

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schneppenheim

## **Molekulare Mechanismen von Missensemutationen beim schweren von Willebrand-Syndrom Typ 3**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Rachel Ginsburg  
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.08.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. R. Schneppenheim**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. R. Sauter**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. F. Langer**

# INHALT

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DIE GESCHICHTE DES VON WILLEBRAND-SYNDROMS	1
1.2	DER VON WILLEBRAND-FAKTOR	3
1.2.1	Biosynthese	3
1.2.2	Funktion	6
1.3	DAS VON WILLEBRAND-SYNDROM	7
1.3.1	Klassifikation	7
1.3.2	Epidemiologie	8
1.3.3	Symptomatik	9
1.3.4	Der Typ 3 des von Willebrand-Syndroms	10
1.3.5	Diagnostik	12
1.3.6	Therapie	14
1.4	FRAGESTELLUNG	15
<b>2</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	PATIENTEN	16
2.2	METHODEN	18
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Mutagenese	19
2.2.3	Transformation	21
2.2.4	Minipräparation der Plasmide	22
2.2.5	Sequenzierung	24
2.2.6	Maxipräparation	25
2.2.7	Transiente Transfektion	27
2.2.8	Immunoassayverfahren	30
2.2.9	Multimeranalyse	32
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
3.1	REKOMBINANTE EXPRESSION DER EINZELNEN PATIENTENMUTATIONEN	37
3.2	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	73

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>76</b>
4.1	INDIKATIONEN FÜR DIE MOLEKULARGENETISCHE DIAGNOSTIK .....	76
4.1.1	Fehlende Mutationen .....	77
4.1.2	Missensemutationen mit normaler Sekretion .....	78
4.2	MISSENSEMUTATIONEN MIT VERMINDERTER SEKRETION.....	81
4.2.1	Cysteinmutationen .....	81
4.2.2	andere Mutationen .....	84
4.3	KLASSIFIZIERUNG DER DEFEKTE .....	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>100</b>
8.1	MATERIAL .....	100
8.2	REZEPTE, ANSÄTZE UND PROGRAMME.....	105
8.3	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....	108
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>111</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>112</b>

## 1 Einleitung

Das von Willebrand-Jürgens-Syndrom (VWS) beruht auf einer Störung der Thrombozyten-vermittelten Hämostase mit dem gemeinsamen Merkmal einer vererbten quantitativen oder qualitativen Abweichung des von-Willebrand-Faktors (VWF).

### 1.1 Die Geschichte des von Willebrand-Syndroms

Im Jahr 1926 veröffentlichte der finnische Internist Erik Adolf von Willebrand seine Beobachtungen bei einer Familie von der Insel Föglö, die zu den finnischen Ålandinseln in der Ostsee gehört. Von den 66 Familienmitgliedern wiesen 23 Personen, darunter vor allem Frauen, Symptome infolge einer verlängerten Blutungszeit auf, während die Blutgerinnungszeit normale Werte zeigte (Abb. 1). Da dies im Gegensatz zur klassischen X-chromosomal-rezessiv vererbten Hämophilie steht, bei der die Blutgerinnungszeit deutlich gestört ist, bezeichnete von Willebrand das Krankheitsbild als „Hereditäre Pseudohämophilie“ (von Willebrand 1926).

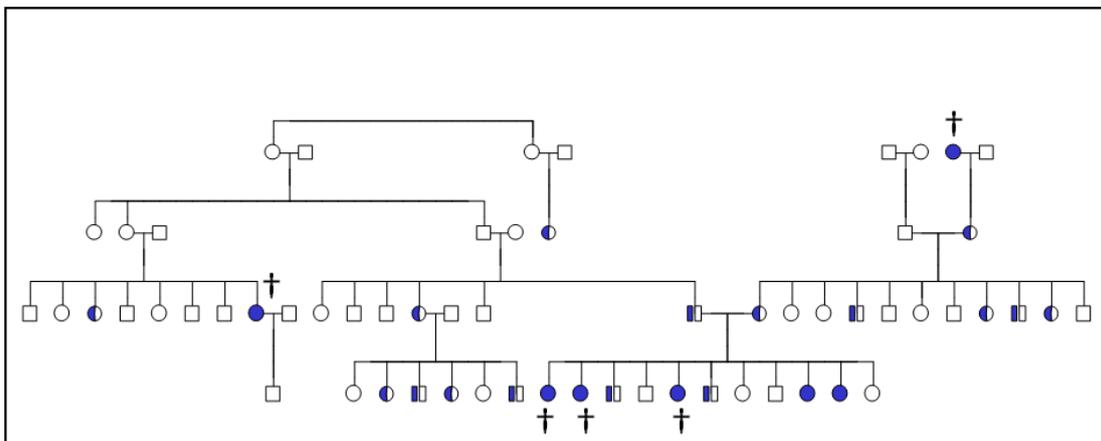


Abbildung 1: Blutersippe von den Åland-Inseln. † = an Blutung verstorben. Modifiziert nach von Willebrand, 1926.

Die Beobachtung, dass vor allem die weiblichen Mitglieder der Familie schwere Verläufe zeigten, ließ an eine geschlechtsgeprägte Vererbung denken. Über eine „weibliche Hämophilie“ hatte bereits der Gießener Gynäkologe Ferdinand Adolf Kehrer in seiner 1876 erschienen Monographie „Die Hämophilie beim weiblichen Geschlechte“ berichtet (Kehrer 1876). Auch hier wurden „frauenspezifische“ Blutungstypen wie verlängerte und verstärkte Regelblutungen, Fehlgeburten und letal endende postpartale Blutungskomplikationen beschrieben.

1933 konkretisierte von Willebrand mit dem Leipziger Hämatologen Rudolf Jürgens diese Blutungsneigung. Die Publikation „Konstitutionelle Thrombopathie von Willebrand-Jürgens“ (von Willebrand & Jürgens 1933), führte zu der noch heute im deutschen Sprachgebrauch üblichen Bezeichnung „von Willebrand-Jürgens-Syndrom“, wobei meist die Kurzform „von Willebrand-Syndrom“ (VWS) verwendet wird. International hat sich die Bezeichnung „von Willebrand Disease“ (VWD) durchgesetzt.

Anfang der Fünfziger Jahre konnte gezeigt werden, dass das von Willebrand-Syndrom mit einer verlängerten Blutungszeit gemeinsam mit einer erniedrigten Faktor-VIII-Aktivität (FVIII:C) einhergehen kann (Alexander & Goldstein 1953). 1959 gelang es in Schweden, durch Gabe von Cohn-Fraktion I-0, einem Präzipitat aus Blutplasma, die Blutungszeit bei VWS-Patienten auf Normalwerte von 2 bis 7 Minuten zu verkürzen und, anders als bei Hämophilie-Patienten, die FVIII-Halbwertszeit zu verlängern. Durch weitere Versuchsreihen kamen Nilsson und Mitarbeiter zu dem Schluss, dass nicht der FVIII, sondern ein bisher unbekannter Stoff als ein die Blutungszeit korrigierender Faktor anzusehen ist (Nilsson et al. 1957).

Dieser Faktor wurde Anfang der Siebziger Jahre erstmals nachgewiesen. Das Protein wurde wegen seiner Beziehung zu FVIII als FVIII-assoziiertes Antigen bezeichnet (Zimmerman et al. 1971). Im gleichen Jahr wurde erkannt, dass das Antibiotikum Ristocetin in der Lage ist, Thrombozyten von Normalpersonen und

Patienten mit Hämophilie, nicht aber von Patienten mit VWS zu aggregieren (Howard & Firkin 1971). Das Protein, das mit dieser Funktion verknüpft sein musste, wurde fortan als von Willebrand-Faktor (VWF) oder Ristocetin-Cofaktor bezeichnet. In den folgenden Jahren konnte die Unterschiedlichkeit der beiden Gerinnungsfaktoren FVIII und VWF genauer beschrieben werden. Es wurde aufgezeigt, dass das Fehlen oder Defekte des VWF zum VWS führen, während quantitative oder qualitative Störungen des FVIII die Hämophilie bedingen. Als 1985 die kodierende Gensequenz des VWF von vier Gruppen unabhängig voneinander aufgeklärt wurde (Ginsburg et al. 1985, Lynch et al. 1985, Sadler et al. 1985, Verweij et al. 1985) und anschließend auch die Aminosäuresequenz publiziert wurde (Titani et al. 1986), konnte mit der molekularen Diagnostik des VWS begonnen werden.

### **1.2 Der von Willebrand-Faktor**

Der von Willebrand-Faktor ist ein großes, multimeres Glykoprotein. Er ist das größte bekannte lösliche Plasmaprotein beim Menschen (Ruggeri & Ware 1992). Er wird von Endothelzellen und von Megakaryozyten produziert und dient in der zellulären Hämostase als Mediator zwischen Endothel und Thrombozyten sowie in der plasmatischen Hämostase als Schutz des FVIII. Ein Mangel oder qualitative Defekte des VWF führen zum von Willebrand-Jürgens-Syndrom.

#### 1.2.1 Biosynthese

Der VWF wird in Endothelzellen (Jaffe et al. 1974) und in Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten (Sporn et al. 1985), synthetisiert und erfährt mehrere posttranslationale Modifikationen.

Das für den VWF kodierende Gen findet sich am distalen Ende des kurzen Arms des Chromosoms 12 (12p13.2) (Ginsburg et al. 1985). Das gesamte Gen besteht aus 178 Kilobasen und macht damit mehr als 0,1% des Chromosoms

12 aus (Mancuso et al. 1989). Die kodierende Sequenz besteht aus 8439 Nukleotiden, die ein 2813 Aminosäuren großes monomeres Vorläuferprotein, den Prä-Pro-VWF (VWFpp) mit einem Molekulargewicht von 360 Kilodalton kodiert (Titani et al. 1986). Es besteht aus einer Signalsequenz und einem Propeptid, welche von den Exons 2 bis 17 kodiert werden und dem reifen VWF, der von den Exons 18 bis 52 kodiert wird. Exon 1 hat keine kodierende Funktion (Bonthron et al. 1986). Nach Abspaltung des Signalpeptids entsteht der Pro-VWF. Er besteht größtenteils aus vier repetitiven funktionellen Domänen vom N- zum C-terminalen Ende: D1, D2, D', D3, A1-3, D4, B1-3, C1, C2 und einer carboxyterminalen CK-Domäne (Shelton-Inloes et al. 1986). Den einzelnen Domänen werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben, so dienen bestimmte Domänen als Bindungsstellen für den FVIII, Kollagen, Heparin und die Thrombozytenproteine GPIb und GPIIb/IIIa. Dieser spezielle Aufbau (s. Abb. 2) lässt auf eine komplexe evolutionäre Entwicklung des VWF-Gens schließen (Ruggeri & Ware 1993). Am carboxyterminalen Ende findet sich die Cystine knot like domain (CK-Domäne). Sie dient im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Dimerisierung der Monomere (Sadler 1998). Dies geschieht über Disulfidbrücken. Diese Dimere werden im Golgi-Apparat weiter glykosyliert und sulfatiert (Wagner & Marder 1984). Nun erfolgt eine Polymerisation der dimeren Pro-VWF an deren aminoterminalen Ende. Hierfür verantwortlich sind die D1- und D2-Domänen des Propeptids, die über Disulfidisomerasekonsensussequenzen (CGLC) verfügen. Eine weitere CGLC-Sequenz findet sich in der D3-Domäne in der maturen VWF-Untereinheit, die auch an der Multimerisierung beteiligt zu sein scheint. Eine vierte CGLC-Sequenz in der D4-Domäne scheint dagegen keine Rolle für die Multimerisierung zu spielen (Schneppenheim, unpubliziert). Bis zu 50 der Pro-VWF-Dimere bilden 500 bis 20.000 kD große Multimere gleicher Zusammensetzung. Schließlich wird das Propeptid an seiner Furin-Spaltstelle abgespalten und zusammen mit dem maturen multimeren VWF sezerniert.

## Einleitung

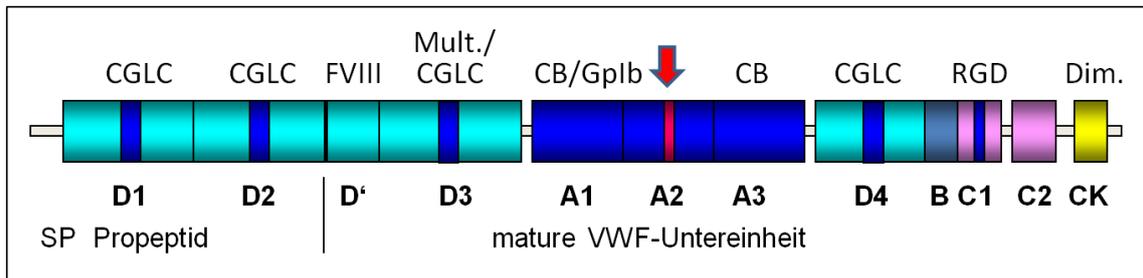


Abbildung 2: Struktur-Funktionsbeziehungen der Domänen des VWF-Monomers.  
CGLC=Disulfidisomerase-Konsensus-Sequenz,  
FVIII=FVIII-Bindungsregion, Mult.=Multimerisierungsregion,  
CB=Kollagenbindungsregion, GPIb=GPIb-Bindungsregion  
RGD=Bindungssequenz für GPIIb/IIIa, Dim.=Dimerisierungsregion  
↓=proteolytische Schnittstelle für ADAMTS 13. Nach Prof. Dr. Schneppenheimer, mit freundlicher Genehmigung.

Der VWF kann auf zwei Wegen aus den Endothelzellen freigesetzt werden. Er wird entweder konstitutiv in das Plasma sezerniert (Loesberg et al. 1983) oder in bestimmten Zellorganellen gespeichert (Wagner et al. 1982). Diese Speicherorganellen, die sogenannten Weibel-Palade-Bodies (WPB), beinhalten die größten und damit die für die Thrombozytenadhäsion potentesten Multimere (Sporn et al. 1987), die auf bestimmte Signale wie Fibrin (Ribes et al. 1987), Histamin (Hamilton & Sims 1987), Thrombin (Levine et al. 1982), Serotonin (Schlüter & Bohnensack 1999) oder Vasopressin (Kaufmann et al. 2000) sezerniert werden.

In Megakaryozyten und damit in Thrombozyten wird der VWF in sogenannten  $\alpha$ -Granula gespeichert und bei der Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt. Eine konstitutive Sekretion findet in diesen Zellen nicht statt. Das bedeutet, dass der normalerweise im Blut zirkulierende VWF fast ausschließlich aus Endothelzellen stammt (Bowie et al. 1986).

Nach seiner Sekretion wird der VWF durch die „VWF cleaving protease ADAMTS13“, eine spezifische Metalloprotease, in der A2-Domäne zwischen Tyrosin 1605 und Methionin 1606 gespalten (Dent et al. 1990). Im Plasma finden sich daher sowohl intakte Multimere als auch proteolytische Fragmente verschiedener Größe. Bei der elektrophoretischen Auftrennung, der

sogenannten Multimeranalyse findet sich daher ein typisches Bild der individuellen Oligomere, was man sich bei der Diagnostik qualitativer Veränderungen des VWF zu Nutze macht.

### 1.2.2 Funktion

Der von Willebrand-Faktor hat wesentliche Funktionen sowohl in der primären, also der zellulären, als auch in der sekundären, also plasmatischen Hämostase. Diese Funktionen werden über die unter 1.2.1 beschriebenen bestimmten Domänen vermittelt (Ruggeri 2007).

Kommt es im venösen System zu einer Endothelverletzung, treten Thrombozyten direkt in eine Wechselwirkung mit den unter dem Endothel liegenden Matrixproteinen. Über spezifische Glykoproteinrezeptoren der Thrombozyten kommt es zur Plättchenadhäsion.

Im arteriellen System und im Bereich der Mikrozirkulation herrschen allerdings hohe Scherkräfte vor. Hier dient der VWF über seine oben beschriebenen funktionellen Domänen als Mittler zwischen den Kollagenen im Subendothelium und den Thrombozytenglykoproteinen GPIb und GPIIb/IIIa.

Die bei einer Endothelverletzung freiliegenden Kollagene Typ I, III, und VI interagieren mit Bereichen in der A1- und A3 Domäne des VWF, was dessen Konformationsänderung verursacht (Mazzucato et al. 1999). Auch die hohen Scherkräfte in diesem Bereich des Blutkreislaufs führen zu einer Entfaltung der VWF-Multimere in ihrer strangförmigen Struktur (Siedlecki et al. 1996). Das ist die Ursache einer erhöhten Affinität des VWF in der A1-Domäne und am Grenzbereich der A1- zur D3-Domäne für den GPIb-Rezeptor der Thrombozyten (Ware et al. 1991). Es kommt zur Thrombozytenadhäsion. Die gleiche Konformationsänderung des VWF kann auch das Antibiotikum Ristocetin hervorrufen (Howard & Firkin 1971).

Bei der sekundären, plasmatischen Hämostase dient der VWF dem Schutz des FVIII vor einer vorzeitigen Clearance. Der VWF bindet über seine D'- und

Teile der D3-Domäne an FVIII (Foster et al. 1987) und beeinflusst so indirekt die sekundäre Hämostase. Bei der primären Hämostase sind die Multimere mit dem höchsten Molekulargewicht am effektivsten, bei der sekundären Hämostase spielt die Größe der Multimere dagegen keine Rolle (Fischer et al. 1996).

### **1.3 Das von Willebrand-Syndrom**

#### 1.3.1 Klassifikation

Das von Willebrand-Syndrom ist wie bereits dargelegt eine Gerinnungsstörung, die durch einen Mangel, gestörte Funktion oder gestörte Struktur des von Willebrand-Faktors hervorgerufen wird. Ursächlich sind hierbei Mutationen des VWF-Gens (Sadler 1994).

Das VWS wird in drei Hauptgruppen eingeteilt:

Beim Typ 1 ist die Konzentration des qualitativ intakten VWF vermindert, beim Typ 3 meist nicht mehr nachweisbar. Beim Typ 2 finden sich qualitative Defekte. Er wird in vier Untergruppen unterteilt: beim Typ 2A fehlen die großen, in der primären Hämostase aktivsten Multimere, so dass es zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion kommt. Der Typ 2B ist durch eine erhöhte Affinität des VWF für GPIb gekennzeichnet, in der Multimeranalyse können sich sowohl ein Verlust der großen Multimere als auch ein normales Bild finden. Kommt es trotz des Vorliegens großer Multimere zur gestörten Plättchenadhäsion, spricht man vom Typ 2M. Beim Typ 2N finden sich Varianten mit einer verminderten Bindungsaffinität für FVIII (Sadler et al. 2006).

### 1.3.2 Epidemiologie

Mit einer Prävalenz von ein bis zwei Prozent (Rodeghiero et al. 1987; Budde & Schneppenheim 2001) ist das von Willebrand-Syndrom die häufigste angeborene Gerinnungsstörung. Die meisten Betroffenen haben keine oder nur diskrete spontane Blutungssymptome, das klinisch relevante VWS tritt weitaus seltener, nämlich mit einer Prävalenz von 1:8.000-10.000, auf (Holmberg & Nilsson 1985, Castaman et al. 2003). Noch seltener sind Patienten vom VWS Typ 3 betroffen, dem im Vergleich der drei Hauptgruppen des VWS schwersten Form. Der Typ 3 tritt in Deutschland mit einer Prävalenz von ca. 1:500.000 auf (Lenk et al. 1988). Hinsichtlich der Verteilung der Häufigkeit des VWS Typ 3 gibt es zudem Unterschiede zwischen verschiedenen Ländern. Die höchsten Prävalenzen werden in arabischen Ländern, die niedrigsten in Südeuropa gemessen. Entsprechend seines autosomalen Vererbungsmodus weist der Typ 3 eine gleichmäßige Verteilung zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht auf (Eikenboom 2001).

Durch verbesserte diagnostische Methoden haben sich in jüngster Zeit die Daten zur prozentualen Verteilung der Hauptgruppen verändert. Der bisher mit einem Anteil von 80-90% angegebene Typ 1 findet sich wahrscheinlich bei weitaus weniger Patienten. Dafür sind bis zu 40% der Patienten vom Typ 2 betroffen, dessen Anteil bisher auf 15% beziffert wurde. Gemessen an allen VWS-Patienten tritt der Typ 3 mit Abstand am seltensten mit einem Anteil von zwei Prozent auf. In Abbildung 3 ist die Verteilung der einzelnen Typen des von Willebrand-Syndroms dargestellt, die innerhalb eines Jahres im Labor Prof. Budde, Hamburg, bei insgesamt 712 Patienten diagnostiziert wurden.

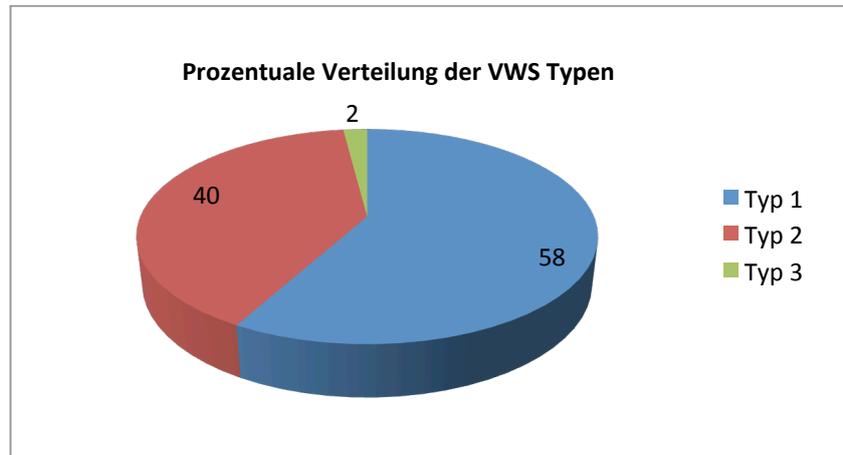


Abbildung 3: *Prozentuale Verteilung der VWS-Typen bei n=712 Patienten (Einsendungen aus dem Jahr 2005, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Budde). Einteilung nach verbesserten diagnostischen Methoden.*

### 1.3.3 Symptomatik

Die Symptomatik der Patienten mit VWS ist nicht einheitlich. Viele Patienten mit einem Typ 1 haben wenige oder nur diskrete Blutungssymptome. Je nach Subtyp kommt es beim Typ 2 zu verschiedenen Ausprägungen der Symptomatik. Patienten mit einem Typ 3 zeigen die schwersten Symptome. In einigen Familien variieren die Schweregrade der Blutungen, was an der unterschiedlichen Penetranz in der autosomalen Vererbung des VWS liegt (Castaman et al. 2003).

Das Leitsymptom des klassischen VWS ist die verlängerte Schleimhautblutung, vor allem von Nase und Mund. Seltener finden sich Blutungen des Magen-Darm-Traktes oder des Urogenitalsystems. Häufig kommt es zum vermehrten Auftreten von Hämatomen und bei Frauen oft zu verlängerter und verstärkter Menstruation. Viele Patienten fallen erst bei Operationen im Schleimhautbereich, wie Tonsillektomien, Adenotomien oder Zahnextraktionen durch verlängerte Blutungszeiten auf (Tab. 1).

