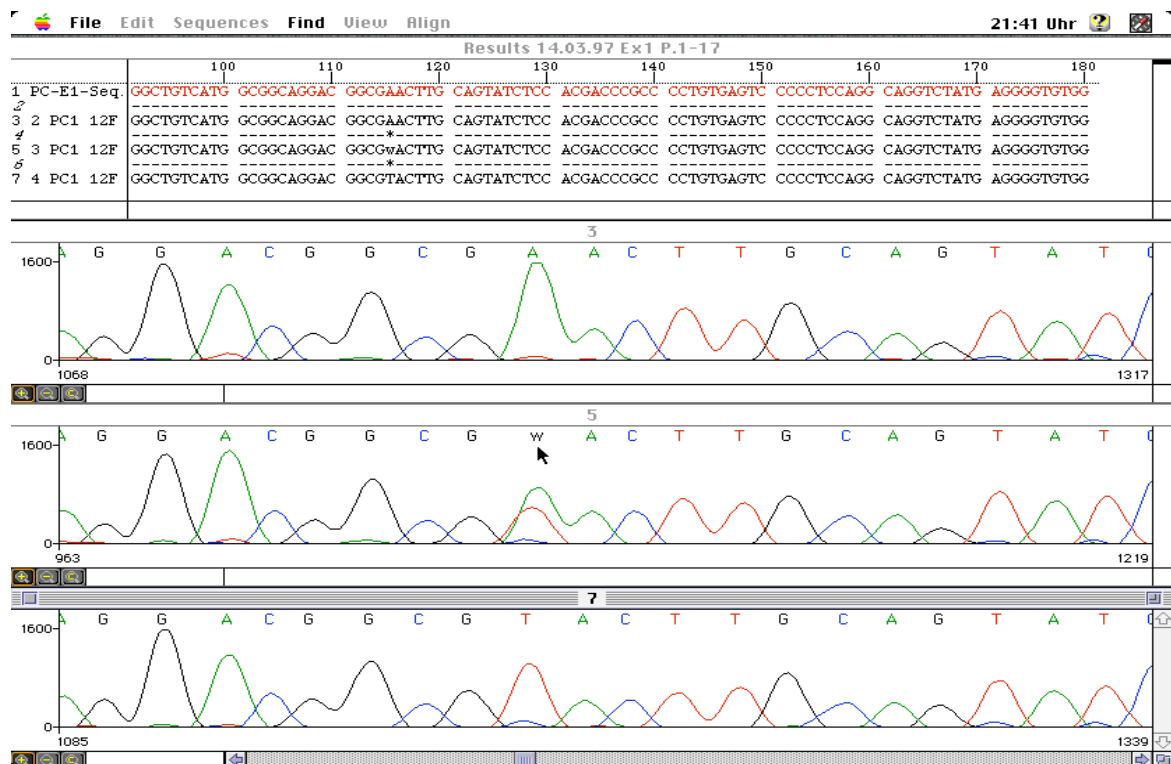


Abbildung 12: Polymorphismus im Exon 1 an Position -1476. Im oberen Teil ist in rot die Konsensussequenz sowie der heterozygote und homozygote Polymorphismus (Kennzeichnung mit *) dargestellt. Die Auswerteposition 115 entspricht der Position -1476 nach Foster *et al.* Im unteren Teil zeigen die Elektropherogramme analog Konsensussequenz, heterozygoter und homozygoter Polymorphismus. Der Mauszeiger zeigt auf die entsprechende Base.

4.2.3 Polymorphismus Exon 6

Im Codon 99 des Exon 6, an der Nukleotidposition 3342, hatten in der Kontrollgruppe 3 von 10 einen heterozygoten Polymorphismus (99Ser TCT->TCG/T Ser). Ein homozygoter Genotyp konnte nicht festgestellt werden. Die Patientengruppe

zeigte in 9 Fällen eine Heterozygotie, wogegen in 6 Fällen eine Homozygotie festgestellt werden konnte. 19 Patienten hatten die Wildtypsequenz (TCT).

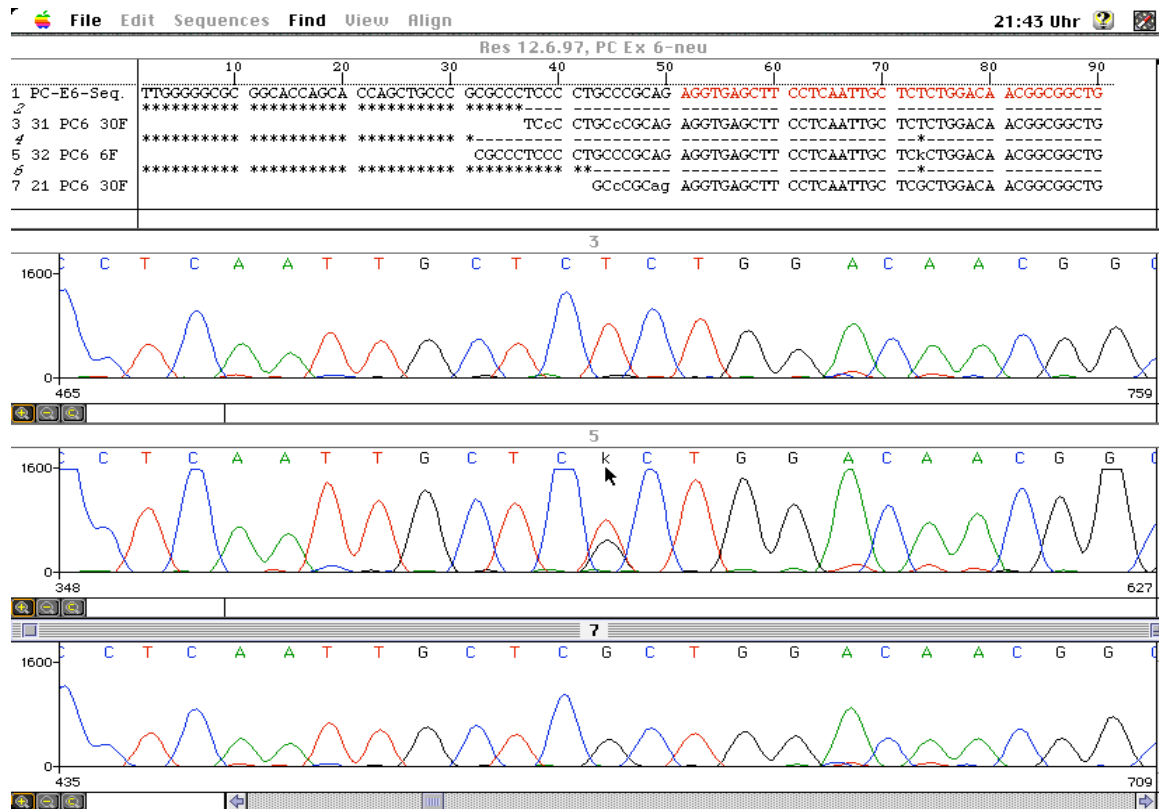


Abbildung 13: Polymorphismus im Exon 6 an Position 3342. In der oberen Hälfte der Abbildung sind die polymorphen Positionen durch Sterne überhalb der betroffenen Nukleotide (Auswerteposition 74) markiert. Die Auswerteposition 74 entspricht der Positionen 3342 nach Foster *et al.* Linke obere Bildhälfte: Sequenz „1“ ist die Vergleichssequenz und stellt den Wildtyp dar, „3“ = Wildtyp, „5“ = heterozygote Mutante, „7“ = homozygote Mutante. In der unteren Hälfte sind die Elektropherogramme einer Sequenzierrichtung mit der betreffenden polymorphen Stelle gezeigt.

4.2.4 Polymorphismus Exon 8

Im Exon 8, an der Position 7228 hatten in der Kontrollgruppe 8 von 10 eine Heterozygotie (214Asp GAT->GAT/C Asp), wogegen nur 1 von 10 homozygot (214Asp GAT->GAC) war. In der Patientengruppe waren 10 Patienten heterozygot, 1 Patient homozygot und 23 Patienten hatten die Wildtypsequenz (GAT).

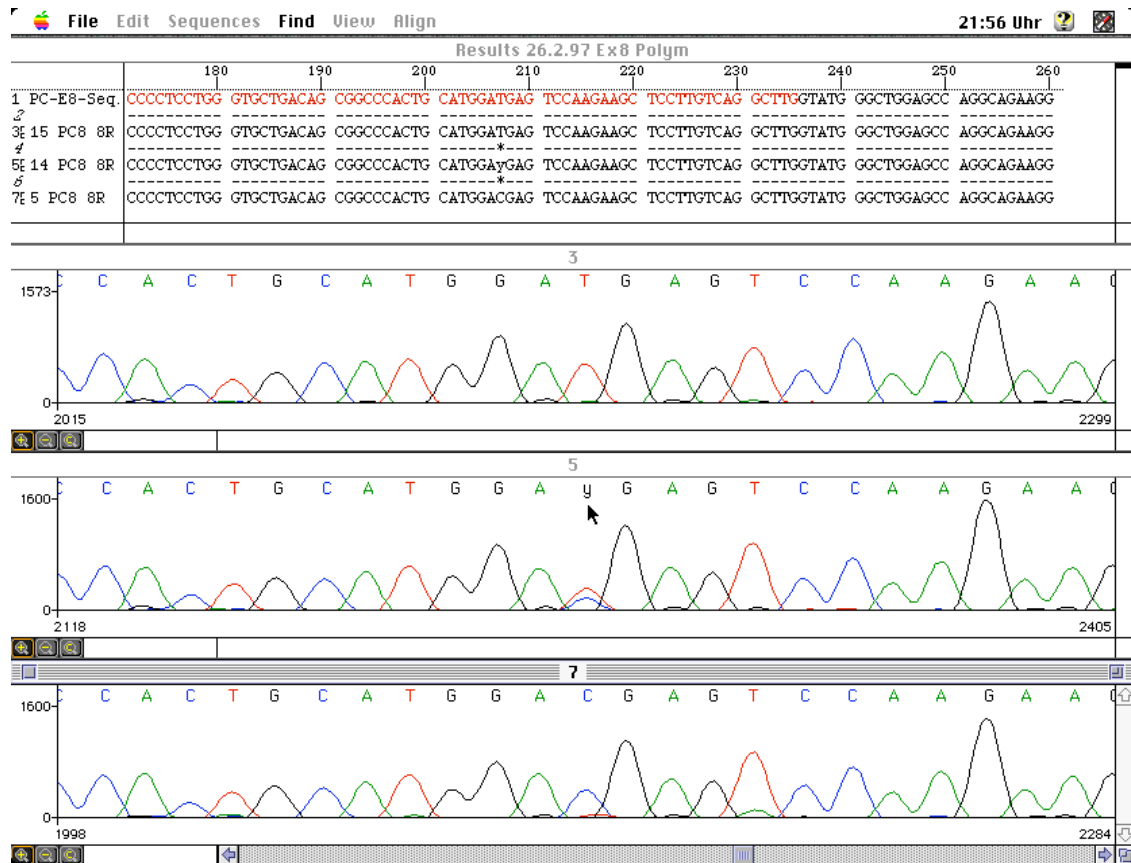


Abbildung 14: Darstellung des Polymorphismus an der Position 7228 im Exon 8. Die Darstellung ist analog zu Abb. 12 und 13.

4.2.5 Polymorphismus Intron G

Im Intron G wurde ein G/T Polymorphismus an der Position 6376 gefunden. In der Kontrollgruppe konnte bei 4 von 10, in der Patientengruppe bei 9 von 34 eine G/T-Heterozygotie festgestellt werden. Ein Patient aus dem Patientenkollektiv war für diese Position homozygot (G->T).

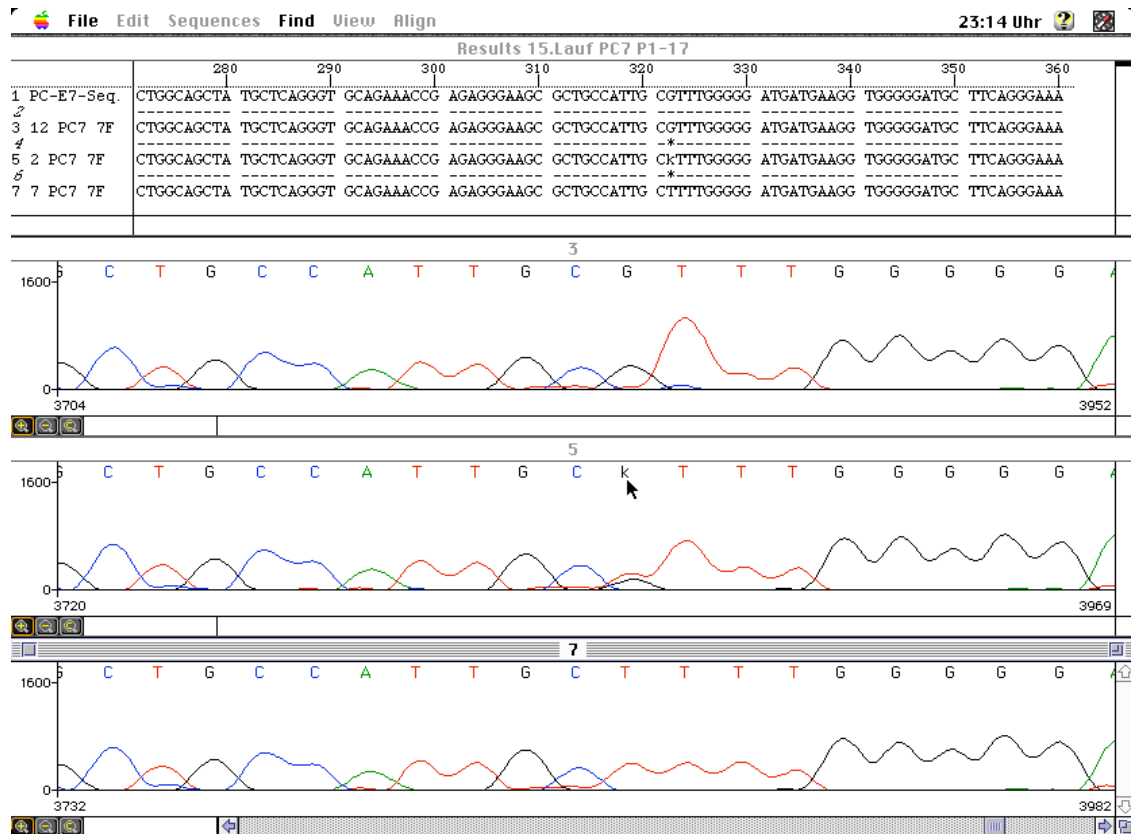


Abbildung 15: Darstellung des Polymorphismus Position 6376 im Intron G. Die Darstellung ist analog zu Abb. 12 und 13.

4.3 Mutationen in den kodierenden Exons

Neben den Polymorphismen, die sowohl in der Patienten-, als auch in der Kontrollgruppe detektiert wurden, zeigten sich nur in der Patientengruppe Mutationen. Diese lagen alle in den kodierenden Exons. Insgesamt konnte bei 11 Patienten eine Mutation detektiert werden. Bei 10 der 11 Patienten lagen die Mutationen im Exon 9. Bei einem Patienten konnte eine Mutation im Exon 4 detektiert werden. Im Exon 9 fanden sich fünf verschiedene Mutationen, und zwar an Nukleotidposition 8554, 8608, 8689, 8743 und 8826 (Tab. 12). Familiär auftretende Mutationen konnten in drei Fällen nachgewiesen werden. Die Mutation an Position 8608 konnte sowohl bei einer Mutter und ihrer Tochter als auch bei einer mit

diesen nicht verwandten, dritten Patienten detektiert werden. An der Position 8826 zeigte sich eine Mutation bei drei Mitgliedern einer Familie. In Tabelle 12 sind die Sequenziererergebnisse für die Exons zusammengefasst. Im Folgenden werden die Sequenziererergebnisse mit den Elektropherogrammen genauer dargestellt.

Tabelle 12 : Zusammenfassung der Mutationen in den Exons des PC-Gens.

Exon	DNA Position	AS-Nummer Codon	Mutation	Aminosäureaustausch	Genotyp	Anzahl in Kontrollgruppe	Anzahl in Patientengruppe
4	2987	46 GAC(Asp)	GAC->G/AAC	Asp(D)->Asn(N)	heterozygot	0	1
9	8554	280 (Asp)	GAC->GG/AC	Asp(D)->Gly(G)	heterozygot	0	2
9	8608	298 (Thr)	ACG->AT/CG	Thr(T)->Met(M)	heterozygot	0	3
9	8689	325 (Val)	GTG->GCG	Val(V)->Ala(A)	homozygot	0	1
9	8743	343 (Met)	ATG->ACG	Met(M)->Thr(T)	heterozygot	0	1
9	8826	370(Thr)	ACC->A/GCC	Thr(T)->Ala(A)	heterozygot	0	3

4.3.1 Mutation im Exon 4

Die Mutation D2487N im Exon 4 wurde bei einem Patienten gefunden, der im Rahmen eines Thrombophiliescreenings untersucht wurde. Die Anamnese des 46-jährigen Patienten bot eine spontane tiefe Beinvenenthrombose im rechten Unterschenkel (1997). Bereits im Jahre 1981 entwickelte der Patient einen cerebralen Insult mit Hemiparese links. Zu den Risikofaktoren des Patienten zählt eine medikamentös behandelte Hypercholesterinämie (Cholesterinsenker) sowie ein Nikotinabusus (15-20 Zigaretten/d). Weitere Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes, Hypertonus oder Varikosis lagen nicht vor. Die Familienanamnese bezüglich Thromboembolien war unauffällig. Tabelle 13 zeigt die Messwerte für das Thrombophiliescreening.

Tabelle 13: Laborparameter eines Patienten mit D2487N-Mutation im Exon 4.

Parameter	Patient
Protein C-Aktivität	40- bzw. 48%
Protein C-Antigen	47%
Faktor V-Leiden	Keine Mutation
Prothrombin G20210A	Keine Mutation
MTHR	Keine Mutation
Antiphospholipidantikörper IgM	normal
PAI-Modulation	gestört
Fibrinogen	normal
Antithrombin III	normal
Protein S-Aktivität	normal

Die heterozygote Mutation vom Typ einer „Missense-Mutation“ verursacht an der Position 2987 im Codon 46 (GAC) einen Austausch der Base Guanin durch Adenin. Die Heterozygotie wurde sowohl in der Vorwärts- als auch in der Rückwärtsrichtung in Form eines A/G-Doppelsignals detektiert. Die Mutation bewirkt den Austausch der Aminosäure Aspartat (**GAC**) durch Asparagin (**AAC**).

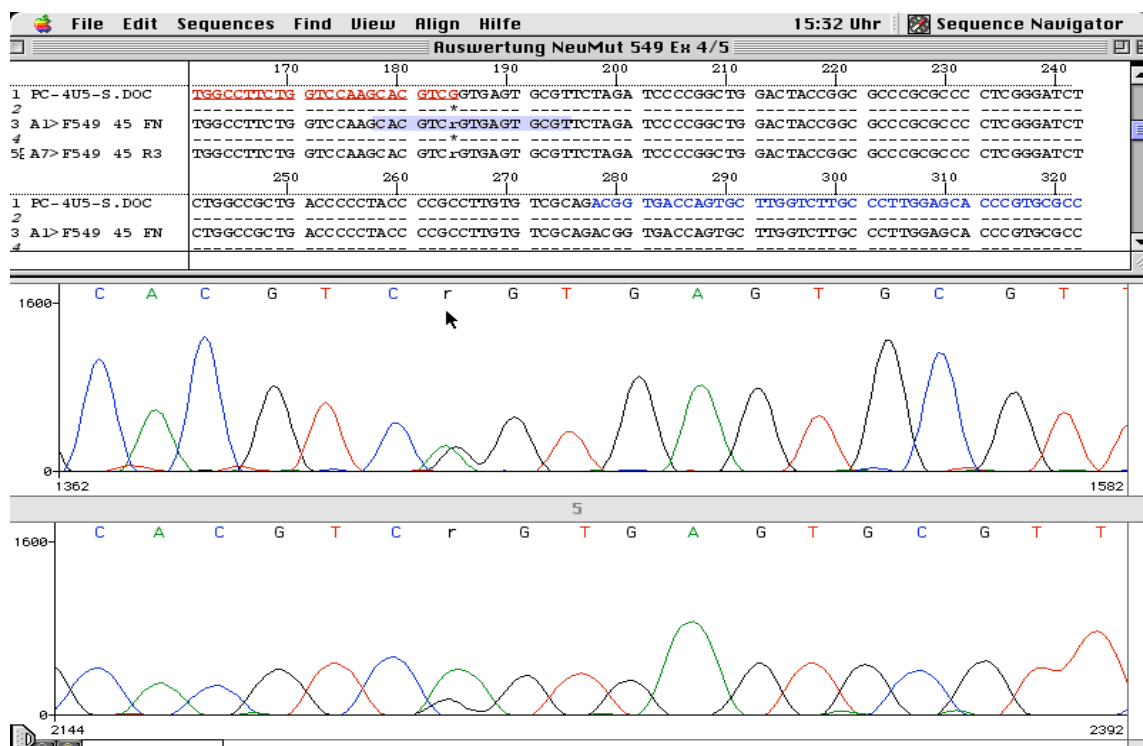


Abbildung 16, S. 55: Darstellung des Elektropherogramms beider Sequenzierrichtungen eines Patienten mit heterozygoter Missense-Mutation im Exon 4. Die mit dem Pfeil markierte Basenposition wurde mit einem „r“ (Synonym für A/G-Doppelsignal) bezeichnet. Das betroffene Codon setzt sich aus der Base Guanin am Ende des Exon 4 und den ersten zwei Basen Adenin und Cytosin des Exons 5 zusammen.

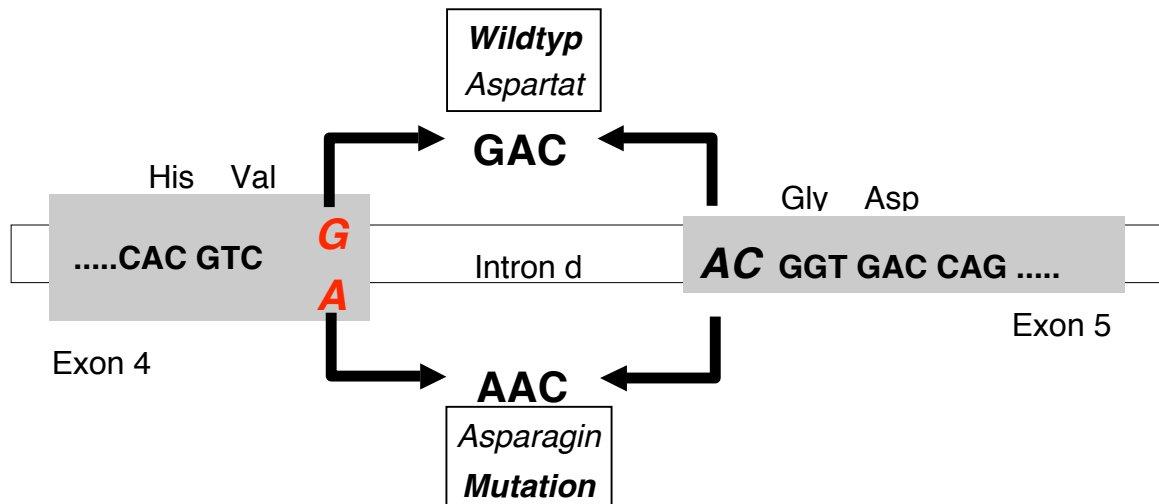


Abbildung 17: Darstellung des Aminosäureaustausches durch eine Mutation im Exon 4. Das obere Allel codiert das Codon GAC für die Wildtyp-Aminosäure Aspartat, während das andere Allel mit dem Basenaustausch G -->A für die Aminosäure Asparagin codiert.

4.3.2 Mutationen im Exon 9

Für das kodierende Exon 9 konnten 5 Mutationen gefunden werden, 3 davon waren bereits in der Datei von Reitsma *et al.* erfasst. Daneben wurden 2 Mutationen gefunden, die in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurden. Die gefundenen Mutationen konnten nur in der Patientengruppe gefunden werden. Hier ließen sich bei zehn Patienten mit Mutationen im Exon 9 fünf verschiedene Mutationen finden. Neben Polymorphismen waren dies die einzig feststellbaren Mutationen im PC-Gen dieser Patienten.

Drei der fünf Exon 9-Mutationen konnten als hereditäre Mutation beschrieben werden. Bei ausgewählten Angehörigen einer Familie wurde im Rahmen des Thrombophilie Screenings eine PC-Sequenzierung durchgeführt, wobei die entsprechende Mutante bei allen Angehörigen der Familie gefunden werden konnte.

Die heterozygote Mutation an **Position 8554**: 280(Asp)GAC->GG/AC(Gly) wurde bei einem 46-jährigen Patienten sowie seiner 18-jährigen Tochter festgestellt. Diese Missense-Mutation wurde bisher nicht beschrieben.

Die Mutation an **Position 8608**: 298(Thr)ACG->AT/CG(Met) wurde im heterozygoten Status gefunden. Sie ließ sich in drei Fällen detektieren, wobei 2 Patienten mit dieser Mutation verwandt waren (Mutter und Tochter). In der Datenbank für Protein C-Mutationen wird diese Mutation als PC-1-Vermont IIa geführt.

Bei zwei weiteren, nicht-verwandten Patienten wurden homozygote Missense-Mutationen gefunden. Die eine Mutation betrifft die **Position 8689** welche als PC-49-023 geführt wird. Die Mutation ist mit einem Typ I-Mangel assoziiert. Die Mutation bewirkt einen Austausch der Aminosäure Valin325 (GTG) durch Alanin (GCG). Die zweite homozygote Mutation betrifft die Position 8743 und ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Bei dem dritten familiären Mutationstyp wurde die Mutation an **Position 8826**: 370(Thr)ACC->A/GCC(Ala) sowohl bei einer 37-jährigen Mutter als auch bei ihren beiden Söhnen (9 und 10 Jahre) festgestellt. In der Datenbank wird diese Mutation als PC-44-AS-003 geführt.

4.3.3 Exon 9-Mutation an der Position 8554

Anamnestisch zeigten zwei Patienten (Vater und Tochter) mit Exon 9-Mutationen an Position 8554 thrombotische Ereignisse. Die Tochter erlitt im Alter von 14-Jahren eine spontane tiefe Beinvenenthrombose links. Zu den Risikofaktoren zählten Adipositas und eine seit 1,5 Jahren bestehende orale Kontrazeption. Der Vater erlitt eine einmalige spontane Thrombophlebitis am rechten Unterschenkel. Der Patient sei bisher niemals ernsthaft krank gewesen. Bisher hatte der Vater sich keinen operativen Eingriffen unterzogen. Über thrombotische Ereignisse bei weiteren Familienmitgliedern (Mutter) kann aufgrund fehlender Daten keine Aus-

sage getroffen werden. Im Rahmen der Thromophiliediagnostik wurden folgende Laborparameter bestimmt.

Tabelle 14: Gerinnungsparameter von Vater und Tochter mit Exon 9-Mutation an Position 8554 GAC(Asp) → GG/AC(Gly).