## Einleitung

*Tabelle 1: Blutungssymptome in % bei Patienten mit VWS und Normalpersonen. Modifiziert nach Rodeghiero und Castaman, 2001.*

	Italien nur VWS (n=1286)			Skandinavien	
	Typ I n=944	Typ II n=268	Typ III n=74	VWS n=264	Kontroll- gruppe n=500
Epistaxis	56	63	74	62	5
Menorrhagien	31	32	32	60	25
Blutung nach Zahnextraktion	31	39	53	51	5
Hämatome	14	19	31	49	12
Blutung aus kleinen Wunden	36	40	50	36	0,2
Schleimhautblutungen	30	37	48	35	7
Postoperative Blutungen	20	23	41	28	1
Postpartale Blutungen	17	18	26	23	19
Gastrointestinale Blutungen	5	11	18	14	1
Gelenkblutungen	2	5	42	8	0
Hämaturie	2	4	11	7	1
Intrazerebrale Blutungen	0,5	0,3	8	nicht aufgef.	0

### 1.3.4 Der Typ 3 des von Willebrand-Syndroms

Da sich die vorliegende Arbeit mit dem VWS Typ 3 beschäftigt, soll an dieser Stelle genauer auf die Klinik und Pathophysiologie dieser Hauptgruppe eingegangen werden.

Der Typ 3 des VWS wird autosomal rezessiv vererbt, somit sind die Patienten entweder homozygot oder compound-heterozygot für eine Mutation des VWF-Gens. Er ist der seltenste Typ des VWS. Für die Mutationen des VWS Typ 3 gibt es keine spezifische Domäne am VWF-Gen, sie finden sich über den

## Einleitung

gesamten Genlocus verteilt. Zudem können große wie kleine Deletionen, Duplikationen, Insertionen, Splice-Site-Mutationen, Nonsense- und Missense-Mutationen auftreten, sodass sich genotypisch beim Typ 3 ein sehr heterogenes Bild ergibt (Schneppenheim et al. 1994; Abb. 4).

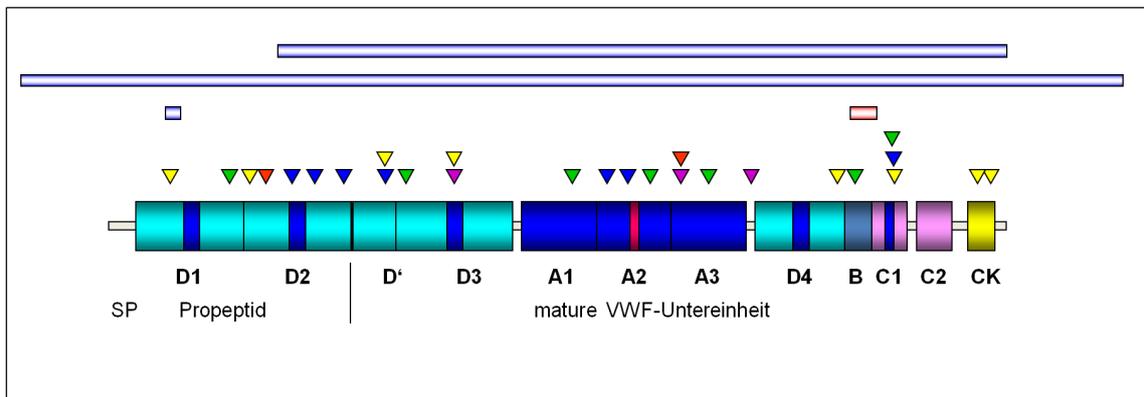


Abbildung 4: Lokalisationen der Mutationen beim schweren VWS Typ 3.

▼=kleine Deletion, █=große Deletion, ▼=kleine Insertion, █=große Insertion, ▼=Nonsense-Mutation, ▼=Splice-Mutation, ▼=Missense-Mutation. Nach Prof. Dr. Schneppenheim, mit freundlicher Genehmigung.

Wie unter 1.3.1 beschrieben, können beim Typ 3 des VWS entweder gar kein oder nur noch Spuren des VWF nachgewiesen werden, so dass es sowohl zu Störungen der primären als auch der sekundären Hämostase kommt.

Die Symptome äußern sich meist schon im frühen Kindesalter. Es finden sich klassischerweise eine verlängerte Blutungszeit und eine prolongierte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT). Die Konzentration des VWF-Antigens (VWF:Ag) ist meist nicht nachweisbar, ebenso sind keine Multimere darstellbar. Zudem kommt es zu einer starken Verminderung des FVIII, da die protektive Funktion des VWF gegenüber dem FVIII fehlt. Daher ähnelt die Symptomatik der schweren Hämophilie A und es kann zusätzlich zu den oben genannten allgemeinen Symptomen wie Schleimhautblutungen oder Hämatomen auch zu schweren Blutungsereignissen wie intrazerebralen Blutungen oder

Gelenkblutungen kommen. Die folgende Abbildung beschreibt das Spektrum der Symptomatik bei 32 Patienten mit einem schweren Typ 3.

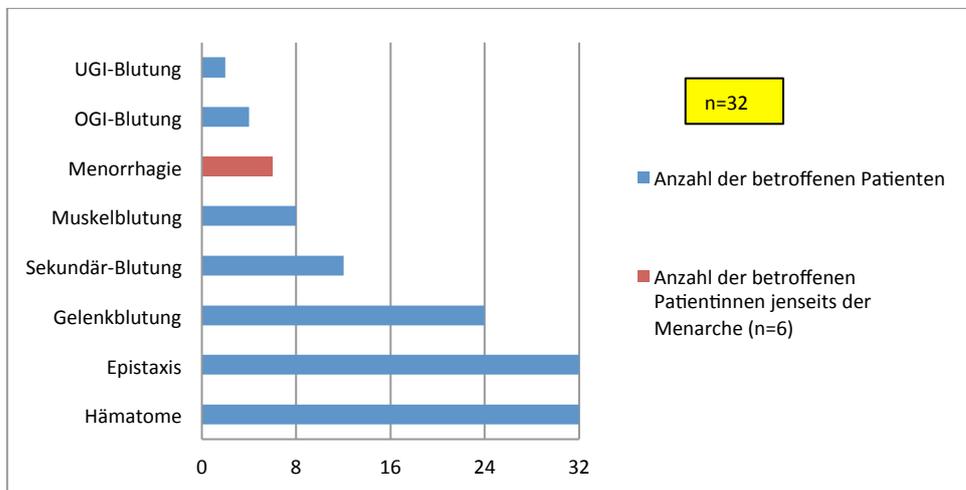


Abbildung 5: *Spektrum der Blutungssymptomatik (n=32) beim schweren VWS Typ 3. Alle 6 Patientinnen (100%) jenseits der Menarche litten an schweren Menorrhagien. UGI-Blutung= untere gastrointestinale Blutung; OGI-Blutung= obere gastrointestinale Blutung*

### 1.3.5 Diagnostik

Beim von Willebrand-Syndrom sind Quickwert bzw. INR und Thrombinzeit meist im Normbereich. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) kann bei gleichzeitig vorliegendem verringertem FVIII erniedrigt sein. Bei klinischem Verdacht auf das VWS sind neben der orientierenden Diagnostik erweiterte und schließlich spezielle Untersuchungen durchzuführen. Zur Basisdiagnostik gehören die Blutungs- und Familienanamnese sowie die Bestimmung der Blutungszeit (BZ) und der aPTT. Zusätzlich kann mit dem Platelet Function Analyzer (PFA 100) eine verlängerte Verschlusszeit gemessen werden. Aufgrund mangelnder Sensitivität, vor allem bei Typ 1 Patienten, und des hohen Aufwandes verliert die BZ immer mehr an diagnostischer Bedeutung.

Zur Diagnostik des VWS gehört die quantitative Bestimmung des VWF-Antigens (VWF:Ag) und zur Bestimmung der Interaktion des VWF mit GPIb als indirekter Untersuchung die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (VWF:RCo). Neu in der Diagnostik ist ein direkter Gplb-Bindungsassay für die VWF-Funktion. Als

## Einleitung

---

weitere funktionelle Untersuchung des VWF gilt die Kollagenbindungskapazität (VWF:CB). Zur Unterscheidung der verschiedenen Subtypen sind u. a. auch die Bestimmung der VWF-Faktor VIII-Bindungsaktivität (VWF:FVIII:B), die für die Diagnostik des Typ 2N unerlässlich ist, und die Ristocetin-induzierte Plättchenagglutination (RIPA) zur Unterscheidung des Typs 2A vom Typ 2B zu nennen (Schneppenheim 2006).

Konfigurationsänderungen des VWF lassen sich durch die Multimeranalyse detektieren. Hierbei werden die Oligomere des VWF in einem Agarosegel elektrophoretisch in Subbanden aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot die Lumineszenz visualisiert.

Für die verschiedenen Typen des VWS gibt es in der Diagnostik verschiedene charakteristische Befundkonstellationen. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

*Tabelle 2: Charakteristische Befundkonstellationen der Typen des VWS. Modifiziert nach [http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/3\\_diagnosisandevaluation.htm](http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/3_diagnosisandevaluation.htm)*

Typ	BZ	Erweiterte Diagnostik			Spezielle Diagnostik			
		VWF:Ag	VWF:RCo	FVIII:C	VWF:CB	RIPA	Multimere Plasma	Multimere Thromb.
<b>n</b>	n	n	n	n	n	n	n	n
<b>1</b>	↑/n	<30	<30	↓/n	↓/n	↓/n	Alle vorh.	Alle vorh.
<b>2A</b>	↑	<30-200	<30	↓/n	↓	↓	Große u/o mittelgroße fehlen	Alle vorh. o. wie Plasma
<b>2B</b>	↑	<30-200	<30	↓/n	↓	↑↑	Große fehlen	Alle vorh.
<b>2M</b>	↑	<30-200	<30	↓/n	↓/n	↓/n	Alle vorh.	Alle vorh.
<b>2N</b>	N	30-200	30-200	↓↓	↓/n	n	Alle vorh.	Alle vorh.
<b>3</b>	↑↑↑	<3	<3	↓↓↓(<10)	nn	nn	nn	nn

n= normal, ↑,↑↑,↑↑↑= relative Zunahme; ↓,↓↓,↓↓↓= relative Abnahme; BT= Blutungszeit, VWF:Ag= VWF-Antigen in IU/dl; VWF:RCo= Ristocetin-Cofaktor-Aktivität in IU/dl; FVIII:C=FVIII-Aktivität; VWF:CB= VWF-Kollagen-Bindungskapazität; RIPA= Ristocetin-induzierte Plättchen-Aggregation; Multimere Plasma= Multimeranalyse im Plasma; Multimere Thromb.= Multimeranalyse in Thrombozyten

Zusätzlich zu labormedizinischen Messungen werden auch molekulargenetische Untersuchungen in der Diagnostik des VWS angewendet, die eine Verdachtsdiagnose bestätigen können oder eindeutige Klassifizierungen möglich machen. Schnelle Sequenziertechniken ermöglichen heute die Identifizierung von Mutationen in kurzer Zeit. Die Mutationsanalyse ist für eine fundierte genetische Beratung beim VWS Typ 3 unerlässlich.

### 1.3.6 Therapie

Die Therapie des VWS sollte sich nach Schweregrad und Typ richten. In den meisten Fällen bedarf es keiner systemischen Behandlung, lokale Therapien wie Druckverbände bei offenen Blutungen sind meist ausreichend. Zur Behandlung von spontan auftretenden schweren Blutungen und zur systemischen Prophylaxe bieten sich zwei verschiedene Optionen:

1. Das synthetische Vasopressinanalogen Desmopressin (1-deamino-8-D-argininie, DDAVP, Minirin ®) wirkt durch eine erhöhte endogene Ausschüttung des VWF aus den Weibel-Palade-Bodies (WBP). Durch die Erhöhung des VWF-Plasmaspiegels wird die verlängerte Blutungszeit korrigiert. DDAVP ist bei Patienten mit VWS Typ 1 wirksam, auch Patienten mit bestimmten Subtypen des VWS Typ 2 konnten mit diesem Präparat erfolgreich behandelt werden (Federici 2008; Schneppenheim et al. 2009).
2. Beim Typ 3 und der Mehrheit der Typ 2 Patienten müssen VWF und FVIII substituiert werden. Hierzu werden gereinigte Plasmakonzentrate eingesetzt, die sowohl VWF als auch FVIII enthalten.

### 1.4 Fragestellung

Bei autosomal rezessivem Erbgang sollten Patienten mit einem VWS Typ 3 zwei defekte VWF-Allele aufweisen. Somit sollten entweder homozygote oder compound-heterozygote Defekte vorliegen. Diese molekularen Defekte können sich in großen und kleinen Deletionen, Insertionen, Splice-Site-Mutationen oder Nonsensemutationen darstellen, die zu einem Nullallel führen. Bei diesen Mutationen kann eine Pathogenität hinsichtlich eines Typs 3 in der Regel als gegeben angenommen werden. Zusätzlich sind bei Patienten mit einem klinischen VWS Typ 3 auch Missensemutationen identifiziert worden. Diese Mutationen müssen prinzipiell nicht zwingend einen schweren VWF-Mangel bewirken, so dass die Kausalität der Missensemutationen bezüglich eines klinisch manifesten VWS Typ 3 weiterer Untersuchungen bedarf (Eikenboom 2001). Dazu kann man Prädiktionsprogramme zur Hilfe nehmen, deren Algorithmus die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität einer bestimmten Missensemutation vorhersagen kann. Allerdings ist die Sicherheit der Aussage eingeschränkt. In vitro-Expressionsstudien dagegen können den Pathomechanismus einer bestimmten Mutation in vielen Fällen reproduzieren.

Ziel dieser Arbeit ist daher, mittels Expressionsstudien von 19 Missensemutationen, die bei Patienten mit VWS Typ 3 gefunden worden waren, deren Kausalität und Pathomechanismus nachzuweisen.

## **2 Patienten und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Die zu untersuchenden Mutationen wurden ursprünglich bei 18 Patienten mit klinischer Diagnose eines VWS Typ 3 im Rahmen der Patientenversorgung in den Jahren von 1992 bis 2008 gefunden.

Die DNA dieser Patienten stammt aus dem Institut für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und dem Labor für Hämostaseologie der Medylis Laborgesellschaft mbH der Asklepios Klinik Altona, Hamburg, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Budde. Die DNA wurde in den Jahren 1992 bis 2008 zur Diagnostik aus ganz Deutschland und in einem Fall aus Belgien zugesandt und zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Die Daten zweier Patienten stammen aus Indien, einer Patientin aus Griechenland. Das Einverständnis der Patienten beziehungsweise deren Eltern wurde durch die behandelnden Ärzte eingeholt.

Die phänotypischen Daten und die korrespondierenden Mutationen der Patienten sind, soweit vorhanden, in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3: Mutationen und Phänotyp der einzelnen Patienten

ID	1. Mutation			2. Mutation			3. Mutation			Ag (%)	CB (%)	RCo (%)	FVIII (%)	BT (m)	PTT (s)	Mult
	E	Nt	aa	E	Nt	aa	E	Nt	aa							
1	4	c.257T>A	p.V86E	*	*	*				<2	-	2	<1	10	90	-
2	5	c.386T>A	p.L129R	14	c.1547G>A	p.G525E	39	c.6799T>A	p.F2267I	<1	-	<5	5	-	57	0
3	5	c.488G>T	p.G163V	10	c.1152T>A	p.C384X	30	c.5191T>A	p.S1731T	3	10,3	-	3,1	-	80	0
4	7	c.811T>C	p.Y271H	7	c.811T>C	p.Y271H				<1	-	<1,5	3,1	-	108	-
5	7	c.811T>C	p.Y271H	7	c.811T>C	p.Y271H				<1	-	<1,5	2,2	-	146	-
6	8	c.954T>A	p.N318K	14	c.1693C>T	p.Q565X				<3	-	2	<1	10	120	-
7	9	c.1078G>A	P.G360S		n.b.					<1	<2	-	-	-	-	0
8	10	c.1131G>T	p.W377C	10	c.1131G>T	p.W377C				<1	<1	9,5	1,8	11	59	0
9	25	c.3359G>C	p.W1120S	15	c.1795delG					<1	<2	-	-	-	-	0
10	28	c.4138A>G	p.I1380V	28	c.4304A>G	p.N1435S	19	c.2451T>A	P.H817Q	6-11	-	7	5-8	-	-	pat
11	31	c.5380A>G	p.K1794E		n.i.					2	-	3	<1	15	108	-
12	40	c.6911G>A	p.C2304Y	36	c.6222_62 23inAACCC	p.K2075Nf sX16				3	2	-	-	-	-	0
13	40	c.6911G>A	p.C2304Y	48	c.7940C<T	p.T2647M				(5)	(7)	-	(11)	-	-	(pat)
14	43	c.7292G>A	p.C2431Y		n.b.					5	-	-	-	-	-	pat
15	45	c.7597T>C	p.C2533R		IVS25+1 G>A		20	c.2561G>A	p.R854Q	4	1,6	<10	<1	12	74	0
16	51	c.8215T>C	p.C2739R	28	c.5053+3 A>G					(36)	-	-	-	-	-	pat
17	51	c.8215T>C	p.C2739R	18	c.2435delC					-	-	-	-	-	-	-
18	52	c.8255G>A	p.G2752D	28	c.3772_37 72delGT	p.Y1258Cf sX34				<1	<2	-	-	-	-	0

ID = Patientennummer, E = Exon, Nt = Nukleotidaustausch, aa = Aminosäureaustausch, n.i. = nicht identifiziert, n.b.= nicht bekannt.

Ag = VWF:Ag (Normbereich 50-160%), CB = VWF:CB (NB 0,8-2,0 x vWF:Ag), RCo = VWF:RCo, FVIII = FVIII:C, BT = Blutungszeit,

PTT= partielleThromboplastinzeit, Multimere: Ergebnis der Multimeranalyse. - = nicht durchgeführt/nicht verfügbar, o = keine Multimere vorhanden,

pat = Multimere mit Pathologien vorhanden. (x) = Messung erfolgte nach Substitution von FVIII/VWF

### 2.2 Methoden

In dieser Arbeit sollten 19 Missensemutationen, die ursprünglich bei Patienten mit VWS Typ 3 gefunden worden waren, auf ihre Kausalität hinsichtlich des Phänotyps der Betroffenen überprüft werden. Gleichzeitig sollte damit der molekulare Pathomechanismus identifiziert werden. Dazu wurden mittels site-directed Mutagenese Vektoren konstruiert, die die jeweilige Mutation enthalten. Zusätzlich wurde ein Vektor konstruiert, der die Doppelmutation p.I1380V/p.N1435S enthält. Für die compound-heterozygot vorliegenden Mutationen p.L129R/p.G525E wurde eine Coexpression durchgeführt. Durch Transformation konnten diese Vektoren in kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht werden, um so durch Klonierung ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen. Diese mutierte cDNA in Plasmidform wurde anschließend durch transiente cDNA-Transfektion in 293-EBNA Zellen eingebracht.

Nachfolgend konnten aus Medium und Lysat dieser Zellen quantitative und funktionelle Untersuchungen des mutanten VWF im Vergleich zum Wildtyp (WT) durchgeführt werden. Mittels Immunoassayverfahren (ELISA) konnten so das VWF:Ag, die VWF:GPIb-Bindung sowie die Kollagenbindungskapazität (VWF:CB) bestimmt werden. Um Konfigurationsänderungen des VWF zu detektieren, wurde zudem eine Multimeranalyse durchgeführt.

Nähere Angaben zu den verwendeten und im Methodenteil erwähnten Materialien finden sich im Anhang (8.1. Materialien).

Ebenso sind die verwendeten Rezepte, Ansätze und Cyclerprogramme im Anhang aufgeführt (s. 8.2.).

### 2.2.1 Zellkultur

Die zellbiologischen Arbeiten wurden an der 293-EBNA Zelllinie durchgeführt. Diese entstammt der HEK-293 Zelllinie, die ein Neomycinresistenzgen vom pRSV4neo- und das EBNA-1 Gen vom pCMV/EBNA Plasmid exprimiert.

Alle durchgeführten zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom. Die Zellen wurden in sterilen Gewebekulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt und 96%iger Luftfeuchte kultiviert. Die Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen in DMEM mit GIBCO™ GlutaMAX™-I Supplement gezüchtet und zweimal die Woche passagiert:

Nach Abpipettieren des Mediums und Waschen mit 10 ml PBS werden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung 1- 5 Minuten inkubiert, bis die Zellen sich lösen. Die Trypsinierung wird mit 6 ml DMEM gestoppt und die Zellen werden resuspendiert. Je 2,4 ml der Zellsuspension werden in eine neue T 75 Kulturflasche mit 25 ml frischen DMEM überführt und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.2 Mutagenese

Mit der ortsspezifischen Mutagenese kann eine gezielte Veränderung der DNA, hier des VWF cDNA Plasmids durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Punktmutationen nach der QuickChange Site-Directed MutaGenesis Methode in ein pRc/CMV-Plasmid eingebracht. Die für die Mutagenese benötigten komplementären Oligonukleotide (s. Anhang 7.1.5) stammen von der Firma Metabion und wurden vor der Verwendung mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

Unter den Bedingungen eines PCR-Zyklus wird die gewünschte Punktmutation direkt in das klonierte VWF-Gen eingefügt, welches sich auf dem oben genannten Plasmid befindet. Hierzu wird aus den jeweiligen Oligonukleotidprimer zusammen mit einem Basenmix und der WT-VWF DNA sowie Pfu-Puffer unter anschließender Zugabe von PfuTurbo® DNA Polymerase ein Ansatz erstellt. In den ersten beiden von drei Schritten erfolgt dann die Synthese des mutierten DNA-Strangs:

1. Paarung der Mutationsprimer mit dem Ursprungs-Template, hier dem die VWF-Wildtyp DNA enthaltendem Plasmid.
2. Verlängerung der Primer durch die PfuTurbo® DNA Polymerase.

Diese Schritte laufen unter PCR-Bedingungen im Thermocycler ab. Die genauen Schemata zum Ansatz und zur Einstellung des Thermocyclers finden sich am Anhang.

Anschließend wird in einem dritten Schritt die unveränderte Ursprungsplasmid-DNA durch eine methylierungsabhängige Restriktion mit DpnI zerstört. Das Enzym DpnI spaltet nur methylierte und halbmethylierte DNA, es bleibt nur das neusynthetisierte, unmethylierte Plasmid mit der veränderten Gensequenz erhalten. Zu jeder Reaktion wurden also 3µl DpnI Restriktionsenzym zugesetzt, gut gemischt und mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Mit diesem Substrat wurden dann kompetente Zellen transformiert (Abb. 6).