Parameter	Tochter	Vater
Protein C-Aktivität	37%	42%
Protein C-Antigen	unauffällig	unauffällig
Faktor V-Leiden	keine Mutation	keine Mutation
Fibrinogen	unauffällig	unauffällig
Antithrombin	unauffällig	unauffällig
Protein S	unauffällig	unauffällig
Lupus Inhibitor	unauffällig	unauffällig
Prothrombin G20210A	keine Mutation	keine Mutation
Homozystein	unauffällig	unauffällig

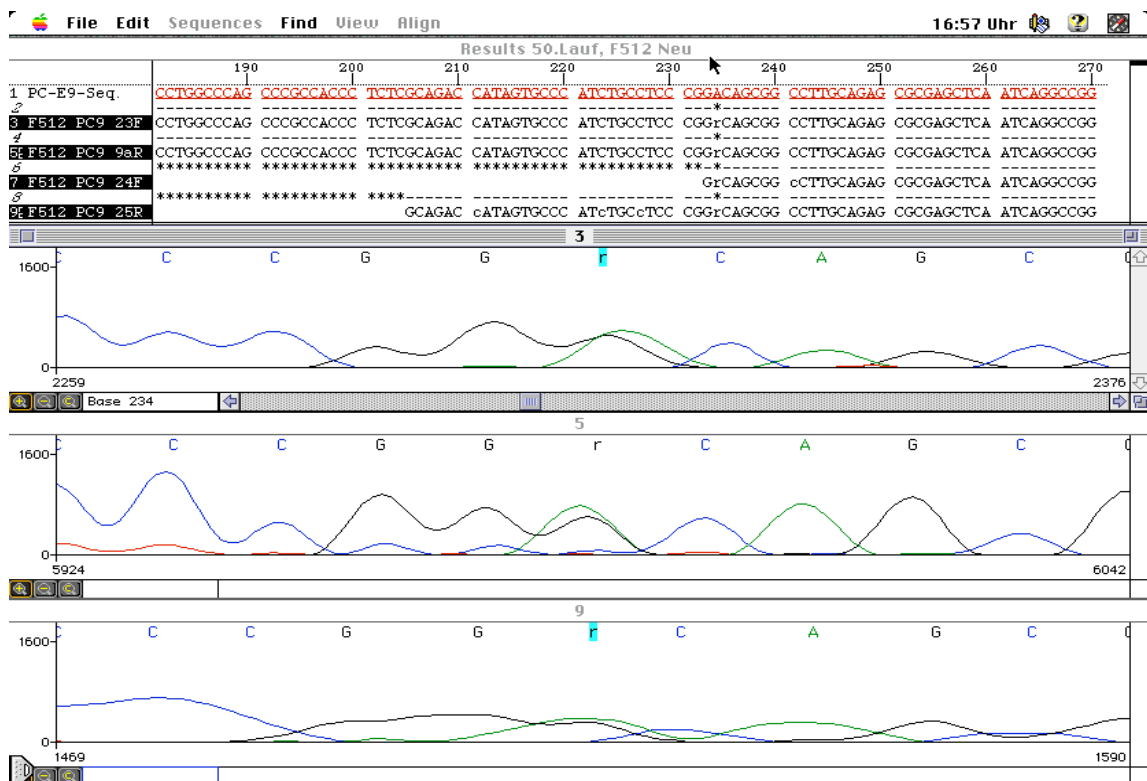
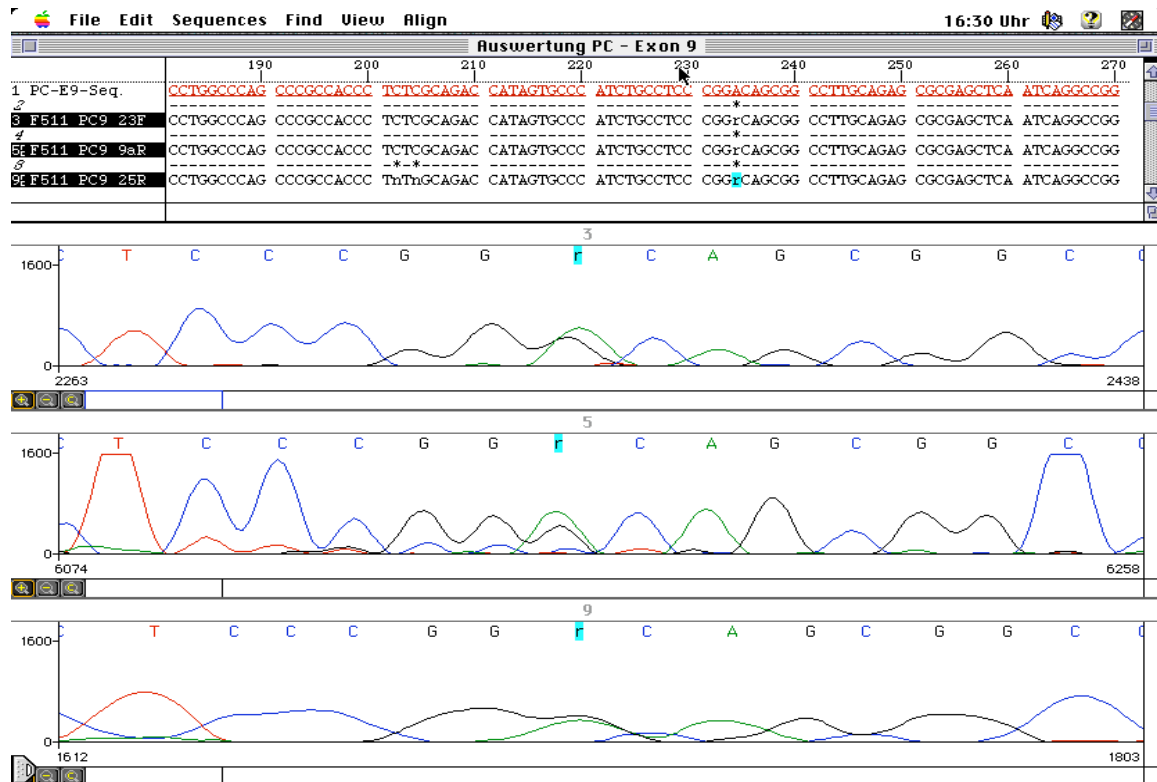


Abbildung 18 und 19: Sequenzanalyse von Exon 9 des PC-Gens von Tochter und Vater mit heterozygoter Mutation an Position 854 GAC(Asp) → GG/AC(Gly). Die Auswerteposition 234 (Exon 9, Position 854 nach Foster *et al.*) zeigt sich sowohl bei der Tochter (obiges Elektropherogramm), als auch bei dem Vater (unteres Elektropherogramm) eine heterozygote Mutation vom Typ einer Missense-Mutation. Die Mutation bewirkt im Codon 280 einen Austausch der Aminosäure GAC (Aspartat/D) zu GGC (Glycin/G).

4.3.4 Exon 9-Mutation an der Position 8608

Eine heterozygote Mutation im Exon 9 des PC-Gens an der Position 8608: 298ACG(ThrT) --> AT/CC(AlaA) konnte sowohl bei einer Mutter und ihrer Tochter, als auch bei einer weiteren, hierzu nicht verwandten Patientin gezeigt werden. Die Mutation konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben werden und ist in der Datenbank als „PC-1-Vermont IIa“ geführt.

Anamnestisch erlitt die Tochter mit oben beschriebener Mutation im Alter von 16 Jahren eine tiefe Beinvenenthrombose links bei schwerer linksseitiger Pneumonie. Mittels Dopplersonografie konnte ein Verschluss der V. iliaca externa, der V. com. fem. sowie der V. femoralis sup. diagnostiziert werden. Die Tochter wurde mit Marcumar behandelt und nach 18 Monaten schrittweise auf ASS 100 mg/d umgestellt. Seitdem blieb die Patientin klinisch unauffällig. Der Vater als auch die für Mutation heterozygote Mutter zeigten keine klinischen Auffälligkeiten. Die Urgroßmutter mütterlicherseits hatte eine Lungenembolie; sie verstarb an einem Mesenterialinfarkt. Im Verlauf der antikoagulatorischen Therapie wurden bei der Tochter die PC-Werte mehrfach gemessen. Im Akutstadium der Pneumonie hatte die Patientin PC-Aktivitätswerte um 23 %, die bei Entlassung auf ca. 50 % angestiegen waren. Der Vater lag mit seinen Werten in Normbereich. Die PC-Werte für Mutter und Tochter sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 15: Laborparameter von Mutter und Tochter mit derselben Mutation im Exon 9.

Position 8608 des PC-Gens (298 ACG(ThrT) → AT/CC(AlaA)).

Parameter	Normwerte	Mutter	Tochter
Protein C-Aktivität	77-142%	69%	23%/50%
Protein C-Antigen	80-158%	60%	26%/50%
XII-Aktivität	54-135%	91%	75%
ATIII-Aktivität	75-112%	85%	75%
Protein S-Aktivität	73-125%	92%	107%
Protein S-Antigen	67-158%	75%	132%

Plasminogen	78-137%	104%	58%
-------------	---------	------	-----

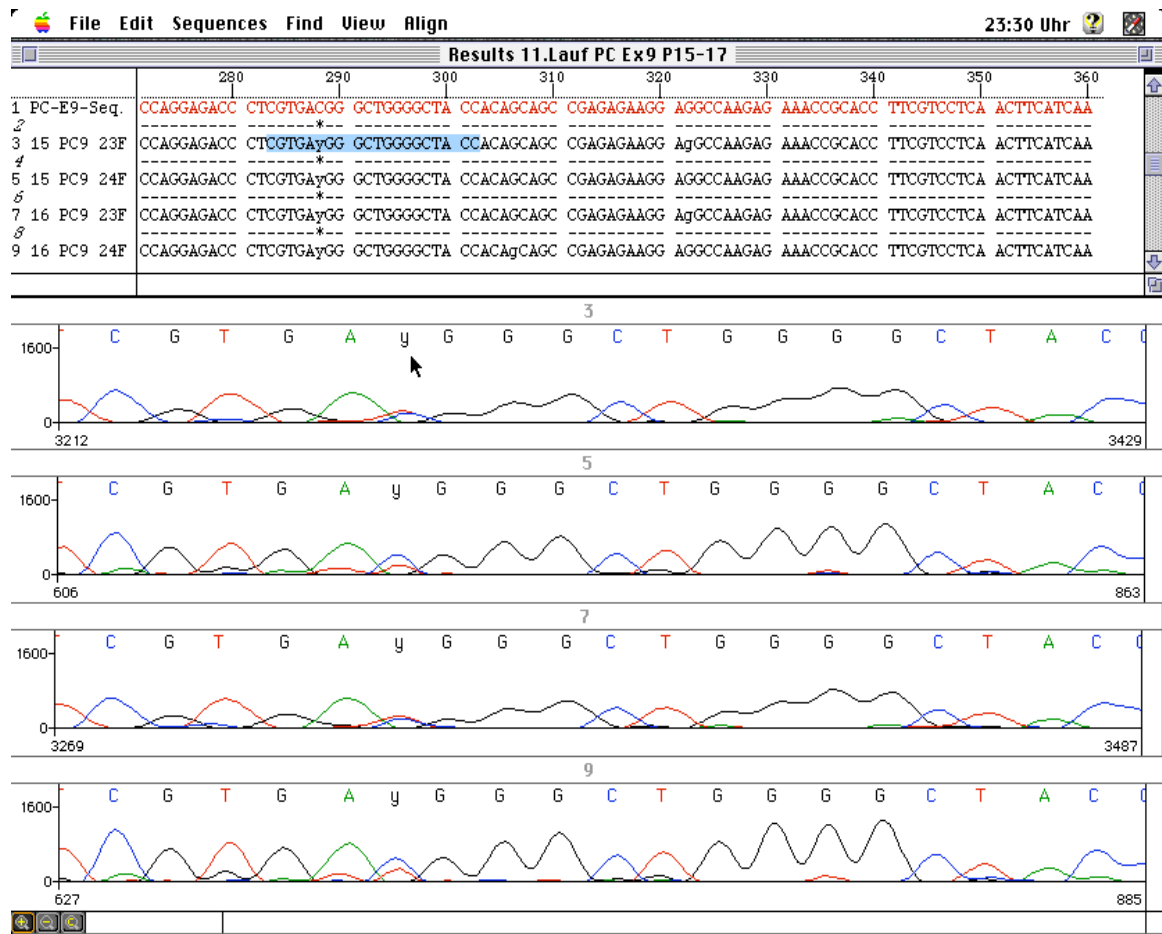


Abbildung 20: Darstellung der Mutation des PC-Gens im Exon 9 an der Position 8608. Dargestellt sind die Elektropherogramme für zwei Patienten (Mutter=„3“ und „5“, Tochter=„7“ und „9“, linke obere Bildhälfte). Die heterozygote Mutation konnte in beiden Sequenzierrichtungen nachgewiesen werden.

4.3.5 Exon 9-Mutation an der Position 8689

Bei einer Patientin wurde eine homozygote Missense-Mutation an Position 8689 des PC-Gens gefunden (Abb. 19). Die Mutation bewirkt einen Austausch der Aminosäure Valin325 (GTG) durch Alanin (GCG).

Anamnestisch zeigte die Patientin 1988 bereits am zweiten Tag nach der Geburt das Bild einer schweren rezidivierenden *Purpura fulminans*. Die Patientin entwickelte ausgeprägte Nekrosen an den Unterschenkeln beidseits sowie an den Fin-

gerendgliedern. Im Rahmen einer Varicelleninfektion bildete sich eine Zentralvenenthrombose am rechten Auge mit Amaurose. Die akute FFP-Substitution musste aufgrund einer anaphylaktoiden Transfusionsreaktion abgebrochen werden. Die weitere Therapie bestand in der Substitution von aus Plasma-Pool gewonnenen PC-Konzentraten in Verbindung mit Marcumar. Zur langfristigen Therapie wurde ein Port-System implantiert. Die nach der Geburt gemessenen PC-Werte zeigten einen schweren Typ I-Mangel mit PC-Antigen- und PC-Antikörperwerten kleiner 4 %.

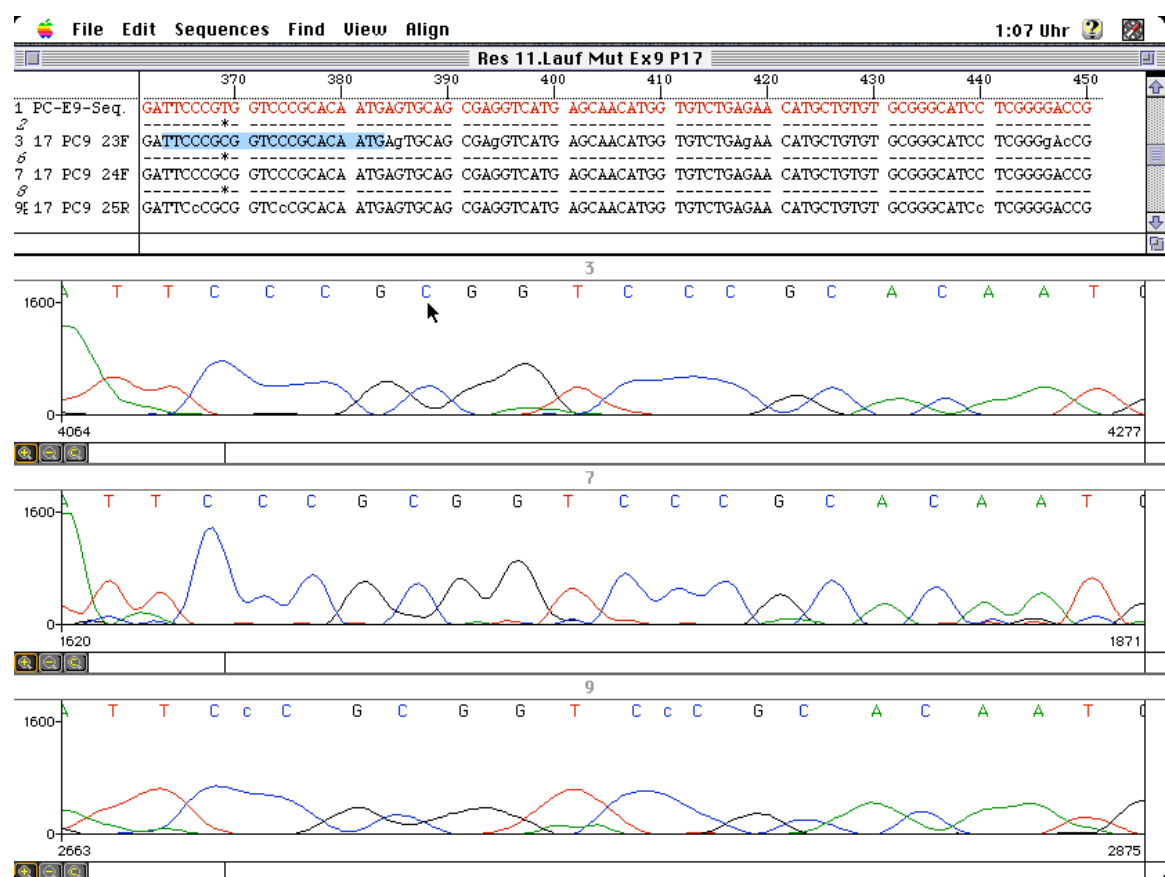


Abbildung 21: Elektropherogramm: Darstellung der Mutation an der Position 8689 im Exon 9 des PC-Gens. Es sind die Elektropherogramme verschiedener Sequenzierrichtungen untereinander gestellt. Die mit dem Stern oder Pfeil markierte Base zeigt die homozygote Position „C“ an der Auswerteposition 369. Die Mutation bewirkt im Codon 325 den Austausch der Aminosäure Valin durch Alanin. Beide Aminosäuren gehören zu der Gruppe der unpolaren Aminosäuren.