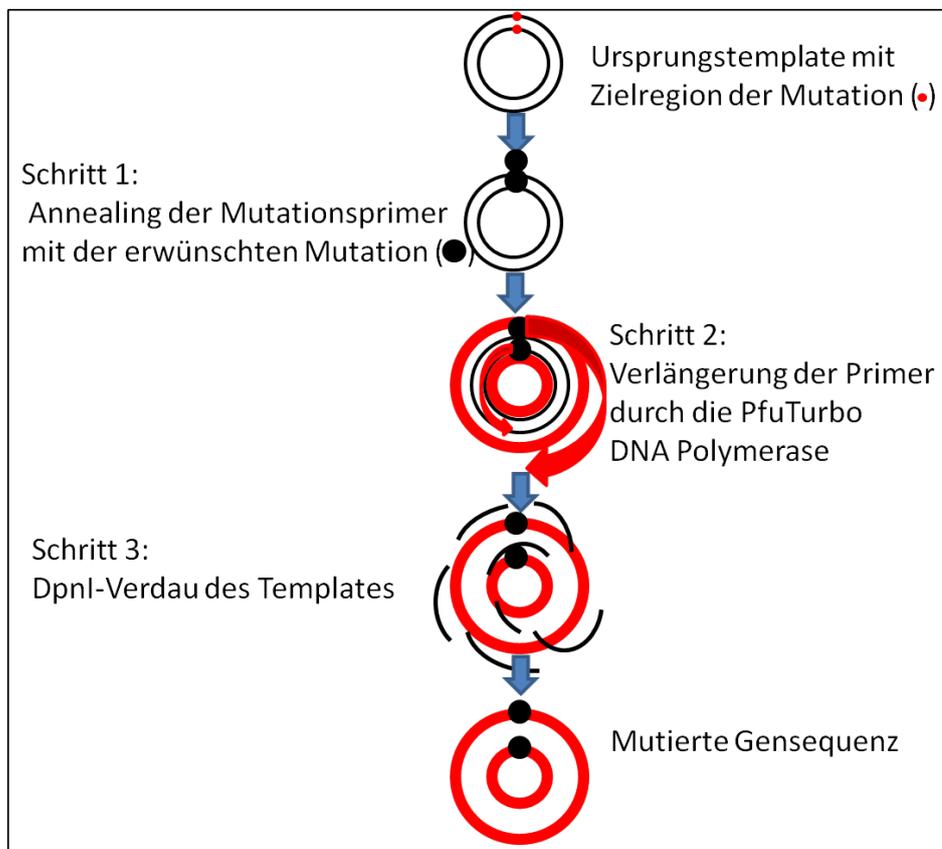


Abbildung 6: Schema zur ortsspezifischen Mutagenese

### 2.2.3 Transformation

Die Transformation dient der Aufnahme freier DNA durch kompetente Bakterienzellen. Dieser Schritt ermöglicht eine Vervielfältigung der rekombinanten DNA. Die hier verwendeten One Shot Top10 E. coli sind chemisch kompetent und wurden in 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurden jedem Tube je 4 µl der Mutagenese Reaktion zugesetzt, durch vorsichtiges Rühren mit einer Pipettenspitze vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension erfuhr im Wasserbad einen Hitzeschock bei genau 42°C von 30 Sekunden und wurde dann auf Eis für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt, dann 1 Stunde bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde

auf LB-Agarplatte mit Carbenizillin ausplattiert. Dieses bakterizide und bakteriolytische Carboxypenicillin dient zur Selektion der sich bildenden Bakterienkolonien. Nur die Stämme, die das Plasmid aufgenommen haben, können die Selektion überstehen, da das Plasmid über ein Carbenizillin-Resistenzgen verfügt. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die sich nach einer Nacht gebildeten Bakterienkolonien konnten dann präpariert werden (Abb. 7).

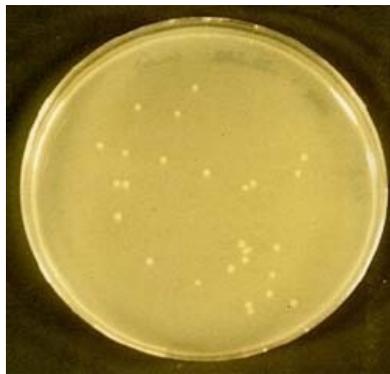


Abbildung 7: *Klonbildung eines E. coli-Stamms mit der Mutation p.G525E nach Inkubation.*

### 2.2.4 Minipräparation der Plasmide

Die Präparation der Plasmide aus E.coli erfolgte mit dem Pure Link Quick Plasmid Miniprep® Kit. Sie dient dem Gewinn größerer Mengen an gereinigtem Plasmid. Die angegebenen Materialien entstammen diesem Kit. Dazu wurden je 10 der sich über Nacht auf den Agarplatten gebildeten Bakterienkolonien mittels einer sterilen 100er Pipettenspitze in 2 ml LB-Medium mit Carbenizillin gegeben und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. 1 ml der Bakteriensuspension wurde dann 1 Minute bei 20.800 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Bakterienpellet mit den Lösungen des Kits behandelt. Hierzu wurde 250 µl Resuspension Buffer R3 mit RNase A-Zusatz zugegeben und resuspendiert, mit 250 µl Lyse Buffer L7 lysiert, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 350 µl Precipitation Buffer N4 zugesetzt. Die Lösung wurde 5 Minuten bei 20.800 rpm zentrifugiert, der Überstand in Mini

Säulen pipettiert und über den Vakuum-Manifold gereinigt. Dann wurden erst 500 µl Wash Buffer W10 mit Ethanol nach einer Minute Inkubationszeit über die Säule laufen gelassen, dann 700 µl Wash Buffer W9 mit Ethanol. Die Säulen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, eine Minute bei 12.200 rcf zentrifugiert und dann in Recovery-Reaktionsgefäße gegeben. Auf die Säule wurden 60 µl TE-Puffer pipettiert und wieder eine Minute bei 12.200 rcf zentrifugiert. Im Eluat befinden sich dann die gereinigten Plasmide.

### 2.2.4.1 Kontrolle der Plasmide

Um zu überprüfen, ob die präparierten Klone tatsächlich die gewünschte mutierte Gensequenz beinhalten und nicht zum Beispiel die Wildtyp-DNA oder große Fehler wie Repetitionen, wurden anschließend zwei Kontrolluntersuchungen durchgeführt.

1. Die sogenannte Ansequenzierung dient der Kontrolle des Einbaus der Mutation an der gewünschten Stelle. Es wird, im Gegensatz zur noch folgenden Kompletsequenzierung, nur der Bereich des VWF-Gens sequenziert, indem sich die gewünschte Mutation findet. Auf diese Weise können Wildtyp-Klone und Fehler in der Umgebung der Mutation ausgeschlossen werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methode der Sequenzierung findet sich unter 2.2.5. Das genaue Vorgehen sowie das Thermocycler-Programm finden sich im Anhang.

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte visuell, die Proben mit korrekt eingebauter Mutation wurden weiterverwendet.

2. Als zweite Kontrolluntersuchung wurde ein Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI durchgeführt. Dazu wurden 3 µl jeder Plasmidpräparation mit 1 µl dieses Enzyms unter Zusatz von 2 µl 10fach Puffer und 14 µl Aqua bidest. zum Nachweis der eingefügten Mutation verdaut. Der Ansatz wurde eine bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden dem Produkt 2 µl 10fach Gel Loading Buffer III zugesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1%igen

Agarosegel. Dazu wurde das Gel auf dem Träger in eine Laufkammer übertragen, in der es vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Die Taschen wurden mit je 20 µl Probenansatz sowie mit einem Standardmarker zum Vergleich geladen. Dann wurde für 30-60 Minuten eine Spannung von 200 V an die Laufkammer angelegt. Das Gel wurde anschließend zur Analyse auf einen UV-Transilluminator gelegt und das Bandenmuster mit einer Sofortbildkamera dokumentiert (Abb. 8). Je ein Klon pro Mutation, der im Agarosegel eine Bande der gewünschten Länge zeigte, wurde zur Sequenzierung ausgewählt.

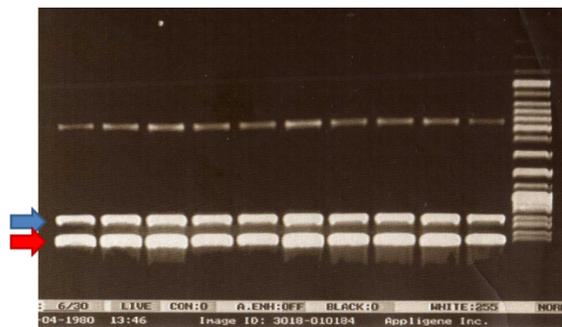


Abbildung 8: *Digestion der Plasmidpräparation der Mutation G525E mit EcoRI. Der blaue Pfeil weist auf die Bande des Plasmidrests bei 5,3 kb, der rote Pfeil auf die Bande der kodierenden Sequenz bei 8,5 kb.*

### 2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der nun vorliegenden mutierten DNA wurde vorgenommen, um eventuelle Fehler an anderer Stelle als des bereits sequenzierten Bereichs um die Mutation auszuschließen. Sie erfolgte nach der Kettenabbruch-Synthese oder Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Einzelsträngige DNA wird mit Hilfe eines Oligonukleotids, einer DNA-Polymerase und den vier Desoxynukleotiden vervielfältigt. Im Ansatz befinden sich zusätzlich unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide im Überschuss, die bei Einbau die Polymerisationsreaktion stoppen, da aufgrund der fehlenden OH-Gruppe keine Verlängerung mehr möglich ist. Es kommt so

zum Kettenabbruch. Es entsteht ein Gemisch aus DNA-Fragmenten verschiedener Länge, die alle ein markiertes ddNTP am 5'-Ende tragen. Durch Hitzedenaturierung werden die neu entstandenen Fragmente von der DNA-Matrix getrennt und über ein Polymergel kapillar-elektrophoretisch getrennt. Mittels eines Lasers können nun die markierten ddNTPs zur Fluoreszenz gebracht werden. Diese ist, je nach Art des jeweiligen ddNTPs, von unterschiedlicher Farbe. Das so in einer bestimmten Gelebene emittierte Fluoreszenzlicht wird von einem Detektor erkannt und in Form eines Chromatogramms digital gespeichert. Im Chromatogramm kann man nun in Abfolge der Farbsignale die Basensequenz des sequenzierten Basenstrangs ablesen. Der Reaktionsansatz und die Programmierung des Hitzeblocks finden sich im Anhang. Das Produkt wurde von Herrn Florian Oyen aufgereinigt, der anschließend die Sequenzanalyse automatisch durchführte. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm DNAsis zum Auffinden von Polymerasefehlern. Wurde kein Fehler in dem entsprechenden Klon gefunden, konnte die Maxipräparation durchgeführt werden.

### 2.2.6 Maxipräparation

Zur Gewinnung von großen Mengen Plasmid-DNA wird mit Hilfe des EndoFree® Plasmid Maxi Kits die Maxipräparation durchgeführt. Die angeführten Reagenzien entstammen diesem Kit. Zunächst erfolgte eine Amplifikation der fehlerfreien Bakterienklone. Es wurden 500 ml Kolben mit 100 ml sterilem LB-Medium gefüllt und mit 200 µl der Bakteriensuspension im LB-Medium mit Carbenizillin angeimpft. Die Ansätze wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung von jeweils 50ml der angewachsenen Bakterienkulturen in geeignete Zentrifugenröhrchen und die Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 Minuten bei 4°C. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Pellets wurden mit 10 ml RNAase A-haltigem Tris/EDTA-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen mittels NaOH-Natriumdodecylsulfat-Puffer. Die bei diesem Prozess freigesetzte RNA wurde durch die anfänglich

zugesezte RNAase A abgebaut, um eine Störung der Aufreinigung der Plasmid-DNA zu vermeiden. Bei der alkalischen Lyse werden typischerweise Zellbestandteile freigesetzt und es kommt weiterhin zur alkalischen Denaturierung von Proteinen, chromosomaler DNA und Plasmid-DNA. Ein Abbruch der Reaktion erfolgte nach genau fünf Minuten, indem zur Neutralisation 10 ml gekühlter Kaliumacetatpuffer zugesezt wurde mit anschließender Inkubation für 10 Minuten. Die Einhaltung der Lysezeit ist von großer Bedeutung, da bei Überschreitung der Zeitspanne von 5 Minuten eine irreversible Denaturierung der Plasmid-DNA zu erwarten ist. Durch diese Neutralisationsreaktion kommt es zur Ausfällung von denaturierten Protein- und Zellresten und der chromosomalen DNA in Salz-Detergens-Komplexen. Dagegen bleibt die kleinere, ringförmig geschlossene Plasmid-DNA in Lösung und renaturiert.

Das Produkt wurde zur Filtration in spezielle Patronen umgefüllt und durch deren Spritze in frische 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde 2,5 ml ER Buffer hinzugefügt und zur Inkubation für 30 Minuten auf Eis gelegt. Zwischenzeitlich wurden die Anionenaustauscherharz-Säulen mit 10 ml QBT Buffer equilibriert. Nach der 30minütigen Inkubationszeit wurde das Produkt auf die Säule aufgetragen. Das Harz verfügt über positive Ladungen und ist daher in der Lage, negativ geladen vorliegende Plasmid-DNA zu binden. Sowohl Salzgehalt als auch pH-Wert des Lysats gewährleisten, dass ausschließlich Plasmid-DNA durch die Anionenaustauschersäule zurückgehalten wird. Weitere Bestandteile des Lysats wie abgebaute RNA oder Zellproteine können die Säule ungehindert passieren. Um diese Verunreinigungen möglichst vollständig zu entfernen, wurde zweimal mit je 30 ml QC Buffer die Säule gewaschen.

Es folgte die Eluierung der Plasmid-DNA mit 15 ml QN Buffer. Das Eluat wurde in einem 50 ml Falcon-Gefäß aufgefangen und die Plasmid-DNA im Anschluss durch Zugabe von 10,5 ml 100%igem, hochreinen Isopropanol ausgefällt und für eine Stunde bei 4°C bei 4000 rpm zentrifugiert. Der

Überstand wurde dann vorsichtig abpipettiert, das erhaltene Pellet wurde mit 3 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmal für 5-10 Minuten zentrifugiert, um letzte Salzreste zu entfernen. Der Überstand wurde erneut abgenommen, das Pellet wurde an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 500 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C gekühlt.

### 2.2.6.1 Photometrie

Die Gehaltsbestimmung der Plasmid-DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) erfolgte photometrisch. Hierzu wurden 2 µl in TE-Puffer gelöste Plasmid-DNA mit 98 µl Aqua dest. verdünnt (Verhältnis 1:50) und die Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $A_{260}$ ) vermessen. Die Reinheit wurde durch den Quotienten der Absorptionswerte bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $A_{260}$ ) und  $\lambda = 280 \text{ nm}$  ( $A_{280}$ ) bestimmt. Der Gehalt der Plasmid-DNA wurde mittels folgender Gleichung berechnet: Plasmid-DNA-Gehalt [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] =  $A_{260} \times 0,05 \times 50$

### 2.2.7 Transiente Transfektion

Um die jeweilige Mutation der VWF cDNA zu exprimieren, wurde eine transiente Transfektion in die Zelllinie 293-EBNA durchgeführt. Darunter versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische zelluläre Systeme. Die Lebensdauer der transient aufgenommenen Plasmid-DNA ist jedoch nur kurz. In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 als kationisches Liposom verwendet.

#### 2.2.7.1 Zellkultur

Um zu gewährleisten, dass sich in jeder Gewebekulturflasche für die Transfektion  $2 \times 10^6$  Zellen befinden, wurden die Zellen 24 Stunden vor Beginn der Transfektion folgendermaßen gesplittet: Die kultivierten Zellen wurden vom Medium befreit, mit je 10 ml temperierten PBS-Puffer gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Trypsinierung wurde mit 6 ml DMEM gestoppt. Die Zellsuspension wurde in eine neue Flasche gefüllt, in der sich pro

Ursprungsflasche 27ml frisches DMEM befand. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypan, also in einer 1:10 Verdünnung, gemischt und dann zügig auf eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde in den 4x4-Quadranten der Kammer ausgezählt. Dieser Wert wurde mit 2.500 multipliziert. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ließ sich das Volumen errechnen, welches die gewünschte Zellzahl von  $2 \times 10^6$  beinhaltete. Dieses Volumen wurde mit DMEM entsprechend verdünnt, um am Ende jede Kulturflasche mit 4 ml Zellsuspension beschicken zu können. Diese Flaschen wurden anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.7.2 Transfektion

Die aus der Plasmid-DNA-Präparation gewonnenen mutanten Plasmide wurden mit TE-Puffer auf einen Plasmidgehalt von 0,4 µg/µl verdünnt. Pro Eppendorfgefäß wurde ein Volumen von 10 µl Plasmid pipettiert und mit 300 µl Opti-MEM®, einem serumfreien Medium, vermischt, kurz zentrifugiert und für 5 Minuten inkubiert. Zwischenzeitlich wurde ein Mastermix von je weiteren 300 µl Opti-MEM® sowie 15 µl Lipofectamine™ 2000 pro Gefäß angesetzt, gut geschwenkt und für 5 Minuten inkubiert. Je 315 µl des Mastermix wurden nach Ablauf der Inkubationszeit pro Eppendorfgefäß pipettiert, kurz zentrifugiert und für weitere 20 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel mit 3ml frischem DMEM bei den in Kultur stehenden Zellen vom Vortag durchgeführt. Dann wurde der vollständige Inhalt eines Eppendorfgefäßes nach gründlichem Mischen zu den Zellen in die Gewebekulturflasche gegeben und anschließend vorsichtig geschwenkt. Die Zellsuspension wurde im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden fand ein Mediumwechsel mit 4 ml Optipro (serumfreies Medium) pro Flasche statt.

### 2.2.7.3 Präparation der transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach dem Mediumwechsel präpariert. Dazu wurden die Zellen erst mechanisch von der Wand der

Gewebekulturflaschen gelöst und die Zellsuspension in 15 ml Eppendorfgefäße umgefüllt. Diese wurden dann 5 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene Überstand in weitere 15 ml Eppendorfgefäße überführt, in drei 96 well Platten à 50 µl aliquotiert und dann, ebenso wie die mit dem Medium gefüllten 15 ml Gefäße, bei -80°C eingefroren. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 750 µl unsterilem PBS-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Gefäße überführt. Diese wurden bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 610 rpm zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt und das Pellet bei -80°C für 20 Minuten eingefroren. Nach dieser Zeit wurde das Pellet im 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut, ihm Proteaseinhibitor Complete EDTAfree in 1:25 Verdünnung in 400 µl Lyse-Puffer zugesetzt und gemischt. Die lysierenden Zellen inkubierten 30 Minuten auf Eis und wurden dann für 10 Minuten und 1400 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand, das Lysat, wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in drei 96 well Platten á 50 µl aliquotiert. Auch diese Platten und die Gefäße wurden bei -80°C eingefroren.

### 2.2.8 Immunoassayverfahren

Das Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hier sollten nun die Konzentration des VWF-Antigens (VWF:Ag), die Kollagen-Bindungskapazität (VWF:CB) und die GPIb-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (VWF:RCo) bestimmt werden.

#### 2.2.8.1 VWF:Ag-Bestimmung

Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Coating-Lösung, bestehend aus VWF:Ag coating buffer und im Verhältnis 1:1000 verdünnten polyklonalen Rabbit Anti human VWF, bei 4°C für 12 h beschichtet. Die aus der Präparation der Transfektion erhaltenen Medium-Aliquots wurden mit PBS+5%BSA im Verhältnis 1:25, die Lysat-Aliquots 1:200 verdünnt. Die Beschichtung wurde abgenommen, anschließend wurde viermal mit Wash Buffer gewaschen. Mittels eines mit PBS+5%PSA 1:50 verdünnten Standards wurde in der 1. Spalte der Platte eine Verdünnungsreihe (100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,6; 0) als Kalibrierung angefertigt und dann je 100µl der verdünnten Proben aufgetragen. Dieses inkubierte für 90 min bei 37°C, anschließend wurde wieder viermal mit Wash Buffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Detektionsantikörper Polyclonal Rabbit Anti Human VWF in einer 1:2000 Verdünnung mit PBS+5%BSA dazugegeben, an dessen Ende Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Wieder wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und zur Auslösung der farblich sichtbaren enzymatischen Reaktion 100 µl TMB Substrat zugefügt. Nach ca. 2 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt und die optische Extinktion konnte durch ELISA-Lesegerät ermittelt werden.

#### 2.2.8.2 Kollagenbindungskapazität

Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Coating-Lösung, bestehend aus CBA coating buffer und im Verhältnis 1:200 verdünnten Collagen human

Type III beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Wie unter 3.14.1 beschrieben, wurden die Medium- und Lysat-Aliquots verdünnt und eine Verdünnungsreihe 1:100 zur Kalibrierung angefertigt. Dann wurde die Beschichtung abgenommen und die Platte viermal mit Wash Buffer gewaschen und die Proben aufgetragen. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37°C wurde wieder viermal mit Wash Buffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Detektionsantikörper Polyclonal Rabbit Anti Human VWF in einer 1:2000 Verdünnung mit PBS+5%BSA dazugegeben, an dessen Ende HRP gekoppelt war. Wieder wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und zur Auslösung der farblich sichtbaren enzymatischen Reaktion 100 µl TMB Substrat zugefügt. Nach ca. 2 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl 0,5M Schwefelsäure gestoppt und die optische Extinktion konnte durch das ELISA-Lesegerät ermittelt werden.

### 2.2.8.3 VWF:GPIIb-Bindungs-Aktivität

Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit im Verhältnis 1:2000 in PBS verdünnten monoklonalen anti FLAG M2 beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Wie unter 3.14.1 beschrieben, wurden die Medium- und Lysat-Aliquots verdünnt und eine Verdünnungsreihe 1:80 zur Kalibrierung angefertigt. Dann wurde die Beschichtung abgenommen, die Platte dreimal mit je 200µl PBS+0,1%BSA gewaschen und eine Stunde mit PBS+1%BSA bei Raumtemperatur (ca. 21°C) geblockt. Anschließend wurde die Blockinglösung abgenommen und es wurden je 200 µl im Verhältnis 1:10 in PBS+1%BSA verdünntes GPIIb-Fragment aufgetragen. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 21°C) wurde wieder dreimal mit je 200 µl PBS+0,1%BSA gewaschen. Nun wurden je 200 µl der verdünnten Proben aufgetragen, 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder dreimal gewaschen. Dann konnten 200 µl des im Verhältnis 1:500 in PBS+1%BSA verdünnten Antikörpers Rabbit Anti Human VWF aufgetragen werden. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal

gewaschen. Danach wurde der Detektionsantikörper Goat anti rabbit IgG mit gekoppelter HRP in einer Verdünnung 1:2000 in PBS+1%BSA zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde viermal gewaschen und zur Auslösung der farblich sichtbaren enzymatischen Reaktion wurden 100 µl TMB Substrat zugefügt. Nach ca. 2 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt, und die optische Extinktion konnte durch das ELISA-Lesegerät ermittelt werden.

### 2.2.9 Multimeranalyse

Die Multimeranalyse dient der Aufdeckung qualitativer Veränderungen des von-Willebrand-Faktors. Konfigurationsänderungen der im Ergebnisteil beschriebenen Multimere lassen sich durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel und anschließendem Immunoblot-Verfahren nachweisen. Die so erhaltenen Bandenmuster lassen Rückschlüsse auf Art der vorliegenden Mutation zu und ermöglichen so eine genauere Zuordnung zu einer spezifischen Form des von Willebrand-Syndroms. Diese weitergehende Differenzierung ist wichtig für die Wahl der Therapie und für die genetische Beratung.