4.3.6 Exon 9-Mutation an der Position 8743

Bei dem untersuchten Kind wurde eine homozygote Mutation identifiziert, die die Position 8743 (Austausch der Aminosäure Methionin (ATG) durch Threonin (ACG)) betrifft und bisher noch nicht beschrieben worden ist.

Es wurde bei Mitgliedern der Familie des Kindes ein hereditärer PC-Mangel festgestellt. Die Untersuchung der Mutter und auch des Großvaters zeigte verminderte Werte für PC-Antigen sowie PC-Funktion. Die Anamnese ergab beim Großvater eine stattgefundene Lungenembolie. Mutter und Sohn blieben bisher asymptomatisch. Von der Mutter und dem Großvater wurde kein Probenmaterial eingesendet. Die Messung der PC-Parameter bei dem untersuchten Sohn ergab einen milden Typ I-Mangel (Tabelle 16).

Tabelle 16: Laborparameter des Patienten mit heterozygoter Mutation im Exon 9 an Nukleotid-Position 8743 des PC-Gens.

Parameter	Normwerte	Patient
Protein C-Aktivität	77-142%	46%
Protein C-Antigen	80-158%	45%

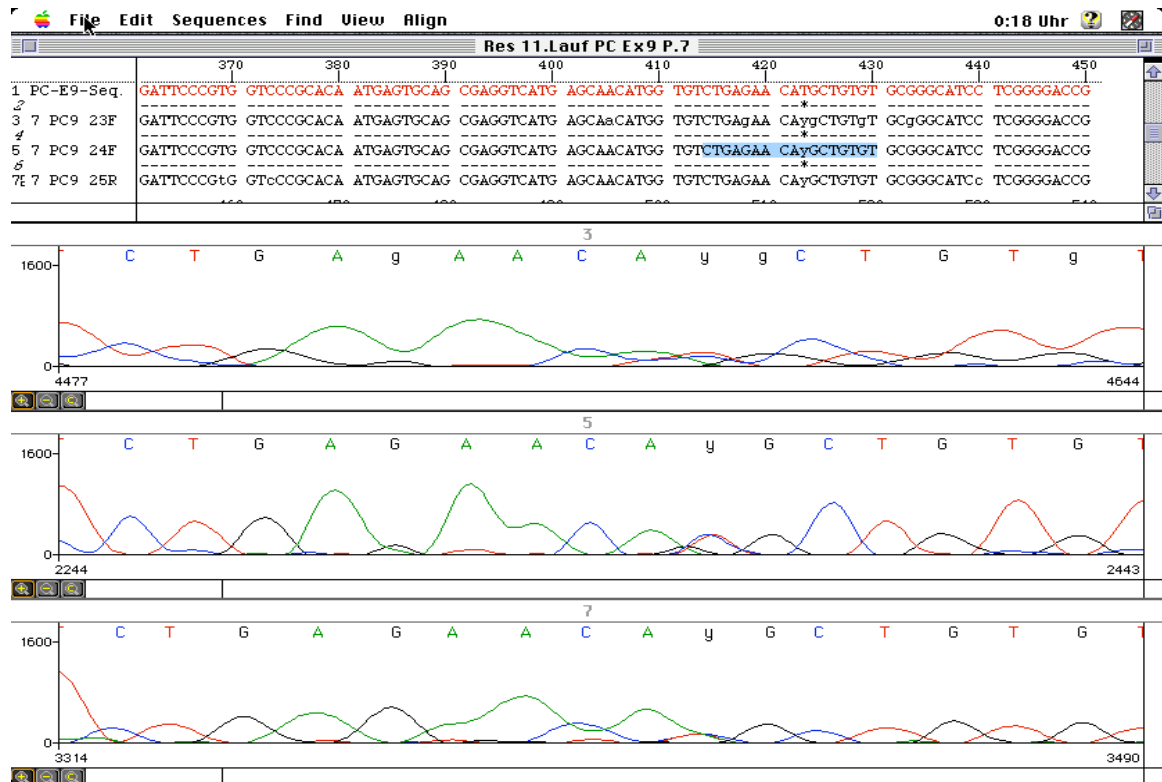


Abbildung 22: Heterozygote Mutation im Exon 9 des PC-Gens an der Position 8743. Es sind die Elektropherogramme verschiedener Sequenzierrichtungen dargestellt. Die heterozygote Mutation ist in allen drei Sequenzierrichtungen mit einem „y“ gekennzeichnet. Die Mutation bewirkt im Codon 343 einen Austausch der Aminosäure Methionin (ATG) durch Threonin (ACG). Im selben Triplet wird für die Nukleotidposition 8744 (G-->A) ein Aminosäureaustausch durch Isoleucin (ATA) als PC-43-012 beschrieben.

4.3.7 Exon 9-Mutation an der Position 8826

Die Protein C-Sequenzierung von drei Familienmitgliedern (Mutter, Tochter, Sohn) identifizierte eine heterozygote Missense-Mutation im Exon 9 an Nukleotidposition 8826 (Austausch von Threonin (ACC) zu Alanin (A/GCC)). In der Datenbank wird diese Mutation als PC-44-AS-003 geführt. Die Mutation wurde in einer weiteren Arbeit von Wacey *et al.* auf ihre strukturellen Veränderungen der katalytischen Domäne untersucht (WACEY *et al.* 1993).

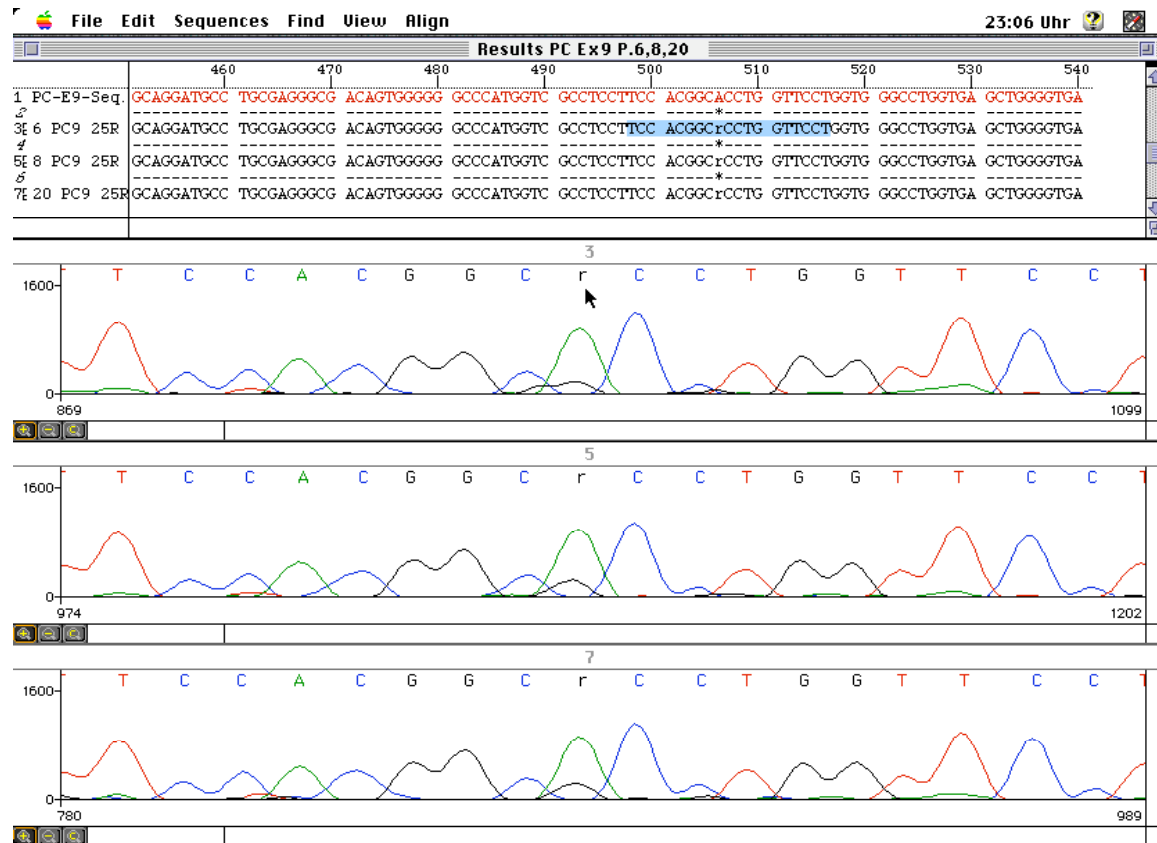


Abbildung 23: Elektropherogramm der heterozygoten Exon 9-Mutation an Position 8826 im PC-Gen. Oben (3)= Sohn 1; mitte (5)= Mutter 2; unten (7)= Tochter (linke obere Bildhälfte). Darstellung der Mutation an der Position 8826. Zu erkennen ist die heterozygote Position für alle drei Patienten. Anstelle eines Adenins werden zwei Signale gemessen, ein Adenin und ein Guanin. Das Codon 370 ACC(Thr) wird durch die Aminosäure GCC(Ala) ersetzt.

Der 16-jährige Sohn entwickelte eine Sinusvenenthrombose nach akuter, eitriger Tonsillitis. Die Mutter sowie die Großmutter (mütterlicherseits) des Patienten hatten anamnestisch jeweils im Alter von 40-50 Jahren eine tiefe Beinvenenthrombose. Die zwei Schwestern hatten bisher keine ernsthaften Krankheiten oder thrombotische Ereignisse. Der Vater war bislang gesund und nie ernsthaft krank. Die Gerinnungs-Laborparameter waren unauffällig. Über thrombotische Ereignisse in dessen Familie lagen keine Informationen vor. Die PC-Aktivität sowie das PC-Antigen waren bei der Mutter sowie der Schwester 2 erniedrigt bzw. grenzwertig niedrig. Die im Rahmen eines Thrombophilie-Screenings bei dem Patienten, den beiden jüngeren Schwestern und der Mutter erhobenen Werte sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Laborparameter eines Patienten mit heterozygoter Mutation an Position 8826 (ACC(Thr) → GCC(Ala)) im Exon 9 des PC-Gens sowie dessen Schwestern und der Mutter.

Parameter	Norm	Patient	Schwester1	Schwester 2	Mutter
PC-Aktivität	77-142%	33%	106%	66%	101%
PC-Antigen	80-158%	52%	120%	93%	89%
XII-Aktivität	54-135%	64%	n.d.	n.d.	n.d.
ATIII-Aktivität	75-112%	103%	n.d.	n.d.	n.d.
PS-Aktivität	73-125%	107%	n.d.	68%	n.d.
PS-Antigen	67-158%	88%	n.d.	89%	n.d.
Fibrinogen	200-500 mg/dl	238 mg/dl	204 mg/dl	234 mg/dl	251 mg/dl

4.4 Mutationen in den Introns des PC-Gens

Bei der Sequenzierung konnten bei allen Patienten- und Kontrollproben im Intron B zwei Insertionen gezeigt werden, welche in der Konsensussequenz nach Foster *et al.* nicht beschrieben sind. An den Positionen 1300/1301 sowie 1317/1318 im Intron B (zwischen Exon 2 und Exon 3) zeigte sich in allen Sequenzierungen eine Insertion einer einzelnen Cytosin-Basen im Vergleich zur Foster-Sequenz (Abb. 24). Zur Reproduktion der Sequenzierungsbefunde wurde die Insertion sowohl auf dem System ABI 373A, als auch auf dem System ABI Prism 310 in Vorwärts- und in Rückwärtsrichtung überprüft und bestätigt. Aufgrund der gleichen Auswertungsergebnisse in der Sequenzanalyse von Kisiel *et al.* und Foster *et al.* kann angenommen werden, dass eine fehlerhafte Angabe in der vorhandenen Literatur vorliegt.

Neben diesen beiden Insertionen konnte in allen untersuchten Proben eine Inversion im zwischen Exon 7 und 8 gelegenen Intron G gezeigt werden. Sowohl in Vorwärts-, als auch in Rückwärtsrichtung fand sich an der Position 6290/6291 eine Inversion von CG nach GC (Abb. 25).

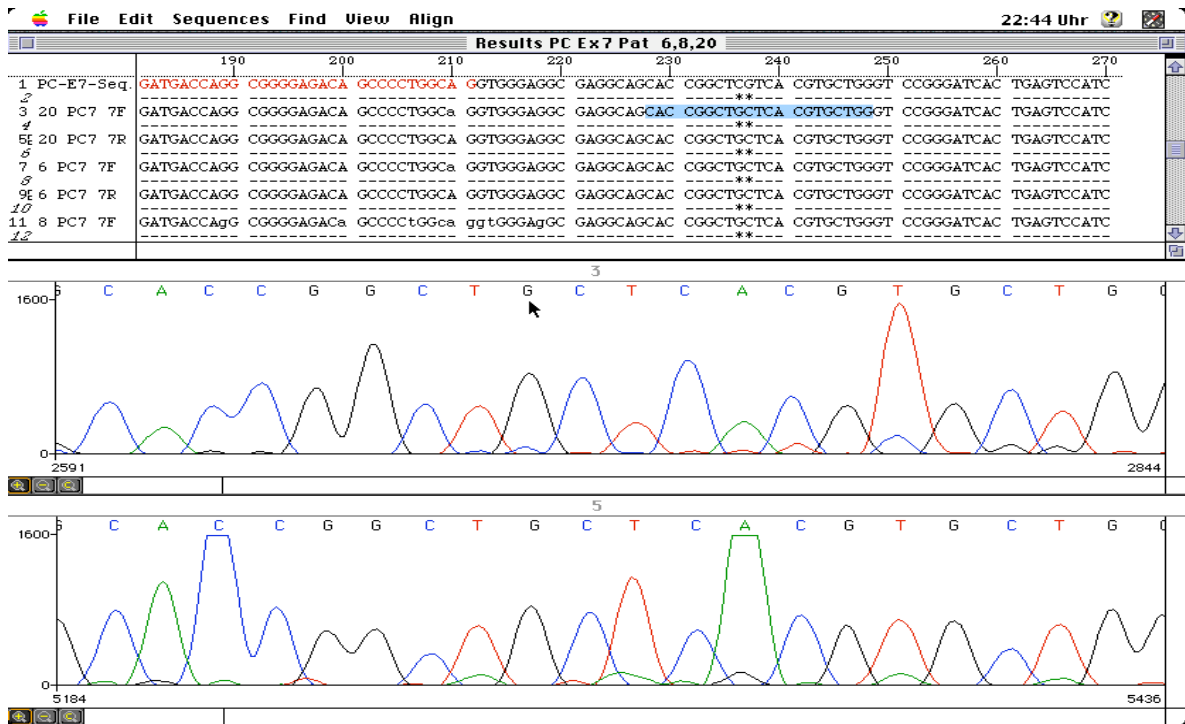


Abbildung 24: Darstellung der Insertionen im Intron B im PC-Gen an Position 1300/1301 und 1317/1318. An der mit einer Sternchen markierten Stelle findet sich die Insertion der Base Cytosin (obere Bildhälfte). In der unteren Bildhälfte markiert der Pfeil die Insertion.

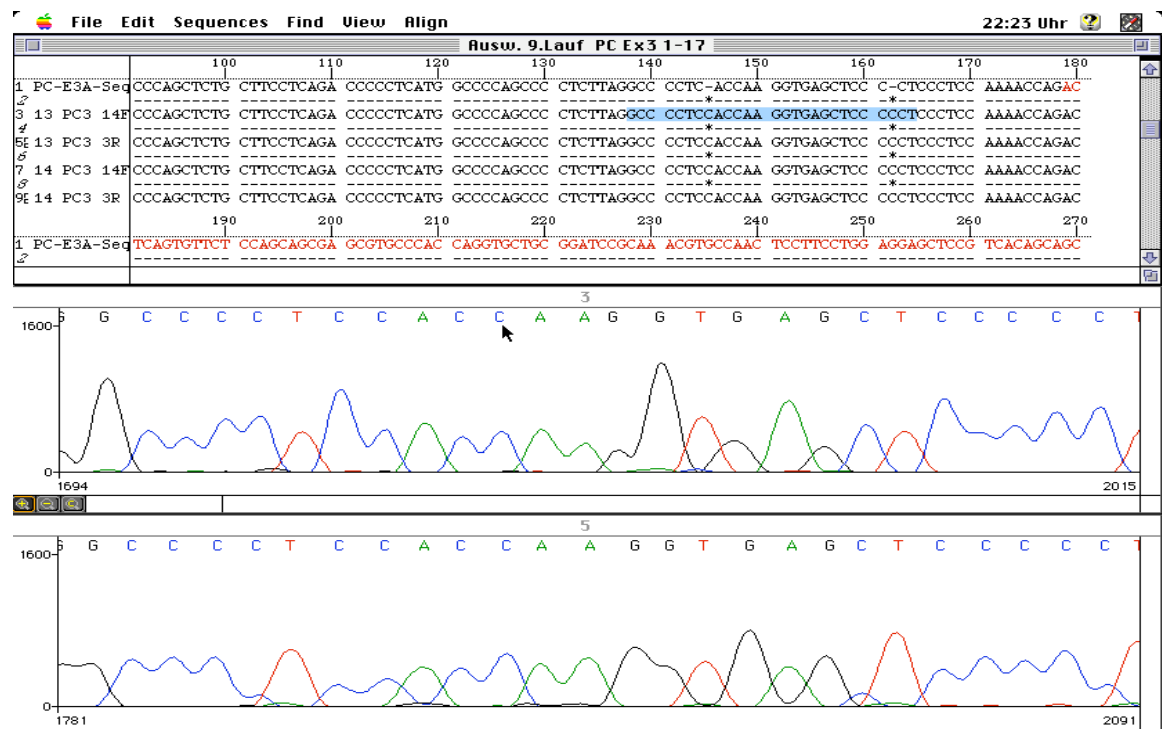


Abbildung 25: Darstellung der Inversion im Intron G im PC-Gen an Position 6290/6291. In der oberen Bildhälfte markieren die Sternchen die Inversion von CG in der Konsensussequenz zu GC in der sequenzierten Probe. In der unteren Bildhälfte markiert der Pfeil die Inversion im Elektropherogramm.

5 Diskussion

5.1 Identifikation von Mutationen im Protein C-Gen bei Thrombophilie-Patienten

Die venöse Thromboembolie ist ein klinisch bedeutsames Ereignis und betrifft jährlich ca. 1 von 1.000 gesunden Individuen (MILETICH et al. 1993). Häufig kann neben prädisponierenden, umweltbedingten Risikofaktoren eine genetisch bedingte Gerinnungsstörung nachgewiesen werden. Dabei beeinflussen die genetischen Defekte die Funktion an der Hämostase beteiligten Gerinnungsfaktoren, z.B. das Protein C (PC). Das PC bindet zusammen mit Thrombin an den Endothelzellmembran-Rezeptor Thrombomodulin und wird dadurch zu aktiviertem PC (APC). Es wirkt antithrombotisch durch Spaltung der Faktoren Va und VIIIa sowie durch Aktivierung der Thrombolyse. Ein PC-Mangel (Typ I mit verminderter Konzentration und Aktivität; Typ II mit normaler Konzentration und verminderter Aktivität) kann auf Mutationen im PC-Gen oder bei den Kofaktoren des PC zurückgeführt werden.

Bislang sind ca. 200 Mutationen im PC-Gen beschrieben (GOLDENBERG et MANCO-JOHNSON 2000), die einen PC-Mangel hervorrufen können. Das Risiko für venöse Thrombosen ist bei heterozygoten Genträgern um das 10fache erhöht, insbesondere unter Einnahme von Kontrazeptiva. Homozygote PC-Defekte sind extrem selten (ca. 1 : 400.000) und führen zu schweren, häufig letalen Thrombosen in der Neonatalperiode; die Enzymaktivität liegt hier meist unter 1 % (OZLU et al. 2008).

Die molekulargenetische Untersuchung des PC-Gens kann bei Patienten mit verminderter PC-Aktivität kleiner 50 % und bei Erfüllung bestimmter Kriterien indiziert sein. Diese sind z.B. wiederholte thromboembolische Ereignisse, v.a. in jungem Lebensalter ohne erkennbaren Auslöser, positive Familienanamnese für Thromboembolien oder nachgewiesener APC-Resistenz.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, mit der im Rahmen der Thrombophilie-Diagnostik aus wenigen Millilitern peripherem Blutes das PC-Gen sequenziert und analysiert werden kann. Die Methode sollte so konzipiert und optimiert werden, dass sie in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann. Nach Etablierung der Methode sollte ein Probenkollektiv aus 33 Patienten mit thromboembolischen Ereignissen in der Vergangenheit und 10 gesunden Kontrollpersonen auf Mutationen im PC-Gen hin untersucht werden. Gefundene Mutationen sollten mit publizierten Sequenzdaten aus der Literatur verglichen werden (REITSMA *et al.* 1995, PROCMD-DATABASE).

5.2 Etablierung der molekulargenetischen Untersuchungen des Protein C-Gens

Die Isolierung der DNA erfolgte aus EDTA-Blut der Patienten und wurde nach der Methode nach Dykes *et al.* durchgeführt. Im Vergleich zu der Isolation mittels einem Säulensystem (z.B. QIAGEN) wurde trotz einer aufwändigen Prozedur ausreichend viel und sauberes DNA-Material gewonnen (Menge: ca. 200-500 μg bei einer Ratio > 1,8).

Die Konsensussequenz für die PC-Sequenzierung und Auswertung basiert auf der von Foster *et al.* beschriebenen Nukleotidsequenz des humanem PC-Gens. Hieraus abgeleitet wurden bereits von Reitsma *et al.* sowie Witt *et al.* Primerpaarungen für die Amplifikation des PC-Genes beschrieben. Einige dieser Primer kamen in dieser Arbeit zur Anwendung. Die Amplifikation der Exons 1, 2, 8, 9 wurden mit Primern von Reitsma *et al.* und die Exons 3, 7 und 9 mit Primern nach Witt *et al.* durchgeführt. Für die Amplifikation von Exon 6 wurden Primern von Saria *et al.* verwendet (SORIA *et al.* 1995). Da für die Amplifikation der Exons 4 und 5 mit der in der Literatur publizierten Primersequenzen keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht wurden, mussten eigene Primer bestimmt und

etabliert werden. Dies beinhaltete zunächst das Austesten verschiedener Primersequenz mittels eines speziellen Computerprogramms (Primer Express).

Die PCR- und Sequenzierprimer wurden so gewählt, dass aus dem PC-Gen die kodierenden Exons mit den flankierenden Intronbereichen, sowie ein Teil der Promotor-Region amplifiziert wurden. Die Primerbindungsstellen liegen in den die Exons flankierenden Introns, womit es möglich war, auch „splice-site“-Mutationen zu erfassen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass Mutationen in den ersten beiden oder letzten zwei Basen eines Introns (GT-AG-Regel) zu Störungen beim Prozessieren der RNA führen.

Für jedes der insgesamt 8 Primerpaare wurde eine individuelle PCR-Optimierung und Abstimmung auf die im HLA-Labor des DRK Blutspendedienstes Frankfurt befindlichen Geräte durchgeführt. Dies beinhaltete die Ermittlung der optimalen Primerkonzentration (Pipettieren von sog. Primer-Matrizes), der optimalen Magnesium-Konzentration (Magnesium-Titration) sowie die Ermittlung der optimalen Temperaturprofile (hier v.a. Annealingtemperatur) für die PCR.

Die Sequenzierung der PC-Genamplifikate sollte zunächst auf dem Sequenzierautomaten ABI 373A etabliert und später auf einem Zweitgerät (Modell: ABI PRISM 310) übertragen werden. Die Validierung der Methode auf dem ABI PRISM 310 zeigte, dass sich hier kleinere Probenaufkommen schneller und einfacher untersuchen ließen. Ein zusätzlicher Vorteil war, dass die detektierten Mutationen hier nochmals sequenziert werden konnten. Alle Proben wurden in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung sequenziert, um Unsicherheiten bei der Auswertung von nicht eindeutigen Signalen in einer Leserichtung zu lösen.

5.3 Polymorphismen im Protein C-Gen bei Thrombosepatienten und gesunden Individuen

Das untersuchte Kollektiv umfasste 43 Personen, bestehend aus 10 Kontrollpersonen und 33 Patienten. Die hier untersuchten 33 Patienten zeigten klinisch Thrombosen, Lungenembolien bis hin zu einer *Purpura fulminans*. Die Rekrutier-

Die Sequenzierung des Patientenkollektivs erfolgte aus Zusendungen mehrerer Kliniken in Deutschland und erstreckte sich über einen Zeitraum von 3 Jahren. Insgesamt konnte bei 11 der 33 untersuchten Patienten eine Mutation detektiert werden, wohingegen sich in der Kontrollgruppe keine Mutationen fanden. Es wurden vier verschiedene Polymorphismen gefunden, die in beiden Gruppen auftraten. Zur Kontrolle der nachgewiesenen Genvariationen wurden diese in einer zweiten Sequenzierung in Vorwärts- und Rückwärts-Leserichtung wiederholt und in allen Fällen bestätigt.

Polymorphismen sind Nukleotidsubstitutionen einer DNA-Sequenz, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen. Es wurden vier verschiedene Polymorphismen im PC-Gen der Patienten- und Kontrollgruppe gefunden (Tabelle 11): in der Promotorregion/Exon 1 Position -1476 (Allelfrequenz T=60%, A=40%), Exon 6 Position 3342 (Allelfrequenz T=59%, G=41%), Exon 8 Position 7228 (Allelfrequenz G=73%, T=27%) und Intron G Position 637 (Allelfrequenz T=67%, C=33%). Alle gefundenen Polymorphismen waren in der Datenbank für Protein C-Mutationen bereits erfasst (REITSMA et al. 1995).

Zwei bekannte Polymorphismen in der 5' untranslatierten Region (-1654, -1641) wurden durch die hier verwendeten Primerpaare nicht erfasst und konnten somit nicht detektiert werden (SPEK et al. 1994). Drei weitere Polymorphismen sind in den Codons Arginin 87, Lysin 156 und Aspartat 255 (TSAY et al. 1994) beschrieben und in keiner der 43 Sequenzierungen nachgewiesen worden.

Da die sequenzierten Polymorphismen in hoher Zahl bei Patienten und Kontrollkollektiv vorkamen (Exon 1: 35x, Exon 6: 18x, Exon 8: 20x, Intron F: 14x) ist nicht davon auszugehen, dass sie unmittelbare Risikofaktoren für Thromboembolien darstellen.

5.4 Mutationen im Protein C-Gen bei Thrombosepatienten

Es wurden sechs unterschiedliche Missense-Mutationen in den kodierenden Exonen bei insgesamt elf Patienten in sieben nicht verwandten Familien durch Sequenzierung identifiziert. Diese fanden sich ausschließlich in der Patientengruppe. Drei der fünf Mutationen konnten im Rahmen einer „familiären“ Untersuchung

bei sieben Patienten nachgewiesen werden, wobei 1x zwei, 2x drei Mutationen detektiert wurden. Wegen des fehlenden Probenmaterials konnten keine größeren Stammbaumanalysen durchgeführt werden. In allen Fällen einer relevanten Mutation wurde jeweils nur eine Missense-Mutation pro Patient nachgewiesen. Gemischte („compound“) heterozygote Mutationen sind sehr selten und wurden bei dem kleinen Kollektiv erwartungsgemäß nicht nachgewiesen. Nur 17 der 315 eingetragenen Mutationen sind in der Datenbank von 1995 als gemischt heterozygote Mutationen geführt. Compound-homozygote sind in der Datenbank bisher nicht gelistet. Die Literaturrecherche zeigte eine beschriebene homozygote Doppelmutation (His202Tyr und Ala346Thr) (KEMAHLI et al. 1997). Es ist bekannt, das CpG-Dinukleotide einen Hot-Spot für Missense-Mutationen darstellen. Cooper *et al.* konnten bei 90% der Missense-Mutationen entweder eine CG->TG oder CG->CA-Substitution zeigen (COOPER 1988). Dieser Hot-spot konnte in der Arbeit bestätigt werden, jedoch nur zwei (Position 2987 und 8608) der 6 hier nachgewiesenen Mutationen betreffen die Mutation eines CpG-Dinukleotids.