#### 2.2.9.1 SDS-Agarosegel-Elektrophorese

Die verwendeten Gele bestehen aus einem Trenngel und einem sogenannten Sammelgel. Als erstes wurde das Trenngel angesetzt und im Mikrowellenherd aufgeköcht. Mit einer 50 ml Spritze wurde es in einen Glasrahmen gefüllt, der aus zwei 28 cm x 17 cm großen Glasplatten bestand. Diese wurden von drei Spacern von je 2 cm Breite und 1,5 mm Dicke auseinandergehalten und mit 8 Klemmen fixiert. Das Gel härtete nun circa zwei Stunden bei 4°C aus. Dann konnte die oben liegende Glasscheibe des Rahmens um 2,5 cm nach unten verschoben werden, so dass ein Streifen des Trenngels mit einem Skalpell entfernt werden konnte. Die Glasscheiben wurden wieder über einander geschoben und der entstandene Freiraum konnte mit dem Sammelgel aufgefüllt

---

werden. Das Gel härtete eine weitere Stunde bei 4°C aus und konnte dann aus dem Rahmen genommen werden. Mit dem verbliebenen flüssigen Sammelgel wurde der Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel verklebt und mit Hilfe einer Schablone das Gel auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten.

Anschließend wurden acht Probenschlitze in das Sammelgel gestanzt. Mit einer Trägerfolie konnte das Gel nun auf eine auf 14°C gekühlte Glasplatte in der Elektrophoresekammer gelegt werden. Die Kammer selbst war mit Elektrodenpuffer gefüllt, der durch mit Puffer getränkte Filterpapierstreifen eine elektrische Verbindung zum Gel hatte. Nun wurden die Proben aufgetragen, die entsprechend ihrer VWF:Ag-Konzentration mit SDS-Probenpuffer mit Bromphenolblau verdünnt wurden und anschließend 30 Minuten bei 58 °C inkubierten. Dann wurden je 20 µl der Verdünnung in die gestanzten Schlitze aufgetragen und Halterungen für eine Glasplatte, die als Kondensationsschutz des Gels dient, angebracht. In der ersten Stunde lief die Elektrophorese bei einer Spannung von 65 V. Danach sind die Proben aus den Schlitzen herausgelaufen und diese können mit dem restlichen Sammelgel verschlossen werden. So wurde die Kontinuität des Gels wiederhergestellt. Bei einer Spannung von 55 V wurde die Elektrophorese für 17 Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde die Spannung für eine Stunde auf 120 V erhöht, um eine bessere Auftrennung der Subbanden zu erreichen.

### 2.2.9.2 Western Blot

Um die nun aufgetrennten Banden sichtbar zu machen, wurde die Blot-Technik verwendet. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese auf der Trägerfolie in ungefähr 200 ml Phosphatpuffer ca. 5 Minuten äquilibriert. Anschließend wurde das Sammelgel vom Rest des Gels abgetrennt und dieses mit in Phosphatpuffer getränktem Filterpapier bedeckt. Mit dem Filterpapier nach oben wurde das Gel nun umgedreht auf einen Schwamm in eine Blotkassette gelegt. Die nun oben liegende Trägerfolie wurde entfernt und auf das Gel wurde eine in Phosphatpuffer getränkte Nitrozellulosemembran

blasenfrei gelegt. Darauf wurden, wieder in Phosphatpuffer getränkt, erneut Filterpapier und ein Schwamm geschichtet. Die Blotkassette wurde geschlossen und in die mit Phosphatpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. Der Transfer wurde bei 20°C in 4 Stunden bei 2 A durchgeführt.

### 2.2.9.3 Visualisierung

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran für 10 Minuten in ca. 200 ml 1,5% haltbarer Milch gelegt, um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde mit einem polyklonalen Rabbit-antihuman-vWF-Antikörper, der 1:2000 in fettarmer H-Milch verdünnt wurde, für ca. 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten mit H-Milch gewaschen. Es folgte die Zugabe des zweiten Antikörpers, ein gegen Kaninchen-IgG gerichteter und mit Peroxidase gekoppelter Ziegenantikörper, der ebenfalls in fettarmer Milch 1:2000 verdünnt wurde. Nach einer 90minütigen Inkubationszeit wurde erneut dreimal mit H-Milch gewaschen, diesmal für je 10 Minuten. Nach dem letzten Waschen wurde die Membran mit Leitungswasser abgespült und mit 5 ml Luminol-Lösung überschichtet. Anschließend konnte in der lichtdichten Kammer mit der CCD-Kamera des Videosystems die entstehende Lumineszenz aufgenommen werden und anschließend digital abgespeichert werden.

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden sind die einzelnen Patienten aufgeführt, bei denen im Vorfeld ein schweres VWS Typ 3 diagnostiziert wurde. Es folgt eine Darstellung der bei diesen Patienten nachgewiesenen Mutationen. Der Expressionsstudie vorausgehend erfolgte eine molekulargenetische Diagnostik zum Nachweis des Defektes des von Willebrand-Faktors (nicht Bestandteil dieser Arbeit). Die kodierenden Exons und die flankierenden Intronsequenzen wurden amplifiziert und sequenziert. Die Bezeichnung der Mutationen erfolgte gemäß der Empfehlung des ISTH SSC Subcommittee (A. C. Goodeve et al. 2001). Als Referenz für die Sequenz des VWF-Gens diente die genomische Sequenz von Mancuso et al. 1989.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der diagnostischen Tests, die zur Diagnose des VWS Typ 3 der einzelnen Patienten führen, soweit vorhanden aus den Patientenunterlagen entnommen. Zusätzlich zur konventionellen Diagnostik waren teilweise auch die Ergebnisse der Multimeranalysen sowie die spezielle klinische Symptomatik der Patienten vorhanden.

Die untersuchten Missensemutationen wurden mit dem PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) Prädiktionsprogramm auf mögliche Pathogenität überprüft (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). Mit diesem Algorithmus kann der mögliche Einfluss, den die Mutation und damit der Aminosäureaustausch auf das Translationsprodukt, also hier den VWF, abgeschätzt werden. Dabei stützt sich das Programm auf empirische Daten und Regeln (Ramensky et al. 2002). Die Ergebnisse werden in vier Kategorien eingeteilt:

- probably damaging, im Folgenden als wahrscheinlich beeinträchtigend bezeichnet. Die dieser Kategorie zugeteilten Mutationen bewirken mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Beeinträchtigung der Struktur oder Funktion des Proteins.

## Ergebnisse

---

- possibly damaging, im Folgenden als eventuell beeinträchtigend bezeichnet. Die dieser Kategorie zugeteilten Mutationen bewirken vielleicht eine Beeinträchtigung des Proteins.
- benign, im Folgenden als wahrscheinlich ohne Effekt bezeichnet. Höchstwahrscheinlich bewirken diese Mutationen keine Beeinträchtigungen des Proteins.
- unknown, also als unbekannt bezeichnet. Aufgrund mangelnder Daten kann keine Vorhersage getroffen werden. Diese Kategorie musste auf keine der hier angeführten Mutationen angewandt werden.

Um eine Aussage zur Kausalität der im Vorfeld nachgewiesenen 19 Missensemutationen machen zu können, wurden die vorliegenden Expressionsstudien zu den jeweiligen Mutationen durchgeführt. Es wurde der Zustand einer homozygoten Mutation simuliert. Dies lässt sich auch auf die Patienten übertragen, bei denen keine Homozygotie nachgewiesen wurde, da in diesen Fällen davon ausgegangen wurde, dass die Missensemutation wahrscheinlich compound-heterozygot mit einer Mutation auftritt, die zu einem Nullallel führt.

Zum quantitativen Nachweis des rekombinanten VWF erfolgte eine Antigenbestimmung (VWF:Ag) im Medium der Zellen und in deren Lysat sowie zur Untersuchung der Funktion des VWF eine Bestimmung der Kollagenbindungskapazität (VWF:CB) und der GPIIb-Bindung (VWF:GPIIb) im Medium. Die Ergebnisse sind mit den in vivo gemessenen Werten des VWF:RCo im Plasma vergleichbar. Die VWF:Ag-Konzentration im Lysat entspricht der intrazellulären VWF-Konzentration von Endothelzellen bzw. Thrombozyten. Die Ergebnisse werden in Prozent des entsprechenden VWF-Wildtyps dargestellt. Durch Darstellung der VWF-Multimere konnten qualitative Defekte durch Konformationsänderungen der Multimerstruktur des VWF detektiert werden.

### 3.1 Rekombinante Expression der einzelnen Patientenmutationen

#### Patient Nr. 01: c.257T>A, p.V86E

Bei dieser indischen Patientin wurde im Exon 4 der Nukleotidaustausch c.257T>A heterozygot nachgewiesen, der zu dem Aminosäureaustausch p.V86E führt. Laut des PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als eventuell beeinträchtigend einzustufen. Als zweites Allel fanden sich im Exon 28.1. sechs weitere Mutationen. Diese sind auf eine Konversion des VWF-Pseudogens mit dem VWF-Gen am 5' Ende von Exon 28 anzusehen (Gupta et al. 2008). Das 21 bis 29 Kilobasen lange Pseudogen befindet sich auf Chromosom 22 und unterscheidet sich von den Exons 23 bis 34 des VWF-Gens in nur 3,1% (Mancuso et al. 1991). Die gefundenen Mutationen sind größtenteils stiller Natur, die Mutation p. Q1311X führt allerdings zu einer Nonsensemutation. Diese wurde bereits als Ursache für den schweren Typ 3 beschrieben, allerdings im homozygoten Status (Casaña et al. 2000).

Die Werte für das VWF-Antigen (VWF:Ag), die FVIII Bindungsaktivität (FVIII) und die GPIIb-Bindungsaktivität im Plasma lagen unterhalb der Nachweisgrenze oder nur wenig darüber. Die Blutungszeit (BT) war mit 10 Minuten eindeutig erhöht (Referenzzeit 4-6 Minuten), ebenso die partielle Thromboplastinzeit (PTT) mit 90 Sekunden (Referenzzeit 20-38 Sekunden). Eine Multimeranalyse wurde bei der Patientin nicht durchgeführt. Die diagnostischen Ergebnisse, v.a. aufgrund der nicht messbaren VWF:Ag-Konzentration und der verlängerten PTT sprechen eindeutig für einen Typ 3.

Nach rekombinanter Expression der Mutation p.V86E konnte im Medium kein VWF-Antigen nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer erniedrigten Konzentration von 66,5% bezogen auf den Wildtyp (Abb. 9).

Die Funktionsparameter VWF:GPIIb-Bindung und Kollagenbindungskapazität (VWF:CB) konnten im Medium nicht beziehungsweise nur in geringster Konzentration nachgewiesen werden (Tab. 4).

Wegen des nicht nachweisbaren VWF: Ag im Medium wurde keine

## Ergebnisse

---

Multimeranalyse durchgeführt.

Die Patientin ist compound-heterozygot für eine Genkonversion des VWF-Gens mit dem Pseudogen, die die Nonsensemutation Q1311X enthält und der bisher noch nicht beschriebenen Missensemutation V86E in der D1-Domäne des VWF-Gens. Diese Mutation führt zur fehlenden Sekretion des VWF aus der Zelle und erklärt somit das schwere VWS Typ 3.

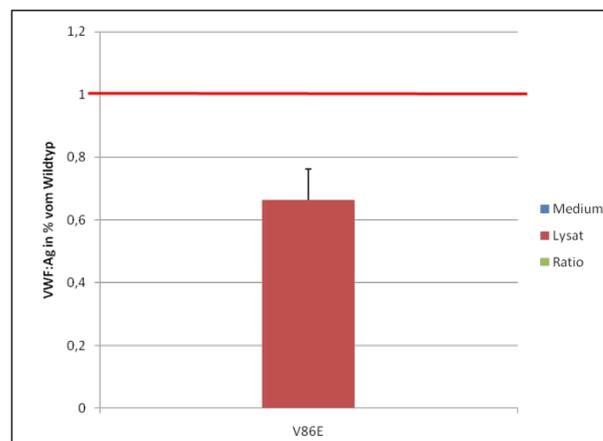


Abbildung 9: Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.V86E. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 3: Funktionelle Parameter der Mutation p.V86E im Medium in % des Wildtyps.

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.V86E</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,0</b>

## Ergebnisse

---

Patient Nr. 02 c.386T>G, p.L129R; c.1574G>A, p.G525E; c.6799T>A, p.F2267I

Bei dieser Patientin wurden drei Missensemutationen nachgewiesen, die laut Polyphen-Prädiktionsprogramm alle potentiell beeinträchtigend sind. Der Aminosäureaustausch p.G525E in Exon 14 wird sogar als wahrscheinlich das Protein beeinträchtigende Mutationen eingestuft.

Von ihrer Natur her führt keine der drei Mutationen zu einem Nullallel. Trotzdem liegt bei der Patientin phänotypisch ein VWS Typ 3 vor, da in vivo die VWF:Ag-Konzentration <5% betrug und sich keine Multimere darstellen ließen. Im Vorfeld wurde auch die Familie der Patientin untersucht. Bei der Mutter war bereits ein VWS Typ 1 bekannt, bei ihr fand sich einen VWF:Ag von 10%, die Ristocetin-Cofactor-Aktivität sowie die FVIII-Aktivität waren deutlich erniedrigt. Auch beim Vater fanden sich erniedrigte Parameter, so dass sich die Vermutung anstellen lässt, dass auch bei ihm ein bisher nicht diagnostizierter Typ 1 vorliegt. Die Werte des Bruders der Patientin waren unauffällig (Tab. 5).

*Tabelle 4: Ergebnisse der Diagnostik der Familie der Patientin 02.*

	VWF:Ag	VWF:RCo	FVIII:C	Multimere
Pat 02	<5	<5	1,5	0
Mutter	10	6	30	-
Vater	40	28	75	-
Bruder	66	>100	>100	-

## Ergebnisse

---

Durch die molekulargenetische Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Mutation p.L129R dem maternalen, die Mutation p.G525E dem paternalen Allel entspricht. Bei dem Bruder der Patientin ließ sich keine Mutation nachweisen. Die Mutation p.F2267I fand sich bei keinem Familienmitglied, es ist also von einer de novo-Mutation auszugehen (Abb. 10).

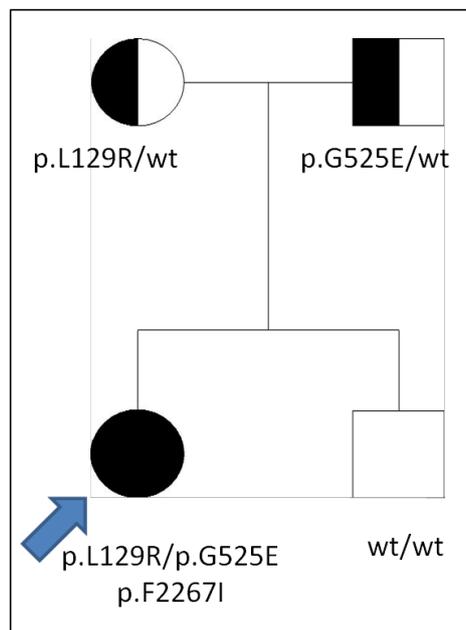


Abbildung 10: Stammbaum der Indexpatientin 02. Der Pfeil weist auf die Patientin 02.

Für diese Mutationen wurden sowohl homozygote Expressionen als auch Co-Expressionen durchgeführt. Die in Exon 5 und Exon 14 gelegenen Mutationen p.L129R und p.G525E führten sowohl homozygot als auch co-exprimiert zu stark erniedrigten VWF:Ag Konzentrationen im Medium und zu leicht erniedrigten Werten des VWF:Ag im Lysat. Die Rationes liegen deutlich unter 1. Bei der Expression der Mutation p.F2267I konnten nur leicht erniedrigte Werte bezogen auf den Wildtyp gemessen werden, die Ratio VWF:Ag im Medium/VWF:Ag im Lysat beträgt hier 0,75 (Abb. 11).

## Ergebnisse

---

Auch bezüglich der Funktionsparameter VWF:GPIIb-Bindung und Kollagenbindungskapazität im Medium fanden sich entsprechende Werte, bei p.L129R und p.G525E stark erniedrigte Aktivitäten, während sich bei p.F2267I nur leichte Aktivitätsverluste für die Kollagenbindung zeigen, während die GPIIb-Bindung sich deutlich erniedrigt darstellt. (Tab. 6).

Die Multimeranalyse ergibt für die Mutation p.F2267I ein normales Bild. Bei der Mutation p.L129R lassen sich keine Multimere nachweisen. Bei p.G525E findet sich ein schwaches Signal.

Die beiden Missensemutationen p.L129R und p.G525E sind hier compound-heterozygot vorliegend sehr wahrscheinlich als kausal für das schwere VWS Typ 3 der Patientin, der sich labordiagnostisch mit einem nicht nachweisbaren VWF:Ag-Level und nicht nachweisbaren Multimeren äußerte, anzusehen. Auch hier liegt vor allem ein Sekretionsdefekt vor. Die Mutation F2267I scheint jedoch entgegen der Vorhersage der Polyphen-Datenbank keine zusätzliche Rolle zu spielen.

## Ergebnisse

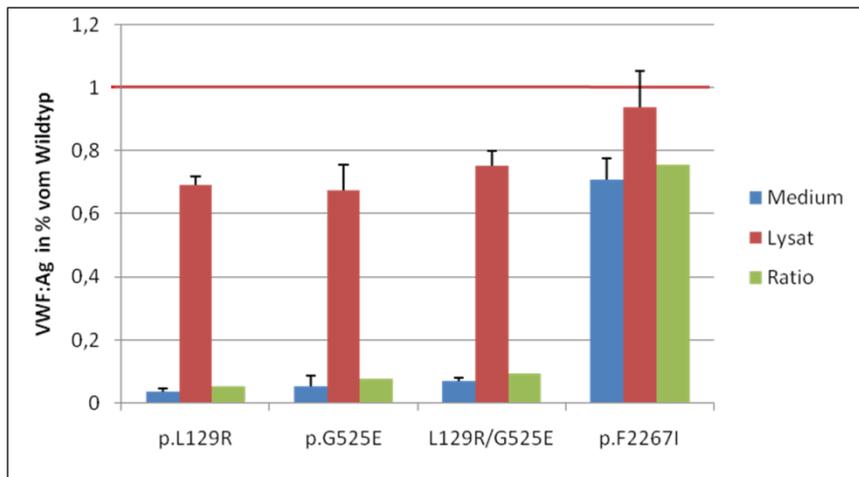
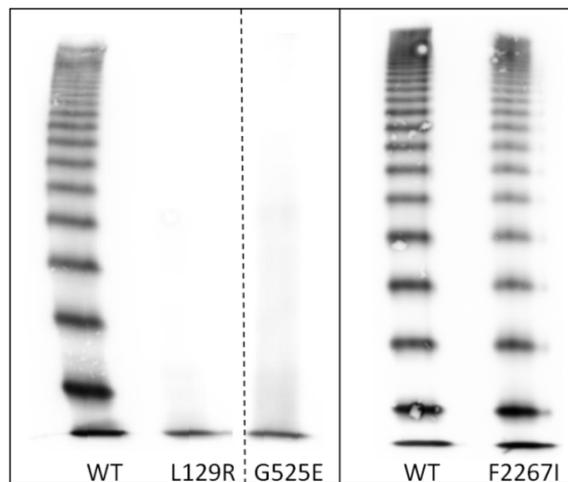


Abbildung 11: Multimeranalyse und Konzentrationen des VWF:Ag in Medium und Lysat bei den Mutationen der Patientin 02. Die rote Linie markiert den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 5: Funktionelle Parameter der Mutationen bei Pat. 03 in % vom Wildtyp

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.L129R</b>	<b>3,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>p.G525E</b>	<b>5,1</b>	<b>3,4</b>	<b>8,2</b>	<b>2,3</b>	<b>1,6</b>	<b>1,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
<b>p.L129R/p.G525E</b>	<b>6,9</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>p.F2267E</b>	<b>71,0</b>	<b>6,7</b>	<b>9,1</b>	<b>2,2</b>	<b>0,1</b>	<b>55,3</b>	<b>2,1</b>	<b>0,8</b>

## Ergebnisse

---

### Patient Nr. 03 c.488G>T p.G163V

Bei diesem Patienten sind seit frühester Kindheit schwere Blutungsereignisse wie Gelenkblutungen, Hämaturie und Hämatome ohne Trauma oder nach Bagateltraumata bekannt. Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchung wurden bei ihm drei Mutationen nachgewiesen. Die hier untersuchte Missensemutation im Exon 5 c.488G>T, die zu dem Aminosäureaustausch p.G163V führt, lag heterozygot vor. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als wahrscheinlich beeinträchtigend einzustufen.

Bei den quantitativen Bestimmungen konnte im Zellkulturmedium kein VWF-Antigen nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer leicht erniedrigten Konzentration von 78,1% (Abb. 12).

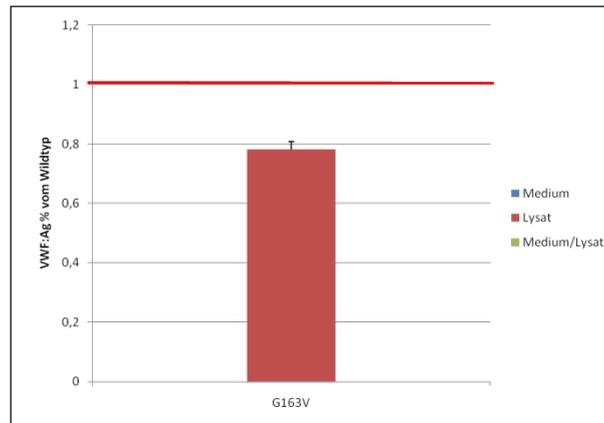
Die funktionellen Untersuchungen des VWF im Medium lagen mit einer VWF:GPIIb-Bindung von 1,6 % und einer VWF:CB von 1,7% entsprechend stark erniedrigt vor (Tab. 7).

Bei fehlendem VWF:Ag im Medium wurde keine Multimeranalyse durchgeführt.

Der zweite Nukleotidaustausch ist im Exon 10 als c.1152T>A heterozygot nachweisbar, der zu der Nonsensemutation p.C384X führt. Dieser ist aufgrund seiner Natur als kausal für ein von Willebrand-Syndrom anzusehen. Als dritte Mutation wurde im Exon 30 der Nukleotidaustausch c.5191T>A gefunden, der zu dem Aminosäureaustausch p.S1731T führt. Diese Missensemutation ist bereits beschrieben worden (Ribba et al. 2001). Sie liegt in der A3-Domäne des VWF und führt zu einem milden Kollagenbindungsdefekt bei normalen VWF:Ag. Man kann daher also davon ausgehen, dass die Mutationen p.G163V und p.C384X compound-heterozygot vorliegen und für die schwere klinische Symptomatik des Patienten verantwortlich sind.

## Ergebnisse

---



**Abbildung 12:** *Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.G163V. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).*

**Tabelle 6:** *Funktionelle Parameter der Mutation p.G163V im Medium in % vom Wildtyp.*

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.G163V</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>1,7</b>	<b>0,04</b>	<b>0,0</b>

## Ergebnisse

### Patienten Nr. 04 und Nr. 05 c.811T>C, p.Y271H

Die Indexpatientinnen 04 und 05 sind eineiige Zwillinge. Bei ihnen wurde im Exon 7 die homozygote Missensemutation c.811T>C nachgewiesen, die zum Aminosäureaustausch p.Y271H führt. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als eventuell beeinträchtigend einzustufen. Bei den Eltern besteht eine Konsanguinität, die Urgroßmutter mütterlicherseits ist gleichzeitig die Großtante väterlicherseits. In der molekulargenetischen Untersuchung zeigten sich die Eltern als heterozygote Träger der Missensemutation p.Y271H (Abb. 13).

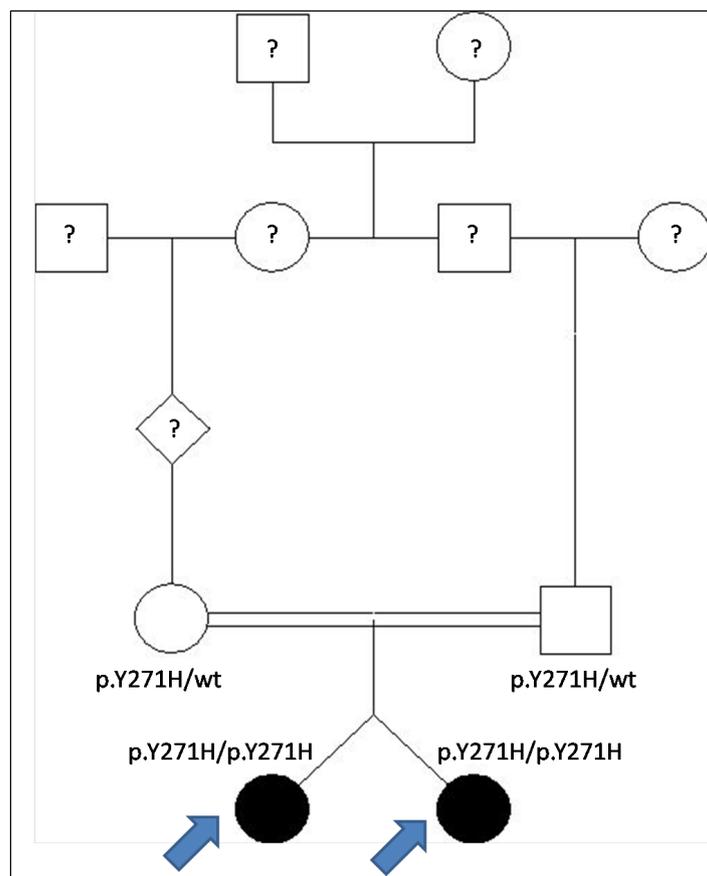


Abbildung 13: Stammbaum der Familie der Indexpatientinnen 04 und 05. Die Pfeile weisen auf die Patientinnen 04 und 05. ? = unbekannter molekulargenetischer Status.

## Ergebnisse

---

Beide Eltern wiesen anamnestisch eine erhöhte Blutungsneigung auf. Die Mutter berichtete über verstärkte Menstruationsblutungen, Epistaxis und Nachblutungen bei Zahnextraktion, der Vater über rezidivierende Epistaxis. In der Laboruntersuchung konnte jeweils ein leicht erniedrigtes VWF:Ag und ein erniedrigter VWF:RCo nachgewiesen werden. Eine Multimeranalyse lag nicht vor. Anamnestisch wurden für die Patientinnen 04 und 05 eine Hämatomneigung und Epistaxis angegeben. Das VWF:Ag lag unterhalb der Nachweisgrenze (Tab.8).

*Tabelle 7: Ergebnisse der Diagnostik der Familie der Patientinnen 04 und 05.*

	VWF:Ag	VWF:RCo	FVIII:C
Pat 04	<1	<1,5	3,2
Pat 05	<1	<1,5	2,2
Mutter	49	25	100
Vater	34	50	62,8

Nach rekombinanter Expression konnten im Medium erniedrigte Konzentrationen des VWF:Ag von 5,1% gemessen werden. Im Lysat fand sich ein erhöhter Wert für das VWF:Ag von 160,9% (Abb. 14) Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,03. Dies spricht für einen schweren Sekretionsdefekt.

Die Funktionsparameter waren nicht bzw. kaum nachweisbar (Tab. 9), ebenso ließen sich keine Multimere nachweisen.

Im Jahr 2005 wurde hier im Haus das vollständige VWF-Gen sequenziert. Es wurde keine weitere Mutation nachgewiesen, so dass man aufgrund der eindeutigen Ergebnisse der Expression in diesem Fall von einem kausalen Zusammenhang zwischen dem phänotypischen VWS Typ 3 und der Mutation ausgehen kann.

## Ergebnisse

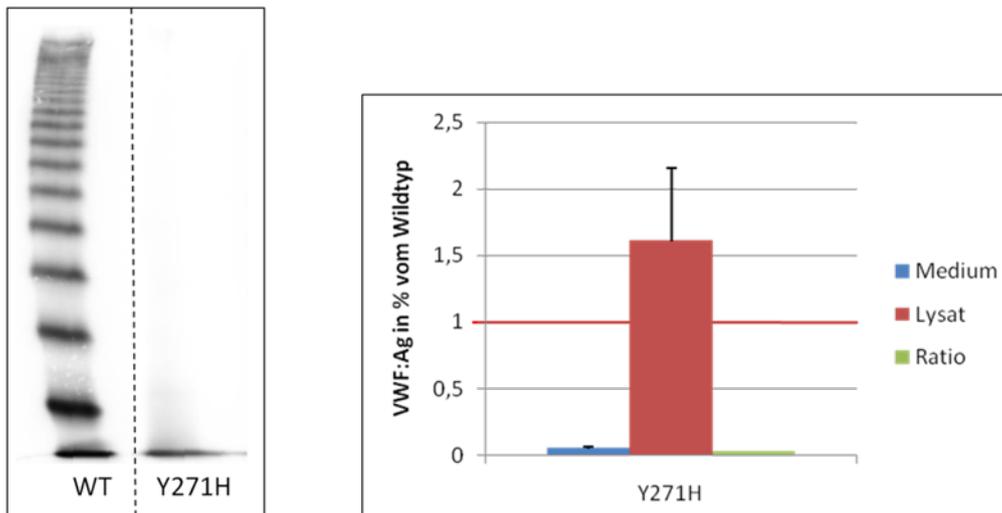


Abbildung 14: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.Y271H. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%)

Tabelle 8: Funktionelle Parameter der Mutation p.Y271H im Medium in % vom Wildtyp.

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.Y271H</b>	<b>5,1</b>	<b>1,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,0</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>

### Patient Nr. 06 c.954T>A, p.N318K

Bei dieser indischen Patientin wurden zwei Mutationen im VWF-Gen nachgewiesen. Im Exon 8 des Gens findet sich der Nukleotidaustausch c.954T>A heterozygot, der zu dem Aminosäureaustausch p.N318K führt. Diese Mutation wird in der ISTH-SSC VWF Online Database als Polymorphismus geführt, der sich bei 4% der untersuchten Population findet. Ein Krankheitswert wäre also nicht zu erwarten. Auch nach dem Polyphen-Prädiktionsprogramm scheint diese Variante ohne Effekt auf den VWF zu sein. Zu der zweiten Mutation des Patienten, der Nonsensemutation p.Q565X im Exon 14, ist ebenfalls bisher noch keine Kausalitätsstudie durchgeführt worden. Ihrer Natur nach führt sie wahrscheinlich zu einem Nullallel.

Bei der Expression der Missensemutation p.N318K betrug die VWF-Antigenkonzentration im Medium 73,6% des Wildtyps, war also nur leicht erniedrigt, im Lysat lag die Konzentration erhöht bei 130,8% (Abb. 15). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,56, was für eine leichte intrazelluläre Retention spricht.

Im Vergleich zum Wildtyp war die Funktionsfähigkeit des VWFs nur leicht erniedrigt und betrug bei beiden Parametern um die 80% des Wildtyps (Tab. 10). Die Multimeranalyse ergab ein normales Bild (Abb. 15).

Die Patientin weist nach den bekannten Laborwerten einen schweren Typ 3 auf mit einer von allen hier beschriebenen Patienten am stärksten verlängerten aPTT von 120 Sekunden und stark verringerten Werten für VWF:Ag, FVIII:C und VWF:RCo. In der hier durchgeführten, einen homozygoten Status imitierenden Expression ließen sich jedoch nur leichte Erniedrigungen des VWF:Ag im Medium und nur leichte Einschränkungen der Funktion nachweisen. Daher ist es wahrscheinlich, dass neben der Nonsensemutation p.Q565X eine weitere, bisher nicht identifizierte Mutation für die schwere Symptomatik der Patientin verantwortlich ist.

## Ergebnisse

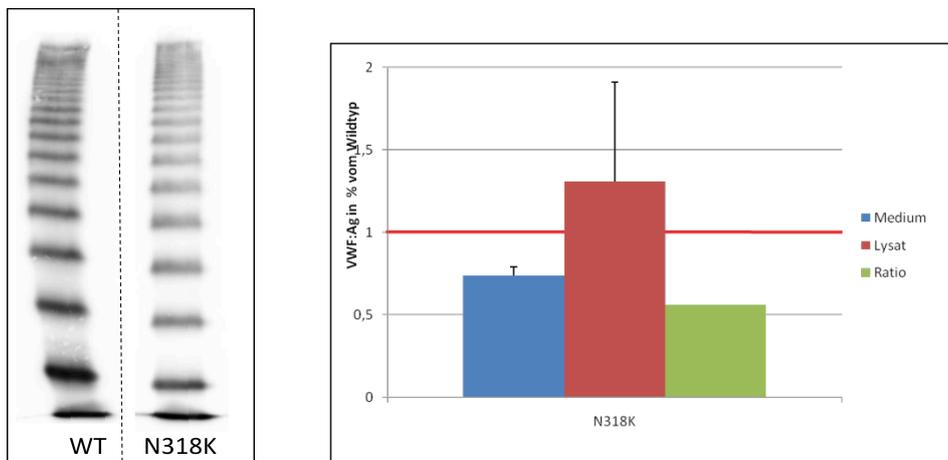


Abbildung 15: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.N318K. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 9: Funktionelle Parameter der Mutation p.N318K im Medium in % vom Wildtyp

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.N318K</b>	<b>73,6</b>	<b>5,4</b>	<b>82,2</b>	<b>2,1</b>	<b>1,1</b>	<b>85,6</b>	<b>2,6</b>	<b>1,2</b>

## Ergebnisse

---

### Patient Nr. 07 c.1078G>A, p.G360S

Bei dem folgenden Patienten findet sich im Exon 9 des Gens der Nukleotidaustausch c.1078G>A heterozygot, der zu dem Aminosäureaustausch p.G360S führt. Diese Mutation ist bisher die einzige, die bei diesem Patienten nachgewiesen werden konnte. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als eventuell beeinträchtigend einzustufen. Bei dem Patienten konnten keine Multimere dargestellt werden. Die VWF:Ag-Konzentration und die VWF:CB waren jeweils kaum nachweisbar.

Bei den quantitativen Bestimmungen in der in-vitro Studie fanden sich dagegen nur leicht erniedrigte Werte. Die VWF-Antigen-Konzentration betrug im Zellkulturmedium 64%, im Lysat 81,6% (Abb. 16). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,78.

Bezüglich der Funktionsparameter fanden sich, der VWF:Ag-Konzentration im Medium entsprechend, normale Werte: Die Rationes GPIb/VWF:Ag und CB:Ag/VWF:Ag haben jeweils ungefähr den Wert 1 (Tab. 11).

Die Multimeranalyse ergab im Vergleich zum Wildtyp ein nur leicht abgeschwächt wirkendes Bild, das jedoch strukturell keine Auffälligkeiten aufweist (Abb. 16).

Aufgrund der obengenannten Ergebnisse ist es also unwahrscheinlich, dass die Missensemutation p.G360S ursächlich für die Symptomatik des Patienten ist.

## Ergebnisse

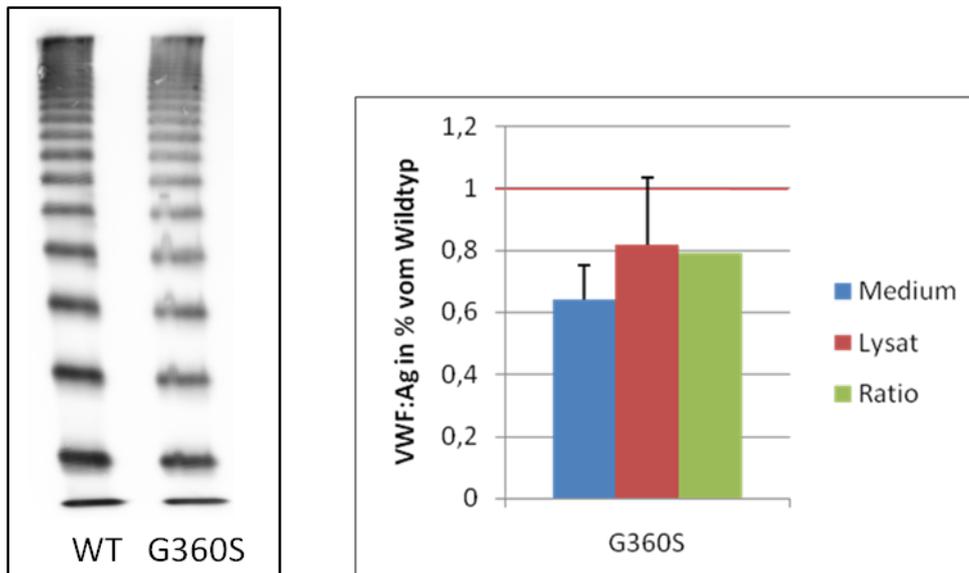


Abbildung 16: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.G360S. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 10: Funktionelle Parameter der Mutation p.G360S im Medium in % vom Wildtyp.

Mutation	Ag	SD	GPIb	SD	Ratio GPIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
p.G360S	64,1	11,4	0,6	2,0	1,0	0,6	1,1	1,0

## Ergebnisse

### Patient Nr. 08 c.1131G>T, p.W377C

Bei dieser Patientin wurde im Exon 10 der Nukleotidaustausch c.1131G>T homozygot nachgewiesen, der zu dem Aminosäureaustausch p.W377C führt. Diese Mutation wurde bereits beschrieben (Michiels et al. 2009). Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist sie als wahrscheinlich beeinträchtigend einzustufen.

Bei der molekulargenetische Untersuchung der Familie der Patientin 08 fand sich für die von der Symptomatik eines schweren VWS Typ 3 betroffene Patientin ein homozygoter Status der Missensemutation p.W377C. Bei der Mutter und einer Halbschwester (S1) konnte ein heterozygotes Vorliegen der Missensemutation nachgewiesen werden, die andere Halbschwester (S2) war homozygot für den Wildtyp. Eine Analyse des biologischen Vaters konnte nicht durchgeführt werden (Abb. 17).

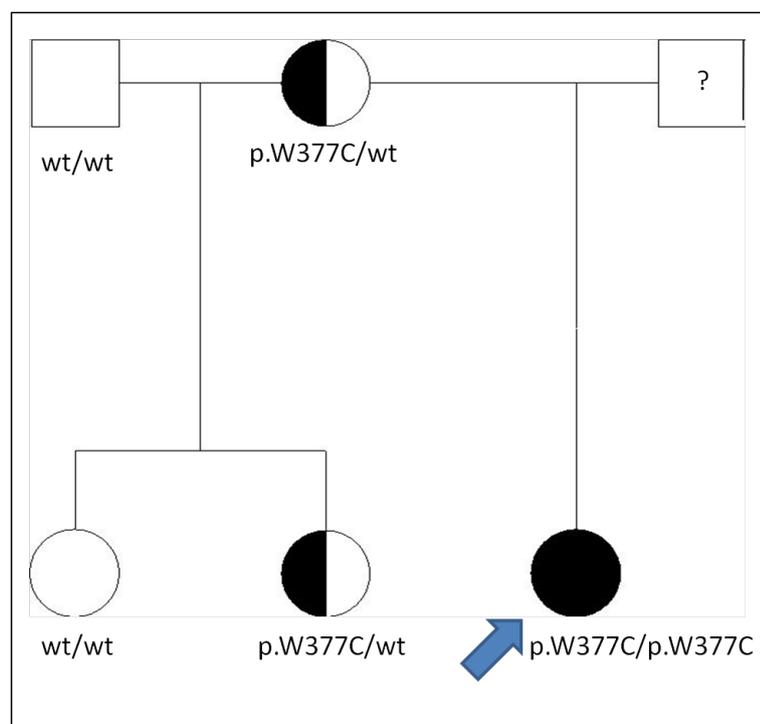


Abbildung 17: Stammbaum der Familie der Indexpatientin 08. Der Pfeil weist auf die Patientin 08. ? = unbekannter molekulargenetischer Status.

## Ergebnisse

---

Bei den betroffenen Familienmitgliedern fanden sich eine erniedrigte Kollagenbindungskapazität (VWF:CB) sowie atypische Multimere, nämlich ein Fehlen der großen und supranormalen Multimere sowie eine abnormale Tripletstruktur (Tab. 12).

*Tabelle 11: Ergebnisse der Diagnostik der Familie der Patientin 08.*

	VWF:Ag	VWF:CB	Multimere
Pat 08	<1	<1	o
Mutter	115	46	atyp
S1	93	54	atyp
S2	o.B.	o.B.	o.B.

Seit frühester Kindheit sind bei der Patientin rezidivierend auftretend Epistaxis und Hämatome ohne bzw. nach Bagateltraumata bekannt. Wie für den Typ 3 typisch ließen sich bei ihr weder VWF-Multimere noch das VWF:Ag nachweisen.

Nach rekombinanter Expression konnte im Medium eine stark erniedrigte Konzentration des VWF-Antigens von 4,3% des Wildtyps nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer Konzentration von 78,3% des Wildtyps (Abb. 18). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,05. Somit liegt ein schwerer Sekretionsdefekt vor.

Bei der Funktionsanalyse konnte keine GPIb-Bindung nachgewiesen werden, auch die Kollagenbindungskapazität war stark erniedrigt (Tab. 13).

Es konnten bei normaler Belichtung keine Multimere dargestellt werden (Abb. 18).

Diese Ergebnisse sprechen für die Kausalität dieser Missensemutation hinsichtlich des schweren VWS Typ 3 der Patientin.

## Ergebnisse

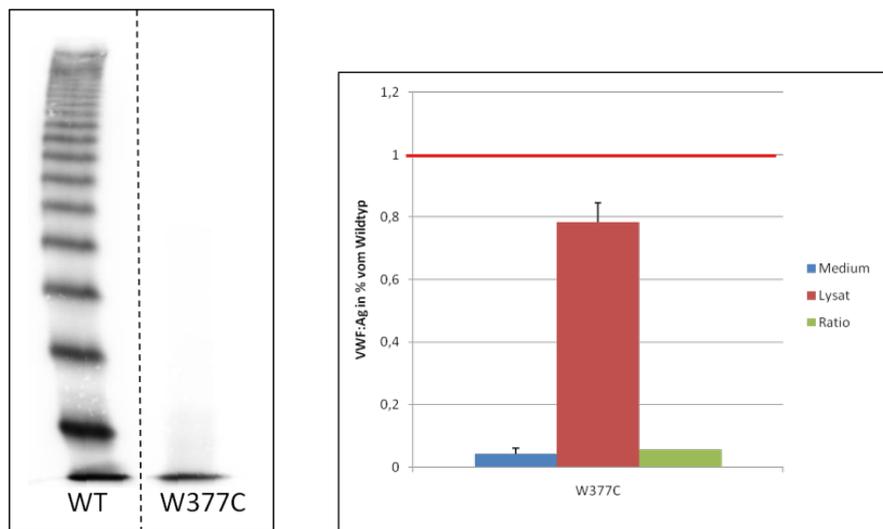


Abbildung 18: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.W377C. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 12: Funktionelle Parameter der Mutation p.W377C im Medium in % vom WT

Mutation	AG	SD	GPIb	SD	Ratio GPIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.W377C</b>	<b>4,3</b>	<b>1,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,71</b>	<b>0,11</b>	<b>0,14</b>

### Patient Nr. 09 c.3359G>C, p.W1120S

Bei dieser belgischen Patientin wurde eine bisher noch nicht beschriebene Mutation, die Deletion c.1795delC im Exon 15 nachgewiesen. Aufgrund ihrer Natur ist sie mit großer Wahrscheinlichkeit pathogen. Im Exon 25 fand sich der Nukleotidaustausch c.3359G>C heterozygot, der zu dem Aminosäureaustausch p.W1120S führt. Diese Mutation wurde zuvor bereits beschrieben. Sie wurde das erste Mal 1997 von Gaucher u.a. identifiziert (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/index.html>), jedoch nicht klassifiziert. Zudem wurde die Mutation im Zuge einer Studie über die Labordiagnostik des VWS publiziert und im heterozygoten Status dem VWS Typ 2A Subtyp IIE zugeordnet (Gadisseur et al. 2009, Schneppenheim & Budde 2011).

Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als wahrscheinlich beeinträchtigend einzustufen. In vivo lag die VWF:Ag-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. In der Multimeranalyse fand sich lediglich ein leichtes Signal.

In der Expression konnte bei dieser Missensemutation im Medium eine Konzentration des VWF-Antigens von 6,8% des Wildtyps nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer Konzentration von 102,8% des Wildtyps (Abb. 19). Die Ratio Medium/Lysat ist dementsprechend stark erniedrigt bei 0,07. Dies spricht für einen Sekretionsdefekt.

Die VWF:CB zu VWF:Ag-Ratio zeigt sich mit einem Wert von 0,05 stark erniedrigt, während die GPIb-Bindung im Bezug zum VWF:Ag im Medium nur auf ca. 50% erniedrigt war (Tab. 14).

Bei der in vitro-Multimeranalyse ließen sich lediglich Spuren von Multimeren nachweisen (Abb. 19). Daraus lässt sich schließen, dass die vorliegende Missensemutation p.W1120S wahrscheinlich mindestens mitverantwortlich für den VWS Typ 3 des Patienten ist.

## Ergebnisse

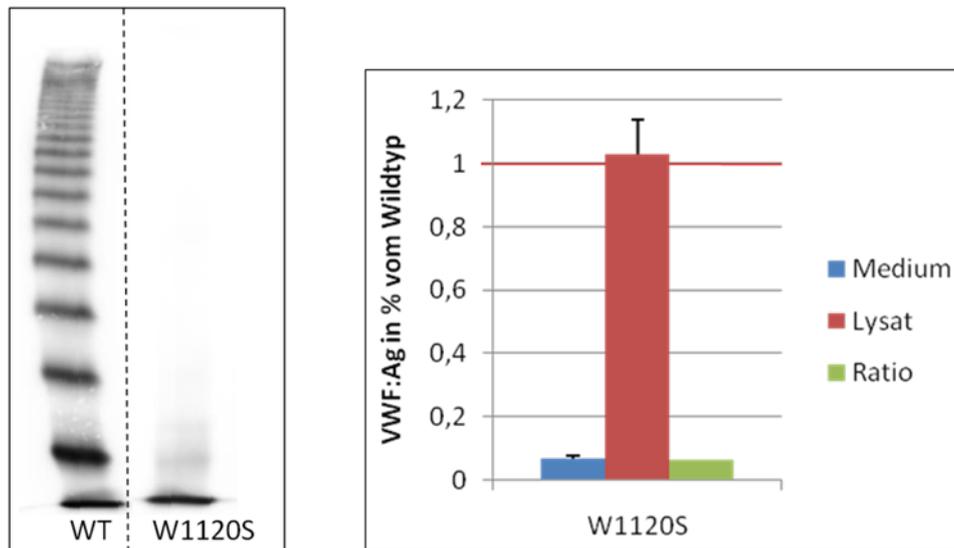


Abbildung 19: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.W1120S. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 13: Funktionelle Parameter der Mutation p.W1120S im Medium in % vom WT.