5.5 Mutationen im Exon 4 des Protein C-Gens bei Thrombosenpatienten

Mit der Detektion einer heterozygoten Missense-Mutation an der letzten Nukleotidposition des Exon 4 konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Transition der Aminosäure 46 nachgewiesen werden, wobei Aspartat (saure Aminosäure) durch Asparagin (Amid der AS Aspartat, saure und hydrophile AS) ersetzt wird. Das Exon 4 stellt mit 25 Nukleotiden das kleinste Exon des Protein C-Moleküls dar und die AS 46 ist an der Bildung der ersten EGF-Domäne des PC-Moleküls beteiligt (AS46-91) und hat seine Bedeutung in der Bindung von Ca^{2+} -Ionen. Castellino *et al.* führten einen gezielten Austausch der Aminosäure Aspartat mittels Alanin durch, wobei sie eine verminderte Ca^{2+} -Bindung messen konnten (GENG et al. 1996). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Punktmutation D46N im Protein C-Gen zu einer verminderten PC-Aktivität führt. In der Datenbank sind 2 Mutationen im Exon 4 geführt. Die eine Exon 4-Mutation an der AS 40 führte jedoch zu dem AS-Austausch(F40L). Der Patient hatte einen milden Typ II-Mangel

(GANDRILLE et ALIACH 1994, 1995). Die zweite bedingt durch die Mutation W41STOP ein STOP-Codon.

5.6 Mutationen im Exon 9 des Protein C-Gens bei Thrombosepatienten

Im Exon 9 konnten fünf verschiedene Mutationen bei Proben des Patientenkollektivs durch Sequenzierung identifiziert werden (Positionen 8554, 8608, 8689, 8743 und 8826).

Für die Position 8554 konnte eine neue, bisher nicht beschriebene hereditäre, heterozygote Mutation nachgewiesen werden (SCHMIDT et al. 2001). Sie ist vom Typ einer Missense-Mutation (Basenaustausch, der einen Aminosäureaustausch verursacht). In diesem Falle führt der Austausch der Base Adenin zur Base Guanin an der Position 8554 zu einer Substitution von Aspartat 280 durch die neutrale AS Glycin. Der Austausch führt zu einem Typ II-Mangel. Das Codon ist bei mehreren Spezies sowie bei dem Faktor IX hoch konserviert (jedoch nicht in Maus und Ratte) (MURAKAWA et al. 1994). Es kodiert für die katalytische Domäne. Für die benachbarten Codons 279 und 282 sind gelistete, mit einem Typ I-Mangel assoziierte Mutationen, beschrieben worden. Doig *et al.* sowie Lind et al. legten die Bedeutung der AS 282 für die Struktur des PC-Moleküls dar (DOIG et al. 1994, LIND et al. 1995).

Die heterozygote Mutation C->T im Codon 298 an der Position 8608 führt zu einem Austausch der AS Threonin zu Methionin und ist mit einem Typ I-Mangel assoziiert und wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (BOVILL et al. 1989, Tomczak et al. 1994). Brenner *et al.* beschrieben das gleichzeitige Vorkommen dieser heterozygoten Mutation und einer heterozygoten Faktor V-Mutation, die mit einer klinischen Manifestation in Form von venösen Thromboembolien assoziiert ist (BRENNER et al. (1996). Die homozygote Mutation ist mit schweren thrombotischen Störungen bereits nach der Geburt assoziiert (SELIGSOHN et al.

1991). Greengard *et al.* führten hierzu mittels Computerberechnungen eine Analyse der dreidimensionalen Struktur des mutierten Proteins durch. Sie konnten durch Austausch der AS Threonin durch Methionin eine Destabilisierung des Proteins zeigen, die durch Wegfallen der Bindung zwischen der AS Thr298 und der AS Gln184 verursacht wird (GREENGARD *et al.* 1994). Sequenzvergleiche von Murakawa *et al.* bei Säugetieren wie Affe, Hund, Katze, Ratte oder Schwein zeigten, dass die AS Threonin in einer hoch konservierten Region der katalytischen Domäne liegt und somit eine besondere Aufgabe für die Enzymfunktion einnimmt (MURAKAWA *et al.* 1994).

Die heterozygote Mutation an der Position 8743 führt zu einem Austausch der Aminosäure Methionin 343 durch Threonin. Die Messung der PC-Parameter ergab einen milden Typ I-Mangel. Für dasselbe Codon ist in der Datenbank eine Nukleotidsubstitution an der Position 8744 als „PC-43-002“ beschrieben (REITSMA *et al.* 1995). Diese führt zu einem Austausch der AS durch Isoleucin und ist mit einem Typ II-Mangel assoziiert. Literaturvergleiche zeigten, dass dies eine neue Mutation vom Typ einer Missense-Mutation darstellt, und somit im Zuge dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden konnte (SEIFRIED *et al.* 1998). Das Codon 343 ist an der Bildung eines 15 AS großen Loops beteiligt, der durch eine Disulfidbindung zwischen den Cysteinen 331 und 345 gebildet wird (FOSTER *et al.* 1998). Anhand der Antigen- und Aktivitätswerte für diese Mutation zeigt sich, dass sich eine Transition zu Threonin stärker auf die zirkulierende PC-Menge und PC-Aktivität auswirkt, als die Transition durch Isoleucin. Vergleicht man die Molekülstruktur beider AS, so zählt man das Isoleucin wie das Methionin zu den polaren AS. Ein Austausch der AS Isoleucin zeigt eine geringere Auswirkung auf die Proteinstruktur, als ein Austausch durch Threonin, die man zu den polaren AS zählt. Sequenzvergleiche mit anderen Säugetieren oder den Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X zeigen (FUNG *et al.* 1988, MURAKAWA *et al.* 1994), dass das Codon für eine hochkonservierte Aminosäure kodiert. Murakawa *et al.* vermuten, dass solche Homologien in den konstanten Regionen, die besondere Bedeutung für die Funktion im Gerinnungssystem untermauern.

An der Position 8826 wurden im Rahmen eines familiären Screenings bei allen drei untersuchten Familienmitgliedern (Mutter, Sohn, Schwester) dieselbe Mutation nachgewiesen. Aufgrund der Familienanamnese ist davon auszugehen, dass die Mutation von der Großmutter, die anamnestisch 2 tiefe Beinvenenthrombosen hatte, weiter vererbt wurde. Ein Typ I-Mangel konnte nur bei dem 16-jährigen Jungen nachgewiesen werden.

Die Schwester und die Mutter wiesen nur grenzwertig erniedrigte PC-Werte auf. Dagegen führt bei dem Sohn eine eitrige Tonsillitis zu einer Thrombose im Zuge einer getriggerten PC-Verminderung. Normale PC-Laborwerte von einer weiteren, nicht untersuchten Schwester sprechen dafür, dass sie nicht Trägerin dieser Mutation ist.

Für die Position 8826 der Aminosäure 371 ist in der Datenbank bereits eine Mutation unter der Bezeichnung PC-44-AS003 geführt (REITSMA et al. 1995). Beschrieben wird eine Assoziation mit einem Typ I-Mangel, der auch bei dem untersuchten Sohn festgestellt wurde. Die von Tait *et al.* beschriebenen Fälle waren bisher klinisch unauffällig (TAIT et al. 1994). Ein Aminosäureaustausch der in der Nachbarschaft liegenden Aminosäure 376 von G→D ist ebenfalls mit einem Typ I-Mangel assoziiert und unterstreicht die Bedeutung dieser Region für die regelrechte Funktion des Proteins (SUGAHARA et al. 1992).

5.7 Insertionen in der Protein C-Gensequenz bei Thrombosepatienten

Die Insertion zweier zusätzlicher Cytosin-Basen an den Positionen 1300/1301 sowie 1317/18 konnte sowohl bei allen sequenzierten Patienten als auch in der Kontrollgruppe in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung detektiert werden. Der Abgleich mit den Datenbanken weist die zwei Insertionen nicht auf. Auf die Transkription der Exons hat dies keinen Einfluss, da die Insertionen im Intron liegen. Anhand der Sequenziererergebnisse müsste die Konsensussequenz des

humanen PC-Gens auf diese zwei Positionen (Position 1300 und 1317) mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen abgeglichen und ggfs. überarbeitet werden.

5.8 Molekulargenetische Untersuchungen des Protein C-Gens: Ein Ausblick

Um die strukturellen und funktionellen Auswirkungen durch die nachgewiesenen Mutationen zu untersuchen, kommt beispielsweise eine weiterführende Untersuchung mittels Klonierung und rekombinanter Expression in Frage. Die mutierten PC-Genabschnitte können mittels geeigneter Vektoren exprimiert und dann *in vitro* in funktionellen Assays qualitativ charakterisiert werden und z.B. mittels ELISA-Technik quantifiziert werden. Von besonderem Interesse können hier die neu beschriebenen Mutationen im Exon 4 und Exon 9 sein.

In den letzten Jahren hat unser Wissen über angeborene und erworbene Ursachen der Thrombophilie enormen Zuwachs erfahren (DAHLBÄCK 2008). So kann man heute bei fast 40% der Thrombosepatienten zumindest einen der am häufigsten gefundenen angeborenen Gerinnungsdefekte wie Faktor V Leiden-Mutation, Prothrombinpolymorphismus, PC- / PS-Mutation etc. nachweisen.

Die klinische Penetranz ist jedoch alles andere als einheitlich. Die Spannweite reicht von subklinisch verlaufenden leichten Thrombosen bis zur lebensbedrohlichen Lungenembolie und manifestiert sich sehr früh bei jungen Patienten oder erst im fortgeschrittenen Alter. In dieser undurchsichtigen, für den Kliniker schwierigen Situation könnte in Zukunft der Genotyp des Patienten bezüglich einzelner Gerinnungsstörungen eine Entscheidungshilfe für die Prophylaxe und Therapie von Thrombosen sein.

Das Faktor V Leiden ist der häufigste bekannte Risikofaktor für venöse Thrombosen (RIDKER et al. 1995) und wird von allen Faktoren am häufigsten molekulargenetisch untersucht. Als alleiniger Risikofaktor scheint er jedoch nur für eine relativ milde Thrombophilieneigung verantwortlich zu sein. Damit unterscheidet

er sich von anderen hereditären Thrombophilieursachen wie dem Protein C-Mangel, der zwar seltener vorkommt, aber ein höheres Thromboserisiko birgt (ALTINISIK et al. 2008).

Die molekulargenetische Diagnostik erlaubt die Abklärung einer erblichen Prädisposition und sie ermöglicht zudem Stammbaumanalysen zu hereditären Gerinnungsstörungen. Die Bedeutung einer Mutation ist im Kontext mit klinischen Befunden und anderen Laborergebnissen zu sehen. Als Screening-Methode ist sie nicht geeignet da sie zeit- und kostenintensiv ist und bleibt entsprechend ausgestatteten Labors vorbehalten. Der Untersucher muss in der Methodik und der Interpretation der Ergebnisse erfahren sein.

Die Methode der Wahl bleibt die DNA-Sequenzierung mit vorangehender Amplifikation des PC-Gens via PCR oder die Analyse des Amplifikates mittels denaturierender HPLC (OLDENBURG et al. 2001). Die von einigen Autoren empfohlenen Screening-Methoden wie die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (kurz: DGGE), die Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (kurz: TGGE), der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (single stranded conformational cleavage, kurz: SSCP) sowie die chemische Spaltung (chemical mismatch cleavage, kurz: CMC) sind heutzutage als nicht mehr sehr sensitive Methode, da anfällig, zu betrachten (MÜLLER-BERGHAUS et PÖTSCH 2000).

In Zukunft könnten DNA-Chips mit einem entsprechendem Thrombophilie-Profil als Screening-Methode für den kombinierten Nachweis von häufigen Mutationen in den Genen für z.B. Faktor V-Leiden, PC, Protein S, Prothrombin, MTHFR und PAI-1 etc. zum Einsatz kommen.

6 Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde eine Methode beschrieben, mit der an einem Patientenkollektiv nach dem Vorhandensein von Genvarianten im PC-Gen gesucht wurde. Das PC ist eine Serin-Protease, ihr Hauptbildungsort ist die Leber. Ein Defekt im Gen des PC erhöht das Risiko für die Manifestation thrombotischer Ereignisse. Die in einer Datenbank von 1995 zusammengefassten Mutationen sprechen für die Heterogenität des PC-Gens. Für die Untersuchung wurde aus Leukozyten gewonnene, genomische DNA verwendet. Anschließend erfolgte die Amplifizierung mittels PCR-Techniken und direkter Sequenzierung in einem Sequenzierautomaten. Die Amplifizierung des Gens erfasst Bereiche der Promotor-Region (Exon 1) sowie die kodierenden Exone 2-9 mit den flankierenden Intron-Grenzen. Insgesamt erhält man 8 PCR-Amplifikate, wobei die Exons 4 und 5 zusammen in einem Ansatz amplifiziert und sequenziert wurden.

Die Amplifizierung der Exons wurde mit bereits beschriebenen Primerpaaren als auch mit eigenen Primerpaaren durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden auf die im Labor zur Verfügung stehende Apparaturen etabliert. Die Sequenzierung konnte auf zwei Sequenzierautomaten der Firma PE Applied Biosystems etabliert werden (ABI 373A und ABI PRISM 310). Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden mit der PC-Sequenz von Foster et al. sowie der Mutations-Datenbank von 1995 ausgewertet.

Sowohl in dem zehnköpfigen Kontrollkollektiv, als auch in dem Patientenkollektiv, konnten Sequenzpolymorphismen in den Introns und Exons nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe konnten keine Mutationen nachgewiesen werden. Die Auswertung der Patientengruppe erbrachte bei 11 der 33 untersuchten Patienten sechs unterschiedliche Mutationen. Alle Mutationen waren vom Typ einer Missense-Mutation. Fünf der sechs Mutationen lagen im Exon 9, welches auch das größte der insgesamt 9 Exons des PC-Gens darstellt.

Eine Mutation konnte im Exon 4 nachgewiesen werden. Die Mutationen A2987G (Asp46Asn) sowie T8743C (Met343Thr) konnten in ihrer heterozygoten Form,

erstmalig als mit einem Typ I Mangel assoziierte neue Mutationen, beschrieben werden. Die mit einem Typ II- Mangel assoziierte Mutation D8554G (Asp280Gly) konnte ebenfalls erstmalig beschrieben werden. Alle detektierten Mutationen waren vom Typ einer Missense-Mutation. Fünf der sechs Mutationen wurden in der heterozygoten Form detektiert. Die Typ I-Mutation T8689G (Val325Ala) konnte als einzige in der homozygoten Form dargestellt werden.