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
p.W1120S	6,8	0,7	3,2	2,8	0,5	0,4	0,1	0,05

## Ergebnisse

---

### Patient Nr. 10 c.4138A>G, p.I1380V; c.4349A>G, p.N1435S

Bei dieser türkischstämmigen Patientin wurden insgesamt drei Mutationen im VWF-Gen gefunden. Der Nukleotidaustausch c.2451T>A findet sich im Exon 19 und führt zum Aminosäureaustausch p.H817Q. Diese Missensemutation wurde bereits beschrieben und führt zum VWS Typ 2N (Kroner et al. 1996). Im Exon 28 der Patientin fand sich zusätzlich der Nukleotidaustausch c.4138A>G homozygot, der zu dem Aminosäureaustausch p.I1380V führt sowie der Nukleotidaustausch c.4394A>G, der zum Aminosäureaustausch p.N1435S führt. Diese beiden Missensemutationen finden sich in der ISTH-SSC VWF Online Database als Polymorphismen. In der untersuchten französischen Population treten diese Varianten mit einer Häufigkeiten von 1% auf (Lavergne, French Network, unpublished). Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm sind die beiden Mutationen als benigne einzustufen.

Die bei dieser Patientin in vivo gemessenen Daten sind untypisch für einen klassischen Typ 3. Bei verschiedenen Messungen konnten Werte für das VWF:Ag zwischen 6 und 11% nachgewiesen werden. In der Multimeranalyse waren die großen und mittelgroßen Multimere nicht vorhanden. Zudem fand sich eine pathologische Tripletstruktur, bei der die schnellste Subbande deutlich betont erschien. In der vorliegenden Arbeit wurden für die bisher noch nicht exprimierten Missensemutationen p.I1380V und p.N1435S sowohl jeweils eine homozygote Expression als auch eine Co-Expression durchgeführt.

Bei der Mutation c.4138A>G lag die VWF-Antigen-Konzentration im Zellkulturmedium bei 94,8% des Wildtyps, im Lysat bei 56,9%. Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 1,66.

Bei Expression der Missensemutation c.4394A>G konnte im Medium eine Konzentration des VWF:Ag von 80,8% des Wildtyps nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer Konzentration von 86,3% des Wildtyps. Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,93.

## Ergebnisse

---

Bei Co-Expression beider Missensemutationen fanden sich für das VWF:Ag im Medium ein Wert von 97,9%, im Lysat 73,1% (Abb. 20). Die Ratio aus Medium und Lysat liegt entsprechend bei 1,33.

Die funktionellen Untersuchungen ergaben normale Werte (Tab. 15).

In der Multimeranalyse konnten alle Multimere nachgewiesen werden (Abb. 20).

Die vorliegenden Ergebnisse der Expressionsstudie sprechen daher eher gegen eine Kausalität der Mutationen. Eine Erklärung für die in vivo bestimmten Werte der Patientin wäre die Mutation p.H817Q in Exon 19. Diese Missensemutation ist im homozygoten Zustand bereits als kausal für einen Typ 2N des VWS identifiziert worden (Kroner et al. 1996). Allerdings könnte auch die hier untersuchte Missensemutation p.N1435S mitverantwortlich für das Ergebnis der Multimeranalyse in vivo sein. Sie könnte für eine erhöhte Empfindlichkeit des mutanten VWF für die Protease ADAMTS13 verantwortlich sein, die in der Konsequenz zu dem oben beschriebenen Bild der Plasma-Multimeranalyse mit fehlenden großen und mittleren Multimeren sowie der aberranten Tripletstruktur mit verstärkten proteolytischen Banden führt.

## Ergebnisse

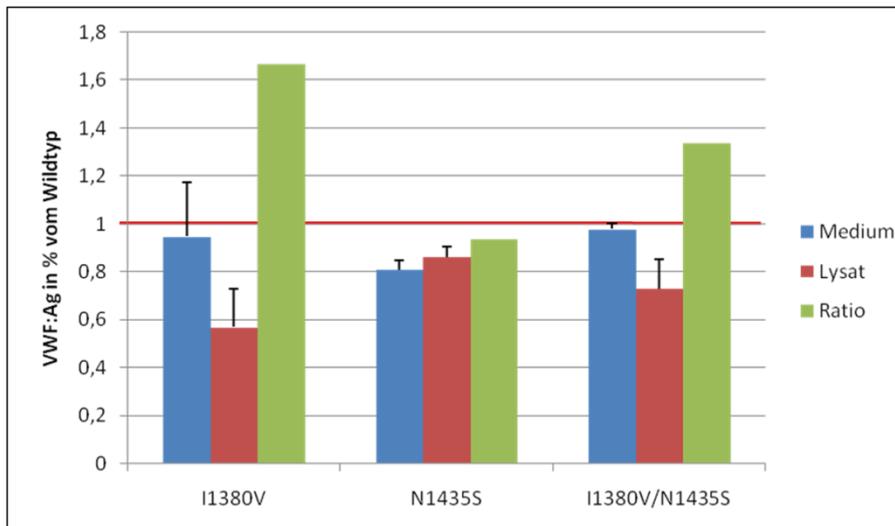
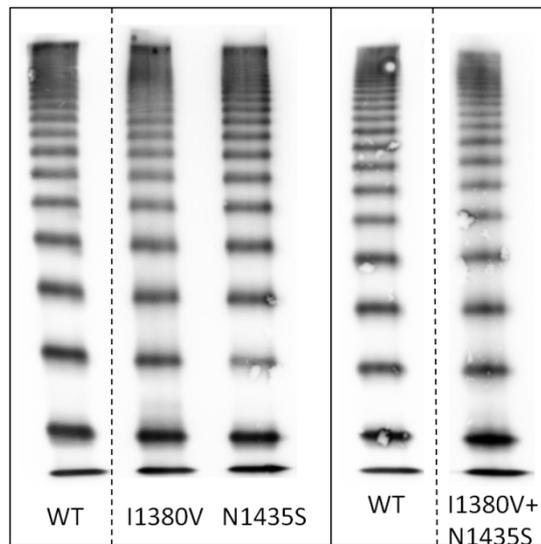


Abbildung 20: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutationen der Patientin 10. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 14: Funktionelle Parameter der Mutationen der Patientin 10 im Medium in % vom WT

Mutation	AG	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.I1380V</b>	<b>94,8</b>	<b>22,5</b>	<b>115,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>84,0</b>	<b>1,4</b>	<b>0,9</b>
<b>p.N1435S</b>	<b>80,0</b>	<b>3,8</b>	<b>81,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,0</b>	<b>92,9</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>
<b>p.I1380V/p.N1435S</b>	<b>97,9</b>	<b>2,3</b>	<b>92,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>93,8</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>

## Ergebnisse

---

### Patient Nr. 11 c.5380A>G, p.K1794E

Im Exon 31 dieses indischen Patienten fand sich der Nukleotidaustausch c.5380A>G heterozygot, der zu dem Aminosäureaustausch p.K1794E führt. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als eventuell beeinträchtigend einzustufen. Eine zweite Mutation konnte nicht identifiziert werden (Gupta et al. 2008). Der Patient wies in vivo eine stark verlängerte Blutungszeit von über 15 Minuten sowie eine stark verlängerte aPTT von 108 Sekunden auf. Die VWF:Ag-Konzentration betrug nur 2%.

In der Expression konnte im Zellkulturmedium eine im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte Konzentration des VWF-Antigens von 15,4% nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer leicht erniedrigten Konzentration von 78,4% des Wildtyps (Abb. 21). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,2.

Funktionell wurden im Medium auch erniedrigte Werte gemessen, so dass die Rationes GPIb/VWF:Ag bzw. VWF:CB/VWF:Ag 0,4 bzw. 0,2 betragen (Tab. 16).

In der Multimeranalyse ließen sich alle Multimere des normalen Plasmapools darstellen (Abb. 21).

Durch die Missensemutation p.K1794E lässt sich der Phänotyp des Patienten nur bedingt erklären.

## Ergebnisse

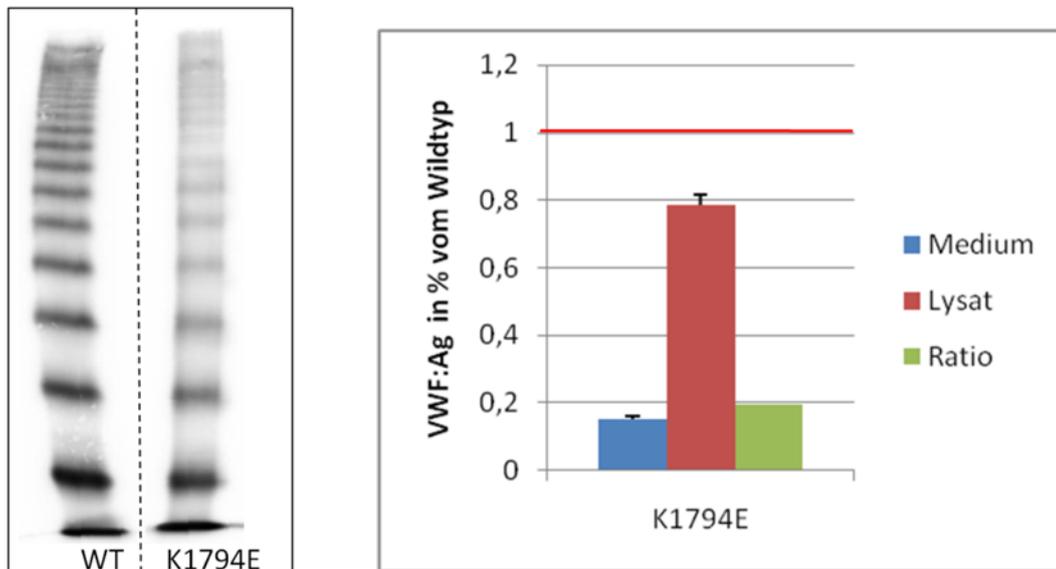


Abbildung 21 Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.K1794E. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 15: Funktionelle Parameter der Mutation p.K1794E im Medium in % vom WT.

Mutation	AG	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.K1794E</b>	<b>15,4</b>	<b>0,7</b>	<b>6,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>2,7</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>

## Ergebnisse

---

Patient Nr. 12 c.6911G>A, p.C2304Y und Patient Nr.13 c.6911G>A, p.C2304Y;  
c.7940C>T, p.T2647M

Bei beiden Patienten wurde die Mutation c.6911G>A im Exon 40 heterozygot nachgewiesen, die zu dem Aminosäureaustausch p.C2304Y führt. Diese Mutation wurde bereits beschrieben (J. Eikenboom et al. 2009). Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als wahrscheinlich den VWF beeinträchtigend einzustufen.

Bei Patientin 12 wurde im Exon 36 zudem die Insertion c.6222\_6223insAACC gefunden, die zu einem vorzeitigen Stopcodon (p.K2075NfsX16) führt. Diese Mutation wurde bisher nicht beschrieben.

Bei Patient 13 konnte zudem im Exon 48 der Nukleotidaustausch c.7940C>T heterozygot nachgewiesen werden, der zu dem Aminosäureaustausch p.T2647M führt. Nach dem PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als eventuell beeinträchtigend einzustufen. Auch zu dieser Mutation wurden die Expressionsstudien durchgeführt.

Das VWF:Ag war bei beiden Patienten stark erniedrigt. Bei der Multimeranalyse fanden sich bei Patientin 12 nur noch Spuren von Multimeren, bei Patient 13 konnten Multimere mit einer pathologischen Tripletstruktur mit Verlust der schnellsten Subbande nachgewiesen werden.

Mittels Expression der Missensemutation p.C2304Y konnte im Medium eine stark erniedrigte Konzentration des VWF-Antigens nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer Konzentration von 88,8% des Wildtyps. Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,03, was für einen Sekretionsdefekt spricht.

Bei Expression der Missensemutation p.T2647M konnte im Medium die im Vergleich zum Wildtyp annähernd normale Konzentration des VWF-Antigens von 86,7% dargestellt werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer

## Ergebnisse

---

Konzentration von 84,9% des Wildtyps (Abb. 22). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 1,02.

Funktionell fanden sich für die Mutation p.C2304Y stark erniedrigte Werte, für die Mutation p.T2647M annähernd normale Werte (Tab. 17).

Auch die Multimeranalyse zeigte ein unauffälliges Bild für p.T2647M. Bei der Missensemutation p.C2304Y dagegen zeigte sich ein pathologisches Bild, da bis auf eine Bande keine Multimere dargestellt werden konnten (Abb. 22).

Bei der Missensemutation p.T2647M ist aufgrund der Ergebnisse anzunehmen, dass sie keine Rolle in Hinblick auf die Symptomatik des Patienten 13 spielt, da man annähernd Normalwerte sowohl bei den quantitativen als auch bei den qualitativen Untersuchungen finden konnte, während die Missensemutation p.C2304Y als kausale Mutation angesehen werden kann.

## Ergebnisse

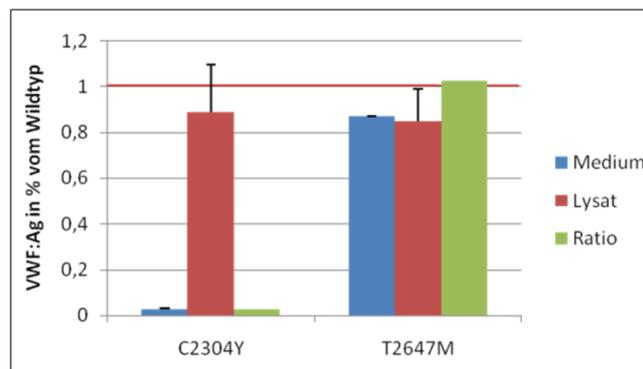
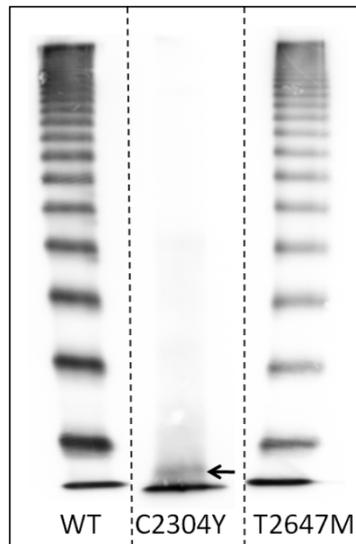


Abbildung 22: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutationen p.C2304Y und p.T2647M. Der Pfeil weist auf die eine nachgewiesene Bande. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 16: Funktionelle Parameter der Mutationen p.C2304Y und p.T2647M im Medium in % vom Wildtyp

Mutation	AG	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.C2304Y</b>	<b>2,5</b>	<b>0,6</b>	<b>2,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,9</b>	<b>1,9</b>	<b>0,04</b>	<b>0,8</b>
<b>p.T2647M</b>	<b>86,8</b>	<b>0,4</b>	<b>85,5</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	<b>85,2</b>	<b>0,2</b>	<b>1,0</b>

### Patient Nr. 14 c.7292G>A, p.C2431Y

Im Exon 43 dieser Patientin fand sich der Nukleotidaustausch c.7292G>A heterozygot, der zu dem Aminosäureaustausch p.C2431Y führt. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als wahrscheinlich den VWF beeinträchtigend einzustufen. Eine zweite Mutation konnte bisher nicht identifiziert werden. Der Plasma-VWF zeigte eine deutliche relative Abnahme der großen Multimere. Die Tripletstruktur war aufgehoben, es war nur die Zentralbande mit amorphem Material sichtbar. Die VWF:Ag-Konzentration betrug 5%.

Nach rekombinanter Expression konnte im Zellkulturmedium ebenfalls eine stark verringerte Konzentration des VWF-Antigens von 4,7% nachgewiesen werden. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer Konzentration von 67% des Wildtyps (Abb. 23). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,07. Dies spricht ebenfalls für einen Sekretionsdefekt.

Funktionell fanden sich erniedrigte Werte im Medium. Die Rationes lagen bei ca. 0,5 (Tab. 18). In der Multimeranalyse waren große und mittlere Multimere nicht nachweisbar, lediglich im Bereich der kleinen Multimere sind schmale Banden auszumachen (Abb. 23).

Die vorliegenden Ergebnisse erklären kein typisches VWS Typ 3, das bei der Patientin wahrscheinlich auch nicht vorliegt. Die Ergebnisse in vitro entsprechen den in vivo gemessenen Werten. Das bedeutet, dass die Mutation zusammen mit einer zweiten zu fordernden Mutation verantwortlich für die Symptomatik der Patientin sein kann.

## Ergebnisse

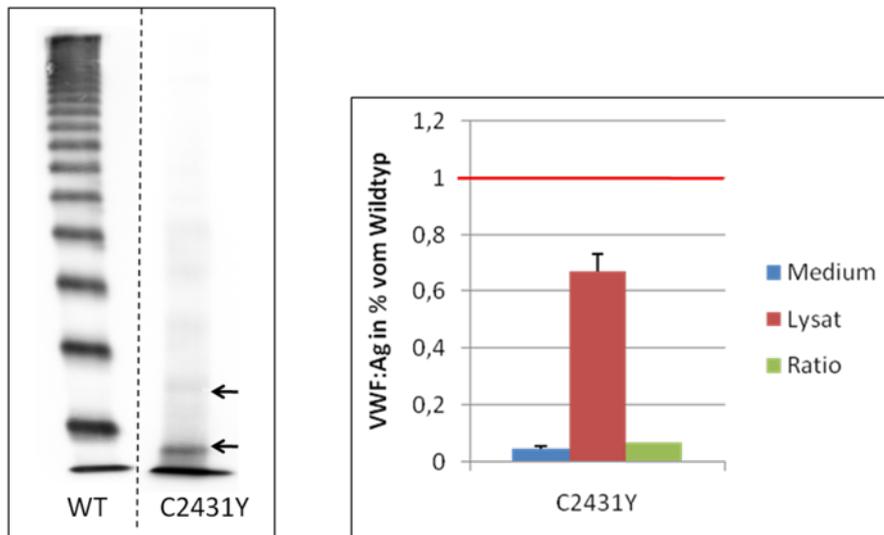


Abbildung 23: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.C2431Y. Die Pfeile weisen auf die nachgewiesenen Banden. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 17: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2431Y im Medium in % vom Wildtyp

Mutation	Ag	SD	GPIb	SD	Ratio GPIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.C2431Y</b>	<b>4,7</b>	<b>0,7</b>	<b>2,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>2,9</b>	<b>0,05</b>	<b>0,6</b>

## Ergebnisse

---

### Patient Nr. 15 c.7597T>C, p.C2533R

Bei dieser Patientin wurden insgesamt drei Mutationen gefunden. Im Exon 45 der Patientin fand sich der heterozygote Nukleotidaustausch c.7597T>C, der zu dem Aminosäureaustausch p.C2533R führt. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als wahrscheinlich beeinträchtigend einzustufen. Zusätzlich konnten die Splice-Site-Mutation IVS25+1G>A und im Exon 20 die Mutation c.2555G>A, die zum Aminosäureaustausch p.R854Q führt, nachgewiesen werden. Bei der Patientin sind seit ihrem zweiten Lebensmonat Blutungssymptome wie Hämatome aufgetreten. Zusätzlich kam es bei ihr zu Gelenkblutungen und starken Nachblutungen nach Operationen. In vivo fanden sich bei ihr eine VWF:Ag-Konzentration von 4 %, eine Blutungszeit von 12 Minuten und nicht nachweisbare Multimere.

Die rekombinante Expression der Mutation p.C2533R ergab eine im Vergleich zum Wildtyp mit 5% stark erniedrigte Konzentration des VWF:Ag. Im Lysat fand sich ein Wert für das VWF:Ag von 84,9% (Abb. 24). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,06.

Bezüglich der Funktionsparameter fanden sich zwar erniedrigte Werte für GPIIb und VWF:CB, in Beziehung zum gemessenen VWF:Ag gesetzt ergaben sich die Rationes 0,64 für GPIIb und 0,45 für VWF:CB (Tab. 19).

Die Multimeranalyse weist eine pathologische Tripletstruktur auf. Es ist nur noch die zentrale Subbande zu erkennen (Abb. 24).

Es ist davon auszugehen, dass die Mutation p.C2533R zusammen mit der Splice-Site-Mutation verantwortlich für die Symptomatik der Patientin sein kann. Die Mutation p.R854Q wurde bereits mehrfach beschrieben und führt zu einem milden VWF:FVIII-Bindungsdefekt. Sie findet sich zu 1% in der Normalbevölkerung (Eikenboom et al. 1993) und ist sehr wahrscheinlich nicht verantwortlich für die schwere Symptomatik der Patientin.

## Ergebnisse

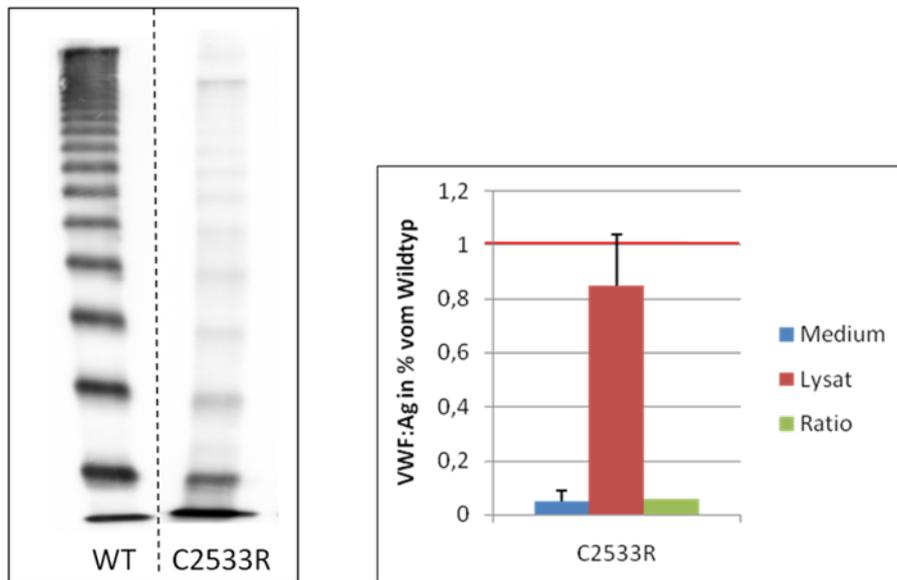


Abbildung 24: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.C2533R. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 18: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2533R im Medium in % vom WT

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
<b>p.C2533R</b>	<b>5,0</b>	<b>3,8</b>	<b>3,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,6</b>	<b>2,2</b>	<b>0,05</b>	<b>0,5</b>

## Ergebnisse

---

### Patienten Nr. 16 und Nr.17 c.8215T>C, p.C2739R

Bei beiden, nicht verwandten Patientinnen fand sich im Exon 51 der heterozygote Nukleotidaustausch c.8215T>C, der zu dem Aminosäureaustausch p.C2739R führt. Laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm ist diese Mutation als wahrscheinlich beeinträchtigend einzustufen. Patientin Nr. 16 weist zudem noch die Splice-Site-Mutation IVS28+3A>G auf, bei Patientin 17 findet sich in Exon 18 die Deletion c.2435delC, die zu einem vorzeitigen Stopcodon (p.P812RfsX31) führt. Diese Deletion ist bereits als eine der häufigsten beim VWS Typ 3 vorkommenden Mutationen beschrieben worden (R Schneppenheim et al. 1996). Zur Symptomatik ist bei beiden Patientinnen leider wenig bekannt. Die Multimeranalyse der Patientin 16 zeigte einen Fehlen der großen und mittleren Multimere sowie eine pathologische Tripletstruktur mit nur noch einer zentralen Subbande umgeben von amorphem Material. Die bei Patientin 17 durchgeführte Multimeranalyse lag nicht vor.

Die rekombinante Expression der Missensemutation ergab im Zellkulturmedium eine stark verringerte Konzentration des VWF:Ag von 3,6%. Im Lysat fand sich das VWF:Ag in einer erniedrigten Konzentration von 46,8% des Wildtyps. Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,08 (Abb. 25). Die Funktionen des mutanten VWF waren deutlich erniedrigt (Tab. 20).

Die Multimeranalyse ergab ein pathologisches Bild. Es ließen sich eindeutig auch hier ein Fehlen der großen und mittleren Multimere sowie eine aberrante Tripletstruktur nachweisen (Abb. 25). Dies entspricht der Multimeranalyse in vivo bei Patientin 16.

Es ist davon auszugehen, dass die jeweilige Mutation, die auf dem anderen Allel der Patientinnen liegt, zu einem Nullallel führt. Bei Patientin 16 führt die Mutation c.5053+3A>G laut Splice-Site-Prediction-Programm ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) zu einem Wegfall der Donor-Splice-Site des Exon 28. Durch den Wegfall des Exon 28 würde es theoretisch an Position p.1225 zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons kommen.

## Ergebnisse

Bei Patientin 17 führt die Mutation c.2435delC an Position p.842 zur Entstehung eines frühzeitigen Stopcodons und damit zu einem Nullallel. Die vorliegende Deletion ist bereits häufig beschrieben worden (Zhang et al. 1992, (R Schneppenheim, Krey, et al. 1994). Zusammen mit den jeweiligen zweiten Mutationen kann die beschriebene Missense-Mutation p.C2739R kausal für die Symptomatik der Patientinnen sein.

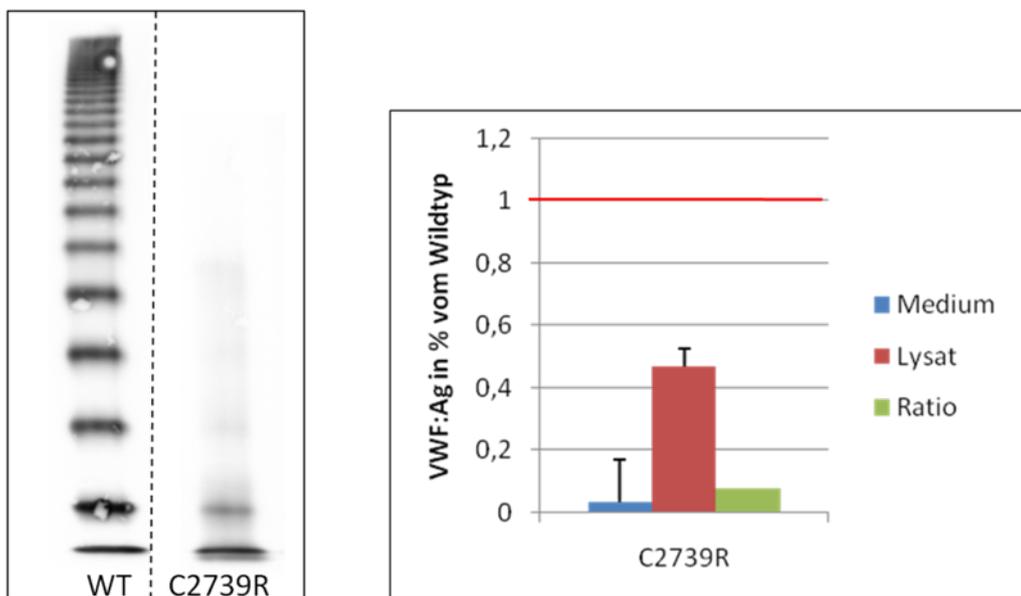


Abbildung 25: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.C2739R. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 19: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2739R im Medium in % des Wildtyps.

Mutation	Ag	SD	GPIIb	SD	Ratio GPIIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
p.C2739R	3,6	13,5	1,6	0,1	0,5	2,6	0,0	0,2

### Patient Nr. 18 c.8255G>A, p.G2752D

Bei dieser Patientin wurden zwei Mutationen detektiert. Im Exon 28 fand sich die Deletion c.3771\_3772delGT, die zu einem vorzeitigen Stopcodon (p.Y1258Cfsx34) führt. Im Exon 52 war zudem die Missensemutation c.8255G>A, die zum Aminosäureaustausch p.G2752D führt, nachweisbar. Dieser Aminosäureaustausch beeinträchtigt wahrscheinlich den VWF laut PolyPhen-Prädiktionsprogramm. Bei der Patientin sind seit frühester Kindheit schwere Blutungssymptome wie Hämatome und Magenblutungen bekannt. Im Plasma lag die VWF:Ag-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, auch die Kollagenbindungskapazität war mit unter 2% stark erniedrigt. In der Multimeranalyse konnten nur Spuren von Multimeren nachgewiesen werden.

Die rekombinante Expression ergab jedoch ein VWF:Ag im Medium von 12,3% des Wildtyps, im Lysat von 52,1% (Abb. 26). Die Ratio Medium/Lysat beträgt dementsprechend 0,24.

Die Funktionsparameter waren ebenfalls vermindert, so dass sich eine Ratio aus GPIb-Bindung zu VWF:Ag von 0,5 und für die Ratio VWF:CB/ VWF:Ag ein Wert von 0,2 ergab (Tab.21).

Die Multimere sind darstellbar, allerdings mit deutlich veränderter Struktur. Es findet sich im Vergleich zum Wildtyp eine aberrante Anzahl der Multimere, die sich in Zwischenbanden widerspiegeln (Abb. 26). Der hier beschriebene Defekt führt also nicht zu einem Nullallel.

## Ergebnisse

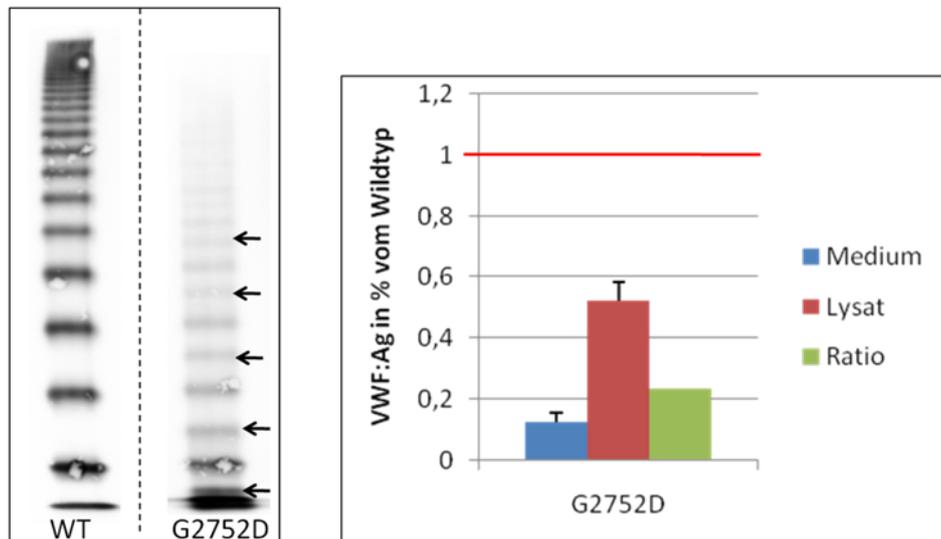


Abbildung 26: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration des VWF:Ag in Medium und Lysat der Mutation p.G2752D. Die Pfeile weisen auf die zusätzlich nachgewiesenen Banden. Die rote Linie kennzeichnet den Referenzwert des VWF-Wildtyps (100%).

Tabelle 20: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2752D im Medium in % des Wildtyps

Mutation	Ag	SD	GPIb	SD	Ratio GPIb/Ag	CB	SD	Ratio CB/Ag
p.G2752D	12,3	3,1	6,4	0,8	0,5	2,6	0,0	0,2

### **3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurden 19 Missensemutationen untersucht, die bei 18 Patienten mit VWS Typ 3 identifiziert worden waren. Nach der dazu durchgeführten Untersuchung mit dem PolyPhen-Prädiktionsprogramm wurden 8 Mutationen als wahrscheinlich, 8 Mutationen als eventuell und 3 Mutationen als wahrscheinlich nicht den VWF schädigend eingestuft. Drei der als eventuell schädigend eingestuften Mutationen zeigten in der Expressionsstudie keinen oder kaum einen Effekt auf den VWF. Bei 11 der 18 Mutationen (p.V86E, p.L129R, p.G525E, p.G163V, p.Y271H, p.W377C, p.W1120S, p.C2304Y, p.C2431Y, p.C2533R, p.C2739R) ist es sehr wahrscheinlich, dass sie verantwortlich für die klinischen Symptome der Patienten sind. Bei 3 Missensemutationen (p.N318K, p.K1794E, p.G2752D) ließen sich zwar erniedrigte VWF:Ag-Konzentrationen messen, diese reichen aber nicht zur Erklärung der Symptomatik eines schweren Typ 3 aus. 5 Missensemutationen (p.F2267I, p.G360S, p.I1380V, p.N1435S, p.T2647M) ließen sich nicht mit dem klinischen Phänotyp eines schweren VWS Typ 3 korrelieren.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse des PolyPhen-Prädiktionsprogramms sowie der Expressionsstudie zusammengefasst.

## Ergebnisse

---

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse des Prädiktionsprogramms PolyPhen

<b>Mutation</b>	<b>Ergebnis des Prädiktionsprogramms</b>	<b>Übereinstimmung mit Ergebnissen der Expression</b>
V86E	eventuell	ja
L129R	eventuell	ja
G163V	wahrscheinlich	ja
Y271H	eventuell	ja
N318K	benigne	ja
G360S	eventuell	nein
W377C	wahrscheinlich	ja
G525E	wahrscheinlich	ja
W1120S	wahrscheinlich	ja
I1380V	benigne	ja
N1435S	benigne	ja
K1794E	eventuell	ja
F2267I	eventuell	nein
C2304Y	wahrscheinlich	ja
C2431Y	wahrscheinlich	ja
C2533R	wahrscheinlich	ja
T2647M	eventuell	nein
C2739R	wahrscheinlich	ja
G2752D	eventuell	ja

## Ergebnisse

Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der rekombinanten Expression

Mutation	Medium		Lysat		Ratio *	Medium		Ratio #	Medium		Ratio +
	Ag	SD	Ag	SD		Gplb	SD		CB	SD	
wt	100,0	6,5	100,0	30,5	1,0	100,0	3,4	1,0	100,0	4,0	1,0
L129R	3,6	0,8	69,1	2,7	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Y271H	5,1	1,7	160,9	54,8	0,0	0,0	0,3	0,0	0,7	0,8	0,1
N318K	73,6	5,4	130,8	60,7	0,6	82,2	13,	1,1	85,9	19,1	1,1
W377C	4,3	1,8	78,3	6,2	0,1	0,0	0,0	0,0	1,4	1,2	0,3
G525E	5,1	3,4	67,5	8,2	0,1	8,2	14,	1,6	1,1	1,6	0,2
W1120S	6,8	0,7	102,8	11,7	0,1	3,2	2,8	0,5	0,4	0,6	0,1
K1794E	15,4	0,7	78,4	3,1	0,2	6,6	1,6	0,4	2,7	1,2	0,2
F2267I	71,0	6,7	93,9	11,7	0,8	9,1	13,	0,1	55,3	0,0	0,8
wt	100,0	17,1	100,0	0,0	1,0	100,0	4,9	1,0	100,0	18,2	1,0
V86E	0,0	0,0	66,5	9,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0
G163V	0,0	0,0	87,1	2,6	0,0	1,6	0,5	0,0	1,7	0,9	0,0
G360S	64,1	11,4	81,6	22,3	0,8	62,2	13,	1,0	62,5	21,1	1,0
I1380V	94,8	22,5	56,9	16,0	1,7	115,3	6,5	1,2	84,0	27,6	0,9
N1435S	80,8	3,8	86,3	4,1	1,0	81,8	12,	1,0	92,9	27,1	1,2
I1380V/N1435S	97,9	2,3	73,1	12,2	1,3	92,8	1,1	1,0	93,8	0,9	1,0
C2304Y	2,5	0,6	88,8	20,9	0,0	2,3	1,9	0,9	1,9	1,1	0,8
C2431Y	4,7	0,7	66,9	6,1	0,1	2,1	0,8	0,4	2,9	1,1	0,6
C2533R	5,0	3,8	84,7	19,0	0,1	3,2	4,1	0,6	2,2	3,8	0,5
T2647M	86,8	0,4	84,7	13,9	1,0	85,6	0,7	1,0	85,2	0,0	1,0
C2739R	3,6	13,5	46,8	0,6	0,1	1,6	8,6	0,4	2,3	19,2	0,6
G2752D	12,3	3,1	52,1	6,2	0,2	6,4	5,8	0,5	2,6	0,2	0,2
wt	100,0	4,4	100,0	2,4	1,0	100,0	1,2	1,0	100,0	6,1	1,0
L129R/G525E	6,9	1,2	75,1	4,7	0,1	1,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0

### **4 Diskussion**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Kausalität und den Pathomechanismus von Missensemutationen bei Patienten mit schwerem VWS Typ 3 nachzuweisen. Die dazu verwendeten Methoden und die Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

#### **4.1 Indikationen für die molekulargenetische Diagnostik**

Bei Patienten mit schwerem VWS Typ 3 besteht die Indikation zur molekulargenetischen Analyse des Patienten. Nur auf diese Weise können heterozygote Träger der jeweiligen Mutationen identifiziert und somit Aussagen über das Risiko gemacht werden, ob zum Beispiel weitere Kinder der Familie vom schweren Typ 3 betroffen sein könnten. Auf der Basis dieser Befunde kann eine fundierte genetische Beratung erfolgen und gegebenenfalls den betroffenen Familien eine Pränataldiagnostik angeboten werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das VWS eine behandelbare Hämostasestörung ist, auch wenn eine erhöhte Morbidität und Mortalität vorliegt (Peake & Goodeve 2010).

Ein weiterer Grund für eine molekulargenetische Analyse ist eine eindeutige Klassifizierung des VWS, falls sich die genaue Typisierung mit den herkömmlichen hämostaseologischen Methoden nicht vornehmen lässt. Eine genaue Bestimmung ist vor allem für die typgerechte Behandlung des Patienten nötig (Nichols et al. 2008). Allerdings ist dies auf einfache Weise meist nur bei Patienten mit den Subtypen des VWS Typ 2 möglich, da sich hier bestimmte Mutationen in bestimmten Regionen des VWF-Gens finden. Beim Typ 1 und Typ 3 können die kausalen Defekte über das gesamte Gen verteilt liegen. Auch die in der vorliegenden Arbeit exprimierten Missensemutationen fanden sich über das gesamte Gen verteilt (Abb. 28, S. 82). Daher erfordert die molekulargenetische Analyse bei Typ 3 Patienten in der Regel die Komplettssequenzierung des VWF-Gens, die allerdings aufgrund dessen Größe

von 178 kb mit 52 Exons und Introns sehr aufwändig ist. Aus diesem Grund ist die Indikation zur molekulargenetischen Analyse des kompletten VWF-Gens sehr eng zu stellen.

Eine weitere Schwierigkeit der genetischen Analyse liegt, wie bei anderen diagnostischen Methoden auch, im Auftreten von falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen. Hierzu gehören einerseits fehlende Mutationen trotz eindeutigen Phänotyp, andererseits aber auch Sequenzvarianten ohne pathologische Bedeutung. In dieser Hinsicht kann bei fehlenden Mutationen, allerdings auch bei vorher nicht bekannten Missensemutationen, die Diagnose molekulargenetisch nicht bestätigt werden.

### 4.1.1 Fehlende Mutationen

In der vorliegenden Arbeit konnte bei drei Patienten (Patient 07, 11 und 14) nur je eine Mutation mittels Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zum autosomal-rezessiven Vererbungsmodus des VWS Typ 3, der zwei defekte Allele erfordert. Diese falsch negativen Ergebnisse können verschiedene Gründe haben.

- Durch die Sequenzierung nach Sanger werden zentral liegende Mutationen der Introns nicht erfasst, da mit dieser Methode in der Regel nur die Exons und deren flankierende Introns untersucht werden. Kausale Mutationen in den Introns können so eventuell nicht nachgewiesen werden.
- Die Symptome des Patienten lassen sich nicht kausal auf eine Mutation des VWF-Gens zurückführen. Als Beispiel sei eine seltene Form der Hämophilie genannt, bei der FV und FVIII im Plasma reduziert sind, die jeweiligen Gene allerdings keine Defekte aufweisen. Dafür findet man Mutationen in zwei Genen, deren Translationsprodukte beim intrazellulären Transport von FV und FVIII eine Rolle spielen (Spreafico & Peyvandi 2008). Ähnliche Mechanismen könnten auch beim VWS eine Rolle spielen, sind bisher aber noch nicht bekannt (Favaloro 2010).

- Die Diagnose eines VWS Typ 3 kann fehlerhaft sein. Bei einigen Phänotypen, bei denen ursprünglich ein VWS Typ 3 diagnostiziert wurde, sind heterozygote Verläufe eines schweren Typ 1 oder bestimmter Subtypen des Typ 2 denkbar. Diese Möglichkeit ist bei Patientin 14 in Betracht zu ziehen, da sich bei ihr in vivo im Plasma VWF:Ag und Multimere, wenn auch gestörter Struktur, nachweisen ließen, ein Hinweis auf ein VWS Typ 1.
- Letztlich darf auch die „Fehlerquelle Mensch“ nicht außer Acht gelassen werden. Es können Fehler bei der Blutentnahme, bei der Durchführung und vor allem der Auswertung der Sequenzanalyse unterlaufen.

#### 4.1.2 Missensemutationen mit normaler Sekretion

Bei 5 der insgesamt 19 exprimierten Missensemutationen fanden sich normale Expressionsdaten (Abb. 27).

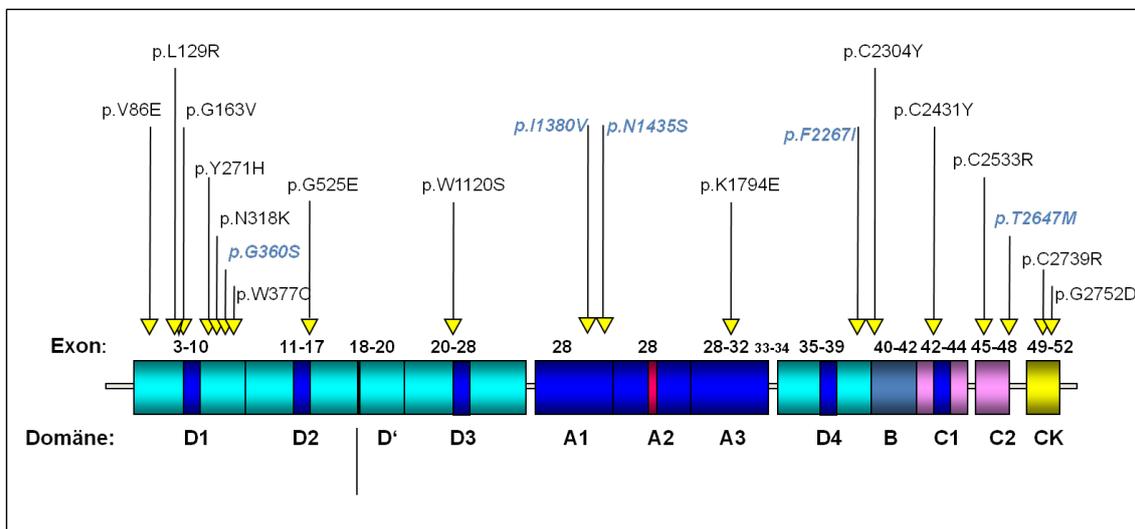


Abbildung 27: Lokalisation der Mutationen ohne Effekt auf den mutanten VWF (blau hervorgehoben).

Diese Diskrepanz zwischen Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchung und Ergebnis der Expression kann verschiedene Gründe haben.

- Validität des Phänotyps

Bei Patient 13 fanden sich im Plasma erniedrigtes VWF:Ag und aberrante VWF-Multimere. In diesem Fall konnten mittels molekulargenetischer Diagnostik zwei Missensemutationen nachgewiesen werden. Die Mutation p.C2304Y erwies sich als kausal für einen Typ 3, die zweite Mutation p.T2647M zeigte jedoch normale Expressionsergebnisse. Wahrscheinlich weist dieser Patient kein VWS Typ 3 auf. Der Phänotyp ist vielmehr als schweres VWS Typ 1 zu klassifizieren.

- Polymorphismen und Sequenzvarianten

Ebenfalls als falsch positive Ergebnisse in der Suche nach für ein VWS Typ 3 kausalen Missensemutationen sind die Mutationen p.N318K bei Patientin 06 (die trotzdem einen gewissen Effekt auf den mutanten VWF aufweist, s.u.) und p.I1380V und p.N1435S bei Patientin 10 zu betrachten. Alle drei Mutationen werden inzwischen als Polymorphismen in der ISTH-SSC VWF Online Database geführt. Fallen Mutationen, die eigentlich Sequenzvarianten sind, zum ersten Mal auf, so ist es schwierig, sie auch als solche zu identifizieren. Dazu müssten Gesamtpopulationen untersucht und verglichen werden, was insbesondere bei mit geringer Frequenz auftretenden Varianten sehr aufwändig ist. Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsstudien kann ein Beitrag dazu geleistet werden, bestimmte Missensemutationen besser zu kategorisieren. Die Missensemutationen p.G360S, p.F2267I und p.T2647M sind zum Beispiel mögliche Kandidaten für neutrale Sequenzvarianten, da ihre Expression in vitro keinen Effekt auf den mutanten VWF zeigt.

- Effekt nur in vivo nachweisbar

Zudem könnten auch Mutationen, die in der Expressionsstudie keinen Effekt auf den mutanten VWF zeigten, in vivo sehr wohl Einfluss auf die VWF-Konzentration im Plasma haben. Die Mutation R1205H der D3-Domäne wurde als Kandidatmissensemutation für ein VWS Typ 1 Vicenza identifiziert

(Schneppenheim et al. 2000). In vitro Studien zu dieser Mutation zeigten keinen starken Effekt auf Funktion und Struktur des VWF. Eine Erklärung des Phänotyps der betroffenen Patienten gab allerdings eine in vivo Studie mit Mäusen, die keinen VWF bilden können. Wurde diesen Tieren radiomarkierter rekombinanter VWF mit der Mutation R1205H injiziert, so zeigte sich eine um das 10fache erhöhte Clearance im Vergleich zum Wildtyp-VWF (Lenting et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich für die Cysteinmutation der D3-Domäne p.C1169W, die compound-heterozygot mit der bei VWS Typ 3 häufigsten Mutation c.2435delC zu einer stark erhöhten Clearance des VWF aus dem Plasma zu führen scheint (Schneppenheim & Budde 2011). Die D3-Domäne funktioniert anscheinend auch als Schutz für den VWF vor vorzeitiger Clearance in vivo.