Die Sequenzierung des humanen PC-Gens ist eine aufwändige Methode und zum Screening von Patientenproben nicht geeignet. Ihr Einsatz ist als Ergänzung zu den gängigen Labormethoden zu sehen, die jedoch mit Störfaktoren und falschen Werten bei oraler Kumarintherapie, behaftet sind. Für Patienten mit im Normbereich oder knapp unterhalb des Normbereiches liegenden PC-Aktivitäten, können so durch Zuhilfenahme molekularbiologischer Untersuchungen, Hinweise für eine genetische Ursache eines PC-Mangels gefunden werden. Im Falle einer familiären Belastung kann unter Einbeziehung möglichst vieler Familienmitglieder ein hereditärer Verlauf nachgewiesen werden. Wird bei einem Patienten oder seinen Familienangehörigen ein Verdacht auf eine Mutation im PC-Gen bestätigt, sollten die Betroffenen in einer Risikosituation wie z.B. einem elektiven Eingriff, einer Thromboseprohylaxe zugeführt werden.

Welche Bedeutung die neuen Mutationen letztlich für die Funktion des Proteins haben, wurde nicht untersucht. Analysen zur Genexpression oder Computeranimierte 3D-Strukturanalysen unter Einbeziehung der Mutationen könnten weitere Informationen über die Heterogenität und die Funktion des PC liefern.

7 Literaturverzeichnis

AICH M, GANDRILLE S, EMMERICH J:

A review of mutations causing deficiencies of antithrombin protein C and protein S. *Thromb Haemost* 1995; 74:81-9.

ALLAART CF, POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM, BRIET E:

Increased Risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 1993; 341: 134-38.

ANDRE M, PAES B, MILNER R, JOHNSTON M, MITCHELL L, TOLLEFSEN DM, POWERS P:

Development of the human coagulation system in the full term infant. *Blood* 1987; 70:165-72.

ASAKURA H, JOKAJI H, SAITO M, OUTANI C, KUMABASHIRI I, MORISHITA E, YAMAZAKI M, MATSUDA T:

Plasma levels of soluble thrombomodulin increase in cases of disseminated intravascular coagulation with organ failure; *Am J Haematol* 1991; 38: 281-287.

AXELLSON B, ROSEN T:

APC-Resistenz. Instrumentation Laboratory/Koagulation, Chromogenix, 1997.

BECKMANN RJ, SCHMIDT RJ, SANTERRE RF, PLUTZKY J, CRABTREE, LONG GL:

The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver DNA. *Nucl. Acids Res.* 1985; Vol13: 5233-5247.

BERNARDI F, PATRACCHINI P, GEMMATI D, BONINSEGNE S, GUERRA S, LEGNANI C, BALLERINI G, MARCHETTI G:

Rapid detection of a protein C gene mutation present in the asymptomatic and not in the thrombosis-prone lineage. *Br Journ of Haematol.* 1992; 81: 277-282.

BERTINA R, BROEKMANS A, VAN DER LINDEN I, MERTENS K:

Protein C deficiency in a Dutch family with thrombotic disease. *Thromb and Haemost* 1982; 48:1.

BERTINA RM, BROEKMANS AW, VAN KROMMENHOEK ES, VAN WIJNGAARDEN A:

The use of a functional and immunological assay for plasma Protein C in the study of three heterogeneity of congenital protein C deficiency. *Thromb Haemost* 1984; 51:1-5.

BERTINA RM, KOELEMAN BP, KOSTER T, ROSENDAAL FR, DIRVEN RJ, DE RONDE H, VAN DER VELDEN PA, REITSMA PH:

Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-67.

BOVILL EG, BAUER KA, DICKERMAN JD, CALLAS, WEST B:

The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 1989; 73: 712-17.

BOYER C, ROTHSCHILD CM, WOLF M, AMIRAL J, MEYER D, LARRIEU MJ:

A new method for the estimation of protein C by ELISA. *Thromb Res* 1984; 36: 579-589.

BRENNER B, ZIVELIN A, LANIR N, GREENGARD JS, GRIFFIN JH, SELIGSON U:

Venous Thromboembolism associated with double heterozygosity for R506Q mutation of factor V and for T298M Mutation of protein C in a large family of a previously described homozygous protein C-deficient newborn with massive thrombosis. *Blood* 1996; 88/3:877-880.

BROEKMANN AW, VELTKAMP JJ, BERTINA RM:

Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism: a study of three Dutch families. *N Engl J Med* 1983; 309: 340-4.

BURSTEIN C, STEINER M, BAUER I, KRAMMER B, REINHARD KM, BARZ D, ANDERS O:

Prävalenz der Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C bei Patienten mit venösen und arteriellen thromboembolischen Ereignissen. *Hämostaseologie* 1996. 42: 501-506.

CHEUNG A, ENGELKE JA, SANDERS C, SUTTIE JW:

Vitamin K-dependent carboxylase: Influence of the „propeptide“ region on enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 574-81.

COMP PC, ESMON CT:

Regulatory mechanisms in hemostasis: natural anticoagulants. In Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen (eds). *Hematology. Basic principles and practice*. Churchill Livingstone, New York, 1991; pp 1243-51.

COOPER DN, YOUSSEFFIAN H:

The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Gen* 1988; 78:151-55.

DAVIE EW, RATNOFF OD:

Waterfall sequence for intrinsic blood coagulation. *Science* 1964; 145: 1310-1311.

D'ANGELO SV, FERMO I, D'ANGELO A:

Investigation of congenital Thrombophilia: a critical evaluation. *JIFCC* 1996; 8/3:103-8.

DAHLBÄCK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ:

Familial thrombophilia due to a previously unrecognised mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 1993; 1004-1008.

DAHLBÄCK B:

Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008; 112 (1): 19-27.

DE MOERLOOSE, MANNUCCI PM:

Thrombophilia: which test for which patient? Meet the expert sessions of the second EHA. 1996; 32-36.

DOLAN G, NEAL K, COOPER P, BROWN P, PRESTON FE:

Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group. *Br J Haematology* 1994; 86: 798-803.

EGEBERG O:

Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diathes. Haemorrh* 1965; 13:616.

EPPSTEIN DJ, BERGUM PW, BAJAJ SP, RAPAPORT SI:

Radioimmunoassays for protein C and factor X: Plasma antigen levels in abnormal hemostatic states. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 573-81.

ESMON CT, OWEN WG:

Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2249-52.

ESMON CT, ESMON NL, HARRIS KW:

Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982; 257:7944-7.

ESMON CT:

Protein C: Biochemistry, physiology and clinical implications. *Blood* 1983; 62: 1155-58.

ESMON NL, OWEN WG, ESMON CT:

Isolation of a membrane bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 859-64.

ESMON CT:

The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987; 235:1348-51.

ESMON CT, TAYLOR FB, SNOW TR:

Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost* 1991; 66: 160-165.

ESMON CT, DING W, YASUHIRO K, GU JM, FERELL G, REGAN LM, STEARNS B, KUROSAWA DJ, KUROSAWA S, MATHER T, LASZIK Z, ESMON NL:

The Protein C Pathway: New Insights. *Thromb Haemost* 1997; 78: 70-74.

FEISTRITZER C, MOSHEIMER BA, STURN DH, RIEWALD M, PATSCH JR, WIEDERMANN CJ:

Endothelial protein C receptor-dependent inhibition of migration of human lymphocytes by protein C involves epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 2006; 176 (2): 1019-25.

FELEZ JR, RODRIGUEZ-PINTO R, OLIVIER A, VELASCO F, STEEGMANN JL, MARTIN-AYUSO S:

Multicenter spanish study of biological causes of deep vein thrombosis. *Thromb and Haemostasis* 1987;58, 72 Abstract.

FERNLUND P, STENFLO J:

Amino acid sequence of the light chain of bovine protein C. *Journ Biol Chem.* 1982. 257: 12170-12179.

FOSTER DC, YOSHITAKE S, DAVIE EW:

The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4673-77.

FOSTER DC, DAVIE EW:

Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 546-550.

FOSTER DC, RUDINSKI MS, SCHACH BG, BERKNER KL, KUMAR AA, HAGEN FS, SPRECHER CA, INSLEY MY, DAVIE EW:

Propeptide of human protein C is necessary for gamma- carboxylation. *Biochemistry* 1987; 36: 7003-7011.

FRANCIS RB, PATCH MJ:

A functional assay for protein C in human plasma. *Thromb Res* 1983; 32: 605-613.

FRICKE, HÖFFKEN:

Thrombophilie bei Tumorerkrankungen. *Dtsch med. Wschr.* 1994. 119; 311-316.

FUKODOME K, ESMON CT:

Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26486-92.

FUKODOME K, KUROSAWA S, STEARNS-KUROSAWA DJ, HE X, REZAI AR, ESMON CT:

The endothelial cell protein receptor: Cell surface expression and direct ligand binding in the soluble receptor. *Journ Biol Chem* 1996; 271: 17491.

FULCHER CA, GARDINER JE, GRIFFIN JH, ZIMMERMANN TS:

Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 1984; 63: 486-9.

FUNG MR, MACGILLIVRAY RTA:

Organization of the genes coding for vitamin K-dependent clotting factors. *Current Advances in Vitamin K Research*. Editor Suttie JW, Elsevier, New York 1988; 143-151.

GANDRILLE S, ALHENC-GELAS M, GAUSSEM P, AILLAUD MF, DUPUY E, JUHAN-VAGUE I, AIACH M:

Five novel mutations located in exons III and IX of the protein C gene in patients presenting with defective protein C anticoagulant activity. *Blood* 1993; 82/1: 159-168.

GANDRILLE S, AICH M, AND THE FRENCH INSERM NETWORK ON „THE MOLECULAR BASIS OF PROTEIN C AND PROTEIN S HEREDITARY DEFICIENCIES“:

1994. Personal Communication.

GANDRILLE S, AIACH M:

Identification of mutations in 90 of 121 consecutive symptomatic French patients with a type I protein C deficiency. The French INSERM Network on Molecular Abnormalities Responsible for Protein C and Protein S deficiencies. *Blood* 1995; 86 (7): 2598-605.

GENG JP, CHENG CH, CASTELLINO FJ:

Functional consequences of mutations in the amino acid residues that stabilize calcium binding to the first epidermal growth factor homology domain of protein C. *Thromb Haemost* 1996; 76/5: 720-8.

GREENGARD JS, FISHER CL, VILLOUTRAIX B, GRIFFIN JH:

Structural basis for type I and type II deficiencies of antithrombotic plasma protein C: Patterns revealed by three-dimensional molecular modelling of mutations of the protease domain. *Proteins* 1994; 18:367-78.

GRIFFIN JH, EVATT B, ZIMMERMANN TS, KLEISS AJ, WIDEMAN C:

Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370-3.

GRIFFIN JH, EVATT B, WIDEMAN C, FERNANDEZ JA:

Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 82 1993; 1989-93.

GROSS R, SCHÖLMERICH P, GEROK W:

Lehrbuch der Inneren Medizin. 7.Aufl. Schattauer 1987.

HACH-WUNDERLE V:

Hämostaseologisches Risikoprofil bei der venösen Thrombose. Habilitation. Frankfurt/Main 1991.

HEIDINGER K, KEMKES-MATTHES B, LASCH HG:

Protein C and S in inflammatory diseases. *Thromb Haemost* 1993; 69: 725.

HILLARP A, ZOLLER B, SVENNSON PJ, DAHLBÄCK B:

The 20210 A allele of the Prothrombin is a common risk factor among swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 990-992.

HORELLOU MH, CONARD J, BERTINA RM, SAMAMA M:

Congenital protein C deficiency and thrombotic disease in nine French families. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984 November 10; 289(6454): 1285–1287.

HOROWITZ N, BRENNER B:

Thrombophilia and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2008; 36 (3–4): 131–6.

JU JR, FULLER CW, GLAZER AN, MATHIES R:

Fluorescence energy-transfer dye-labeled primers for dna sequencing and analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 4347-51.

KEMAHLI S, GANDRILLE S, ALHENC-GELAS M, AIACH M, CIN S:

Homozygous protein C deficiency with a double variant His 202 to Tyr and Ala 346 to Thr. Abstract PS-1690, Unite INSERM 428, 1997.

KISIEL W, CANFIELD WM, ERICSSON LH, DAVIE EW:

Anticoagulant properties of bovine protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* 1977; 16: 5824-31.

KISIEL W:

Human Plasma Protein C: Isolation, characterization, and mechanism of activation by α -Thrombin. *J Clin Invest* 1979; 64:761-9.

KOSTER T, ROSENDAAL F, DE RONDE A, BRIIT E, BERTINA RM:

Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia study. *Lancet* 1993; 342, 1503-1506.

KOSTER T, ROSENDAAL FR, BRIET E, VAN DER MEER FJM, COLLY LP, TRIENEKENS PH, POORT SR, REITSAM PH, VANDENBROUCKE JP:

Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 85: 2756-61.

KU GH, WHITE RH, CHEW HK, HARVEY DJ, ZHOU H, WUN T:

Venous thromboembolism in patients with acute leukemia: incidence, risk factors, and effect on survival. *Blood* 12/2008. doi:10.1182/blood-2008-08-175745

LIND B, SCHWARTZ M, THORSEN S:

Six different point mutations in seven Danish families with symptomatic protein C deficiency. *Thromb Haemost* 1995; 73 (2): 186-93.

LONG GL:

Structure and evolution of the human genes encoding protein C and coagulation factors VII, XI and X. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 1986. 51: 525-529.

LU DS, KALAFATIS M, MANN KG, LONG GL:

Comparison of activated protein C protein S- mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood* 1996; 87: 4708-17.

MALAR RA, KLEISS AJ, GRIFFIN JH:

Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin dependent anti-coagulation enzyme. *Blood* 1982; 59: 1067-72.

MALAR RA, ENDRESS-BROOKS J, MILLER C:

Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1985; 66: 59-63.

MALAR RA, ADCOCK DM:

Clinical evaluation of protein C. A comparative review of antigenic and functional assays. *Hum Path* 1989; 20: 1040-47.

MALAR RA, MONTGOMERY RR, BROEKMANS AW:

Diagnosis and treatment of homozygous protein C deficiency. Report on the working party on homozygous protein C deficiency of the subcommittee on protein C and protein S. International committee on thrombosis and hemostasis. *Journal of Paediatrics* 1989; 114:528-43.

MALAR RA, MASTOVICH S:

Hereditary protein C deficiency: a review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1990; 1:319-30.

MAMMEN EF, THOMAS WR, SEEGER WH:

Activation of purified prothrombin to autoprothrombin II (platelet cofactor II or or autoprothrombin II -A). *Thromb Diath Haemorrh* 1960; 5: 218-49.

MAMMEN EF:

Blutung und Thrombose. *Medwelt* 1991; 42:612-7.

MANUCCI PM, VIGANO S, BOTTASSO B, CANDOTTI G, BOZETTI P, ROSSI E, PARDI G:

Protein C: antigen during pregnancy, delivery and puerperium. *Thromb Haemost* 1984; 52: 217.

MANUCCI PM:

The molecular basis of inherited thrombophilia. *Vox Sang* 2000; 78 (2): 39-45.

MARCINIAK E, MURANO G, SEEGER WH:

Inhibitor of blood clotting derived from prothrombi. *Thromb Diath Haemorrh* 1967; 18: 161-6.

MILETICH JP, LEYCAM JF, BROZE GJ:

Detection of single chain protein C in human plasma. *Blood* 1983; 62-1: 306a.

MILETICH JL, SHERMAN L, BROZE G:

Absence of Thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317: 991-996.

MILETICH J, PRESCOTT W, WHITE M, MAJERUS T, BOVILL EG:

Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 1993; 72: 477-80.

MIAO CH, HO WT, GREENBERG DL, DAVIE EW:

Transcriptional regulation of the gene coding for human protein C. *Journ of Biol Chem* 1996; 271-16: 9587-9594.

MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF:

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;16:1215.

MIYATA T, SAKATA T, ZHENG YZ, TSUKAMOTO H, UMEYAMA H, UCHIYAMA S, IKUSAKA M, YOSHIOKA A, IMANAKA Y, FUJIMURA H, KAMBAJASHI J, KATO H:

Genetic characterization of protein C deficiency in Japanese subjects using a rapid non radioactive method for single-stand conformational polymorphism analysis and a model building. *Thromb Haemost* 1996 Sep; 76 (3): 302-11.

MÜLLER-BERGHHAUS G, PÖTSCH B:

Hämostaseologie 2000, Springer Verlag.

MULLIS KB, FALOONA FA:

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reactio. *Methods Enzymology* 155, 335, Academ. Press, London 1987; 155, 355.

MURAYAMA I, BELL CE, MAJERUS PW:

Thrombomodulin found an endothelium of aeries, veins, capillaries, and lymphatics and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 1985; 101:363-72.

MURAKAWA M, OKAMURA T, KAMURA T, KUROIWA M, HARADA M, NIHO Y:

A comparative study of partial primary structures of the catalytic region of mammalian protein C. *Br J Haematol* 1994; 86: 590-600.

NEGRIER C, BERRUYER M, DURIN A, PHILIPPE N AND DECHAVANNE M:

Increased thrombin generation in a child with a combined factor IX and protein C deficiency. Volume 81, Issue 3, pp. 690-695, 02/01/1993

NOWACK-GÖTTL M, FUNK M, MOSCH G, WEGERICH B, KORNHUBER B, BREDDIN HK:

Univariant tolerance regions for fibrinogen, antithrombin III, protein C, protein S, plasminogen and α -2-antiplasmin in children using the new automated coagulation laboratory (ACL) method. *Klin Pädiatrie* 1994; 206: 437-39.

PABINGER-FASCHING I, BERTINA RM, LECHNER K, NIESSNER H, KORNINGER C:

Protein C deficiency in two Austrian families. *Thromb Haemost* 1983; 50: 10- 13.

PABINGER I, SCHNEIDER R:

Thrombotic risk in hereditary antithrombin protein C, or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. *Arterioscl and thromb and Vasc Biol.* 1996; 16/6: 742-48.

PATRICCHIANI P, AIELLO V, PALAZZI P, CALZOLARI E, BERNARDI F:

Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum Genetics* 1989; 81: 191-192.

A. PAVLOVA, M. LIM-EIMER, M. WATZKA, E. LINDHOFF-LAST, B. LUXEMBOURG, W. KREUZ, E. RUSICKE⁵, E. SEIFRIED AND J. OLDENBURG

Molecular Genetic Analysis in Patients with Inherited Thrombophilia and Antithrombin, Protein C or Protein S Deficiency. 34th Hemophilia Symposium Hamburg 2003, Springer 2005; 298-301.

POLACK B, POUZOL P, AMIRAL J, KOLODIE L:

Protein C levels at birth. *Thromb Haemost* 1984; 52: 188-190.

PLUTZKY J. HOSKINS JA. LONG JL. CRABTREE GR:

Evolution and organisation of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 546-50.

PROCMD:

<http://www.itb.cnr.it/procmd/index.html>

REITSMA PH, POORT SR, ALLART CF, BRIET E, BERTINA RM:

The spectrum of genetic defects in a panel of 40 dutch families with symptomatic protein C deficiency type 1. *Blood* 1991; 78/4: 890-894.

REITSMA PH, POORT SR, BERNARDI F:

Protein C deficiency: A Database of mutations. *Thromb Haemost* 1993; 69: 77-84.

REITSMA PH, BERNARDI F, DOIG RG, GANDRILLE S, GREENGARD JS, IRELAND H, KRAWCZAK M, LIND, LONG GL, POORT SR, SAITO H, SALA N, WITT I, COOPER DN:

Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb Haemostasis* 1995; 73/5: 876-89.

ROSENDAAL FR, DOGGEN CJ, ZIVELIN A, ARRUDA VR, AICH M, SISCOVICK DS, HILLARP A, WATZKE HH, BERNARDI F, CUMMING AM, PRESTON FE, REITSMA PH:

Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Hemost* 1998; 79, 706-708.

RIDKER PM, HENNEKENS CH, LINDPAINTER K:

Mutation in the gene coding for coagulant factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy me. *New Engl Journ Med* 1995; 332, 912-17.

ROSENDAAL FR:

Venous Thrombosis: a multicause disease. *Lancet* 1999; 353, 1167-1173.

SAIKI RK, FALOONA FA, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N:

Identification of the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme. *Science* 1985; 230: 1350.

SAKATA Y, CURRIDEN S, LAWRENZ D, GRIFFIN JH, LUSKUTOFF DJ:

Activated Protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1985; 82:1121-25.

SALA N, OWEN WG, COLLEN D:

A functional assay of protein C in human plasma. *Blood* 1984; 63-3: 671-75.

SALA N, PORT SR, BERTINA RM, SORIA JM, FONTCUBERTA J, REITSMA PH:

Identification of two deletions and four point mutations in the protein C gene in unrelated patients with hereditary protein C deficiency. *Thromb Haemost* 1991; 65: 1197 (Abstract).

SALEM HH, BROZE GJ, MILETICH JP, MAJERUS PW:

Human coagulation factor Va is a cofactor for the activation of protein C. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1983; 80: 1584-88.

Sanger F, Miklen S, Coulsen A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 1977; 74, 5463-5467.

Salomon O, Steinberg DM, AZivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, Berliner S, Inbal A, Many A, Lubetsky A, Varon D, Martinowitz U, Seligsohn U:

Single and Combined Prothrombotic Factors in Patients With Idiopathic Venous Thromboembolism Prevalence and Risk Assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:511-518.

Sanger F, Miklen S, Coulsen A. Sequencing with chain terminating inhibitors *Proc Nat Acad Sci USA.* 1977; 74, 5463-5467.

SCHMIDT S, PETERSHOFEN EK, BEEK H, HELLSTERN P, SEIFRIED E:

A novel heterozygous point mutation in the protein C gene: A8554G (D280G). *ISTH Paris* 2001. Abstract 61.

SEEGERS WH, NOVOA E, HENRY RL, HASSOUNA HI:

Relationship of „new“ vitamin k-dependent protein C and „old“ autoproteombin II.A. Thromb Res 1976; 8: 543-52.

SEIFRIED E, PETERSHOFEN EK, SCHMIDT S, FRANK R, ESCURIOLA C, WITT I, KREUZ W:

Identifizierung einer neuen Punktmutation T8743->C im Protein C Gen. 31. Jahrestagung der DGTI, Bern 1998, Abstract.

SEIFRIED E, HEINRICH F:

Lungenembolie. Thieme Verlag 2000: 23-48.

SELIGSOHN U, BERGER A, ABEND M, RUBIN M, ATTIAS D, ZIVELIN A, RAPAPORT SI:

Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in a newborn. N Engl J Med 1984; 310: 559-562.

SORIA JM, MORTELL M, JIMINEZ-ASTORGA C, ESTIVILL X, SALA N:

Severe Type I Protein C Deficiency in a compound heterozygote Y124C and Q132X Mutations in Exon 6 of the PROC Gene: Thrombosis and Haemostasis 1995; 74: 1215-20.

SPEK CA, REITSMA PH, BERTINA RM:

Type I protein C deficiency caused by disruption of a HNF-6/HNF-1 binding site in the human protein C gene promotor. Hemost and Thromb Res Ctr., Dept Hemat, LUMC Leiden.

SPEK CA, POORT CR, BERTINA RM, REITSMA PH:

Determination of the allelic and haplotype frequencies of three polymorphism in the promotor-region of the human protein C gene. Blood Coag Fibrinolysis 1994; 5:309-11.

STENFLO J:

A new vitamin K-dependent protein: purification from bovine plasma and preliminary characterization. J Biol Chem 1976; 251: 355-63.

STENFLO J, FERNLUND P, TUFVESSON A

Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. Journ Biol Chem 1982. 257: 12180-12190.

SUGAHARA Y, MIURA O, YUEN P, AOKI N:

Protein C deficiency Hong Kong 1 and 2: Hereditäre protein C deficiency caused by two mutant alleles a 5'-nucleotide deletion and a missense mutation. Blood 1992; 80: 126-33.

SUSUKI K, STENFLO J, DAHLBÄCK B, THEODORSSON B:

Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. J Biol Chem 1983; 258: 1914-20.

TAIT RC, WALKER ID, PERRY DJ, ISLAM SI, DALY ME, MCCALL F, CONKIE JA, CARELL RW:

Prevalence of Antithrombin deficiency in the healthy population. Br Journ of Hematol 1994; 87, 106-112.

TAIT RC, WALKER ID, REITSMA P, ISLAM SI, MCCALL F, POORT SR, CONKIE JA, BERTINA RM:

Prevalence of Protein C deficiency in the healthy population. Thromb Haemost. 1995; 73: 87-93.

THOMAS L:

Labormedizin, TH-Verlag 1997. S. 53-58.

TOLENTINO, BAHOU:

Platelets. Elsevier Science-Verlag 2002, Kapitel 8, 11 und 12.

TOMCZAK JA, ANDO RA, SOBEL HG, BOVILL EG, LONG GL:

Genetic analysis of a large kindred exhibiting type I protein C deficiency and associated thrombosis. Thromb Res 1994; 74: 243-54.

TSAY W, GREENGARD JS, GRIFFIN JH:

Exonic polymorphism in the protein C gene: interethnic comparison between Caucasians and Asians. Hum Gen 1994; 94: 177-78.

VAN HINSBERGH VWM, BERTINA RM, VAN WIJNGAARDEN A, VAN TILBURG NH, EMEIS JJ, HAVERKATE F:

Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. Blood 1995; 65: 444-51.

VEHAR GA, DAVIE EW:

Preparation and properties of bovine factor VIII. Biochemistry 1980; 19: 401.

WACEY AI, PEMBEERTON S, COOPER DN, KAKKAR VV, TUDDENHAM EGD:

A molekular Model of the serine protease domain of activated protein C: application to the study of missense mutations causing protein C deficiency. Br J of Haematology 1993; 84:290-300.

WALKER FJ:

Regulation of activated protein C by protein S: The role of the cofactor protein in species specificity. Thromb Res. 1981. 22: 321.

WALKER FJ:

Regulation of activated protein C by protein S: The role of phospholipid in factor V inactivation. Journ Biol Chem 1981; 256: 11,128.

WALKER FJ:

Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipids in factor V inactivation. Journ of Biol Chem 1983; 258: 1914-20.

WILLIKE A, GERDSEN F, BAUERSACHS RM, LINDHOFF-LAST E:

Rationelle Thrombophiliediagnostik. Deutsches Ärzteblatt 2002; 99:31-32: 1685-90.

WITT I:

Ursachen von Thromboseneigung erkennen. Diagnostica Dialog 1993; 4:10-16.

WITT I:

Molekularbiologische Grundlagen und Diagnostik der hereditären Defekte von Antithrombin III, Protein C und Protein S. Hämostaseologie 1994; 14: 199-208.

Lebenslauf

Sven Schmidt, ledig
Am 05.04.1972

geboren in Offenbach am Main als Sohn von
Günter Schmidt und Ursula Schmidt

1978 bis 1984

Goetheschule Mühlheim am Main

1984 bis 1991

Allgemeine Hochschulreife Friedrich Ebert-
Schule, Mühlheim am Main

November 1991

Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Johann Wolfgang Goethe Universität,
Frankfurt am Main

August 1995

Physikum

August 1996

1. Staatsexamen

September 1998

2. Staatsexamen

Oktober 1998

PJ in der Orthopädischen Universitätsklinik
Stiftung Friedrichsheim, Frankfurt am Main

Juni 1999

3. Staatsexamen

Mai 2000 bis
November 2002

AIP in der Orthopädischen Universitätsklinik
Stiftung Friedrichsheim, Frankfurt am Main

21.02.2003

Approbation

Dezember 2002 bis
April 2003

Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für
Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
des DRK-Blutspendedienstes Baden-
Württemberg - Hessen

Juni 2003

Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie,
Krankenhaus Sachsenhausen in Frankfurt

November 2004

Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirur-
gie des Klinikums Offenbach

Seit Juni 2006

Assistenzarzt in der Orthopädischen Universi-
tätsklinik Friedrichsheim gGmbH in Frankfurt

13. Mai 2009

Facharztprüfung „Orthopädie/Unfallchirurgie“

Mühlheim/M, 15. Mai 2009 _____

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Laboratorien des Institutes für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Blutspendedienstes Baden Württemberg-Hessen in Frankfurt am Main. Herrn Prof. Seifried danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation und für seine fachliche und freundliche Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Herrn Dr. Rainer Frank danke ich für die Betreuung der Arbeit. Herrn Dr. med. Eddi Petershofen und Herrn PD Dr. med. Reinhard Henschler gilt mein besonderer Dank. Ein großer Dank geht auch an Herrn Dr. med. Markus Müller. Meinem Freund Stephan Göttig danke ich insbesondere für seine aufmunternde Unterstützung sowie für seine regen Denkanstöße im und außerhalb des Labors.

Bei den Mitarbeitern des HLA-Labors, besonders Frau Kilp, Frau Streit und Frau Feid möchte ich mich besonders bedanken. Sie brachten mir wesentlich die Methoden zum Arbeiten mit der DNA und dem Sequenzierer bei. Ein ebenso großer Dank geht auch Frau Ute Rabold und Frau Teixidor.

Ich danke insbesondere meiner Freundin Anke Schwietzer.

Abschließend danke ich meiner Mutter Ursula Schmidt und meinem Vater Günter Schmidt, die mir mein Studium und somit die Durchführung der Doktorarbeit ermöglichten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Eine Methode zur Diagnostik von Mutationen im Protein C-Gen“

im

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main des
DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg - Hessen

unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Erhard Seifried mit Unterstützung durch Dr. Rainer Frank ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mühlheim am Main, den 15. Mai 2009