Ein Verlust der großen Multimere (HMWM) des VWF im Plasma kann auf eine erhöhte Empfindlichkeit des mutanten VWF gegenüber der Metalloprotease ADAMTS13 zurückgeführt werden. Diese erhöhte Empfindlichkeit findet sich bei verschiedenen Mutationen der A2-Domäne im Exon 28 (Hassenpflug et al. 2006). Die in der vorliegenden Arbeit exprimierten Sequenzvarianten p.I1380V und p.N1435S, die sich bei Patientin 10 nachweisen ließen, finden sich ebenfalls in dieser Region. In der Expression konnte kein Effekt der Mutationen auf den mutanten VWF nachgewiesen werden. In vivo dagegen findet sich bei der Patientin ein Fehlen der großen und mittleren Multimere. Die Tripletstruktur zeigt sich gestört mit verstärkten proteolytischen Banden. Dieses Bild könnte durch eine wie oben beschriebene erhöhte Empfindlichkeit des VWF gegenüber ADAMTS13 erklärt werden. In diesem Fall sollte von einem VWS Typ 2A gesprochen werden, was auch der Symptomatik der Patientin besser entspricht als die Diagnose eines VWS Typ 3. Um diese Annahme der erhöhten ADAMTS13-abhängigen Proteolyse in vivo des VWF zu überprüfen, müsste ein ADAMTS13-Assay nach Furlan durchgeführt werden (Furlan et al. 1996).

## 4.2 Missensemutationen mit verminderter Sekretion

Die Missensemutationen beim VWS Typ 3 zeigen ein sehr heterogenes Bild. Sie finden sich über das gesamte VWF-Gen verteilt, dies ist auch der Fall bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutationen, bei denen ein Effekt auf den mutanten VWF nachzuweisen war (Abb.28).

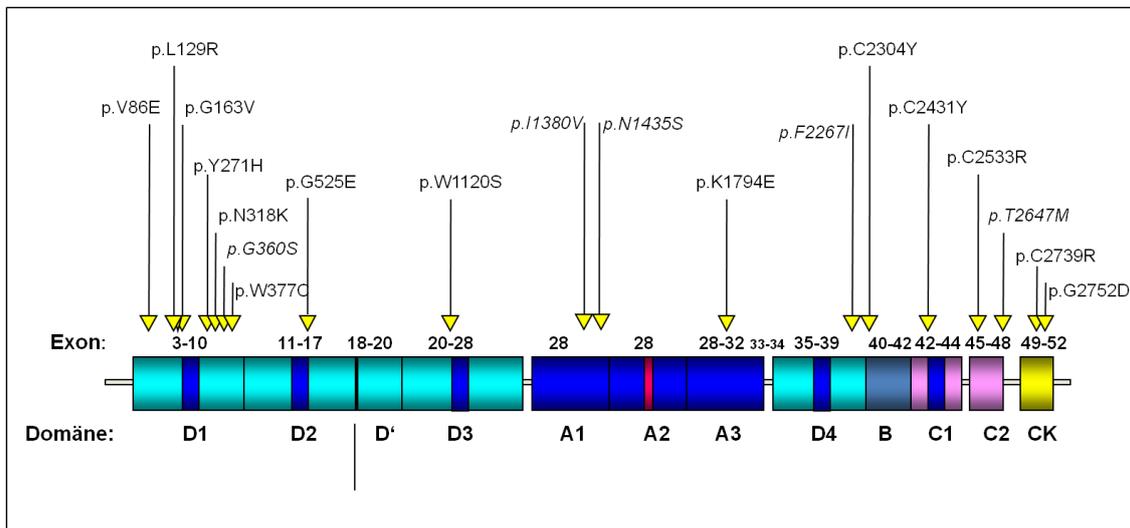


Abbildung 28: Lokalisation der für einen VWS Typ 3 wahrscheinlich kausalen Missensemutationen. Missensemutationen ohne Effekt auf den mutanten VWF sind kursiv dargestellt.

Obwohl sich keine eindeutigen Mutationscluster ausmachen lassen, wie sie zum Beispiel bei den verschiedenen Subtypen des VWS Typ 2 vorkommen, so lässt sich eine Häufung von Mutationen im Propeptid des VWF (VWFpp) und in den Domänen des Carboxyterminus erkennen. Zudem finden sich in diesen Regionen gehäuft Cysteinmutationen. Anhand dieser Regelmäßigkeiten wird im Folgenden genauer auf den Pathomechanismus der Mutationen eingegangen.

### 4.2.1 Cysteinmutationen

Cysteinmutationen sind Missensemutationen, bei denen Cystein durch eine andere Aminosäure oder eine beliebige Aminosäure durch Cystein

## Diskussion

ersetzt wird. Im reifen VWF-Monomer findet sich - im Vergleich zu anderen Proteinen mit durchschnittlich 2,8% (Yurkanis Bruice 2004) - mit 8,2% eine überdurchschnittliche Menge von Cystein. Die in Clustern auftretenden Aminosäuren dienen wahrscheinlich der Katalysierung der inter- und intramolekularen Bindung des VWFs durch Disulfidbrücken (Marti et al. 1987). Bei einem Verlust von Cysteinen oder bei deren zusätzlichem Auftreten kommt es demnach zu einer Destabilisierung der bestehenden Verbindungen und somit zu einer veränderten Konformation des VWF. Die funktionale Form des VWF, das Multimer, kann so nicht mehr gebildet werden. Bei 8 der 18 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten wurden Cysteinmutationen detektiert. Insgesamt fanden sich 4 verschiedene Cysteinmutationen, bei denen das Cystein entfällt: p.C2304Y, p.C2431Y, p.C2533R und p.C2739R. Bei der Patientin 08 fand sich die Mutation p.W377C, die einen Ersatz des Tryptophans durch Cystein bewirkt, ein Cystein also zusätzlich eingebaut wird (Abb. 29). Alle 5 Mutationen wurden von dem PolyPhen-Prädiktionsprogramm als wahrscheinlich den VWF schädigend eingestuft. Der jeweilige Effekt der Cysteinmutationen auf den mutanten VWF soll anhand ihrer Lokalisation im Folgenden beschrieben werden.

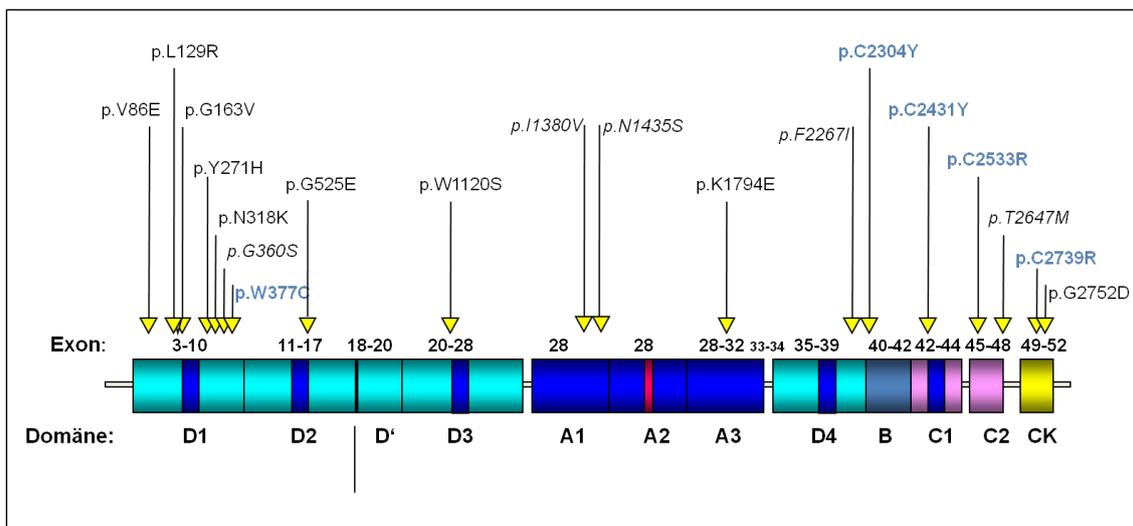


Abbildung 279: Lokalisation der Cysteinmutationen (blau hervorgehoben).

- D1-Domäne: Missensemutation p.W377C  
Die D1-Domäne des VWFpp dient der aminoterminalen Multimerisation der Dimere. Bei Mutationen in dieser Region kommt es zu einem Fehlen der generellen großen, oft auch der mittleren Multimere. Die Tripletstruktur der Banden ist aufgehoben. Diese Patienten werden der Untergruppe IIC des Subtyps 2A zugeordnet. In schweren Fällen werden die Patienten dem VWS Typ 3 zugeordnet. Bei der homozygoten Patientin 08 fand sich in der Expression ein schwerer Sekretionsdefekt. Multimere waren nicht nachweisbar.
- B-Domäne: Missensemutation p.C2304Y  
Die Funktion der B-Domäne ist bisher unbekannt. Die sich in dieser Region befindlichen Cysteine sind weder an der Multimerisierung noch an der Dimerisierung des VWF beteiligt (Eikenboom et al. 2009). Die Expression zeigt einen schweren Sekretionsdefekt und den Verlust der großen und mittleren Multimere.
- C1-Domäne: Missensemutation p.C2431Y  
Die Mutation findet sich in der C1-Domäne. Diese Domäne enthält die Bindungsregion für den GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten und dient so der Thrombozytenaggregation. Ein Defekt in diesem Bereich des VWF könnte zu einem funktionellen Defekt führen. Allerdings findet sich auch hier ein schwerer Sekretionsdefekt und Fehlen der großen und mittleren Multimere.
- C2-Domäne: Missensemutation p.C2533R  
Auch die Funktion der C2-Domäne ist bisher nicht aufgeklärt (Eikenboom et al. 2009). Bei dieser Mutation ist ebenfalls von einem schweren Sekretionsdefekt auszugehen. Die Multimere im Zellkulturmedium zeigen nur noch eine zentrale Subbande, wobei es auch hier zu einer Abschwächung des Signals der großen und mittleren Multimere kommt.

- CK-Domäne: Missensemutation p.C2739R.

Die carboxyterminale CK-Domäne ist für die Dimerisierung des VWF zuständig (Voorberg et al. 1991). Auch hier handelt es sich um einen schweren Sekretionsdefekt mit Fehlen der großen und mittleren Multimere.

Es ist also festzuhalten, dass die hier exprimierten Cysteinmutationen zu einer starken intrazellulären Retention des VWF und damit zu einem schweren Sekretionsdefekt führen. Bei den Cysteinmutationen, bei denen ein Cystein wegfällt, kommt es zudem zu einem Fehlen der großen und mittleren Multimere und fehlender Tripletstruktur. Unterschiede in den Ergebnissen der Expression bezüglich der betroffenen Domäne lassen sich nicht feststellen. Es ist also wahrscheinlich, dass generell durch Cysteinmutationen der mutante VWF durch gestörte intramolekulare Disulfidbrückenbindung beeinträchtigt wird, unabhängig von der Lokalisation der Mutation in den verschiedenen funktionellen Domänen des VWF.

#### 4.2.2 andere Mutationen

Neben den 5 Cysteinmutationen wurden in der vorliegenden Arbeit 9 weitere Missensemutationen untersucht, die im Ergebnis eine Beeinträchtigung des VWF zeigten (Abb. 30).

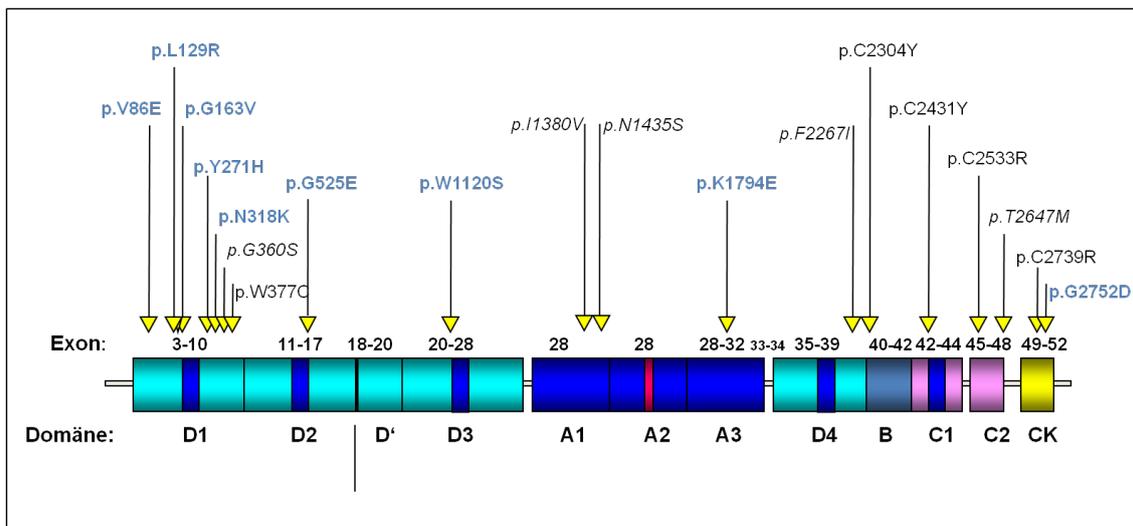


Abbildung 30: Lokalisation der Nicht-Cysteinmutationen (blau hervorgehoben).

Ihr Pathomechanismus wird im Folgenden im Bezug auf ihre Lokalisation im VWF-Gen dargestellt.

- Mutationen des Propeptids: p.V86, p.L129R, p.G163V, p.Y271H, p.N318K, p.G525E

Das Propeptid des VWF (VWFpp) ist für die Polymerisierung der VWF-Dimere erforderlich. Es besteht aus den beiden homologen Domänen D1 und D2, die jeweils über eine Disulfidisomerase-Konsensussequenz (CGLC) verfügen. Diese sind wahrscheinlich essentiell für die Multimerisierung des VWFs (Mayadas & Wagner 1992), so dass Mutationen in diesen Regionen zu Multimerisierungsdefekten führen können (Rosenberg et al. 2002). Zudem dient das Propeptid dem intrazellulären Transport und der Speicherung des VWFs in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen bzw. den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten. Beide Funktionen, also Multimerisierung und Transport bzw. Speicherung, sind unabhängig voneinander (Rosenberg et al. 2002). Mutationen in diesem Bereich des VWF führen zur Untergruppe IIC des Phänotyps 2A, der durch ein Fehlen der großen und oft auch der mittleren Multimere sowie deren aufgehobene Tripletstruktur gekennzeichnet ist. Von den sechs im Propeptid nachgewiesenen Mutationen bewirken alle Mutationen mit Ausnahme der Mutation p.N318K einen deutlichen Sekretionsdefekt mit Fehlen der Multimere im Zellkulturmedium. Es ist also von einem stark beeinträchtigten intrazellulären Transport auszugehen. Eine verminderte Expression scheint aufgrund des nur leicht erniedrigten VWF:Ag im Lysat keine Rolle zu spielen. Die Mutation p.N318K dagegen bewirkt wohl nur einen leicht gestörten intrazellulären Transport und keine Multimerisierungsstörung, da bei ihr die Multimeranalyse ein normales Bild ergibt. Zudem zeigte sich bei dieser Mutation und der Mutation p.Y271H ein erhöhtes VWF:Ag im Lysat. Dies weist auf eine starke intrazelluläre Retention hin.

- Mutation der D3-Domäne: p.W1120S

Mutationen in dieser Domäne können zu Multimerisierungsdefekten des reifen VWF führen. Die bereits beschriebene CGLC-Sequenz der D1- und D2-Domäne des VWFpp führen zu einer Katalysierung der intramolekularen Brückenbildung und somit der Multimerisierung durch die D3-Domäne. Diese Multimerisierung ist vor allem den Cysteinresten dieser Region zugeschrieben worden (Marti et al. 1987). Dieser Funktionsausfall ist, wenn auch in abgemilderter Form, auch auf Nicht-Cysteinmutationen dieser Region übertragbar (Gadisseur et al. 2009). Eine schwere Multimerisierungsstörung im homozygoten Zustand durch eine Nicht-Cysteinmutation, hier die Mutation p.W1120S, ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anzunehmen.

- Mutation der A3-Domäne: p.K1794E

Die A3-Domäne ist eine der zwei Regionen des VWF, die für die Kollagenbindung verantwortlich sind. An dieser Stelle kann der VWF mit dem Kollagen-Typen I und III des perivaskulären Gewebes eine Bindung eingehen, während die A1-Domäne des VWFs der Hauptbindungsort für Kollagen Typ VI der subendothelialen Matrix ist (Cruz et al. 1995). Durch die Bindung an Kollagen mediiert der VWF die Thrombozytenadhäsion an das Subendothel und die daraufhin folgende endgültige Plättchenaggregation (Sadler 1998).

Es sind bereits Studien über heterozygot vorliegende Missensemutationen in der A3-Domäne veröffentlicht worden (Ribba et al. 2001; Riddell et al. 2009). Riddell berichtet über Patienten, die eine unterschiedlich starke Blutungssymptomatik und im Genotyp stark verringerte VWF:CB-Werte bei normalen Multimeren zeigten. Eine reine Störung der Kollagenbindungsaktivität würde nach der aktuellen Klassifikation als Typ 2M bezeichnet werden (Sadler et al. 2006). Allerdings betreffen diese Defekte meist die A1-Domäne und beinhalten auch Störungen der GPIIb-Bindung. Riddell schlägt daher einen neuen Subtyp für Defekte der A3-

Domäne vor, z.B. Typ 2CB, der Kollagenbindungsdefekte bei normalen Multimeren und normaler GPIIb-Bindung beschreiben soll. Bei diesen Patienten findet sich ein normales bis leicht erniedrigtes VWF:Ag und VWF:RCo.

In der hier durchgeführten Expression zeigte sich das VWF:Ag und die GPIIb-Bindung deutlich verringert. Im Verhältnis zeigte sich die VWF:CB sehr stark herabgesetzt, die Ratio VWF:CB/VWF:Ag beträgt nur 0,2. Im Zellkulturmedium lassen sich alle Multimere nachweisen. In diesen Parametern ähnelt die Mutation p.K1794E den von Riddell beschriebenen Mutationen.

Allerdings erklären diese Ergebnisse den Phänotyp des indischen Patienten, bei dem die Mutation gefunden wurde, nicht befriedigend. Bei ihm sind in vivo stark reduzierte VWF:Ag- und VWF:RCo-Konzentrationen gemessen worden (Gupta et al. 2008b). Ergebnisse zu einer Multimeranalyse in vivo liegen leider nicht vor. Es ist also davon auszugehen, dass eine bisher nicht identifizierte Mutation vorliegt, die den Phänotyp des Patientien bedingt.

- Mutation der CK-Domäne: p.G2752D

Mutationen der CK-Domäne, vor allem Cysteinmutationen, bewirken Dimerisierungsdefekte des VWF. Typischerweise findet sich bei diesen Patienten in der Multimeranalyse eine aberrante Anzahl von Multimeren. Dies zeigt sich in zusätzlichen Banden zwischen den einzelnen Triplets (Gupta et al. 2008). Dieses Bild fand sich auch in der Multimeranalyse der Mutation p.G2752D. Es ist bekannt, dass es trotz gestörter Dimerisierung zur weiteren Multimerisierung am aminoterminalen Ende des VWFs kommen kann (Schneppenheim et al. 2001). Ist also die Dimerisierung gestört, können Multimere bestehend aus einer ungeraden Anzahl von Monomeren entstehen.

Die Nicht-Cysteinmutation bewirkt also für eine Mutation der CK-Domäne typischen Dimerisierungsdefekt. Dagegen führt die ebenfalls in der CK-

Domäne liegende Cysteinmutation p.C2739R wie auch die in anderen Regionen des VWF lokalisierten Cysteinmutationen, zu einem Sekretionsdefekt mit fehlenden Multimeren

### 4.3 Klassifizierung der Defekte

Aufgrund der oben angestellten Überlegungen lassen sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Missensemutationen in vier verschiedene Defekte einteilen.

Einige Mutationen zeigten mehr als einen Pathomechanismus und werden daher auch mehrfach genannt. Es zeigte sich, dass der Effekt von Nicht-Cysteinmutationen einen Zusammenhang mit der Domäne zeigt, in der die Mutation zu finden ist. Cysteinmutationen führen dagegen völlig unabhängig ihrer Lokalisation zu einem Multimerisierungsdefekt.

#### 1. *Sekretionsdefekte durch gestörten intrazellulären Transport und erhöhte intrazellulärer Retention*

Hierunter fallen die Missensemutationen der D1- und D2-Domäne des Propeptids p.V86E, p.L129R, p.G163V, p.Y271H, p.N318K, p.W377C und p.G525E, die Mutation p.W1120S der D3-Domäne und die Mutation p.K1794E. Mit insgesamt 9/19 ist dies der zweithäufigste Pathomechanismus der hier untersuchten Mutationen.

#### 2. *Funktionelle Störungen, hier der Kollagenbindung*

Die Mutation p.K1794E zeigte unter anderem einen Defekt der Kollagenbindung. Dies entspricht ihrer Lokalisation in der A3-Domäne.

### 3. *Polymerisierungsdefekte*

#### a) Dimerisierungsdefekte

Die in der CK-Domäne nachgewiesene Mutation p.G2752D führt zu einem Dimerisierungsdefekt.

#### b) Multimerisierungsdefekte

Die Mutationen der D1- und D2-Domäne des Propeptids außer der Missensemutation p.N318K sowie die Mutation p.W1120S der D3-Domäne führen aufgrund ihrer Lokalisation zusätzlich zu dem oben angeführten Sekretionsdefekt zu einer Multimerisierungsstörung. Zudem führten alle in dieser Arbeit untersuchten Cysteinmutationen (p.C2304Y, p.C2431Y, p.C2533R, p.C2739R) zu Multimerisierungsstörungen, völlig unabhängig ihrer Lokalisation. Mit insgesamt 11 Missensemutation, die diese Art von Defekt bedingen, ist der Multimerisierungsdefekt der in dieser Arbeit am häufigsten zu beobachtende Pathomechanismus.

### 4. *Nicht klassifizierbar*

Hierunter fallen die Missensemutationen, bei denen kein Effekt auf den mutanten VWF nachgewiesen werden konnte. Sie sind derzeit nicht klassifizierbar, da nicht auszuschließen ist, dass diese Mutationen z.B. nur in vivo einen Effekt zeigen. Desweiteren könnte es sich um Sequenzvarianten handeln. Nicht weiter klassifizierbar sind in der vorliegenden Arbeit die 5 Missensemutation p.G360S, p.I1380V, p.N1435S, p.F2267I, p.T2647M.

### **5 Zusammenfassung und Ausblick**

Das von Willebrand-Jürgens-Syndrom (VWS) beruht auf einer Störung der Thrombozyten-vermittelten Hämostase mit dem gemeinsamen Merkmal einer vererbten quantitativen oder qualitativen Abweichung des von-Willebrand-Faktors (VWF). Die mit einer Prävalenz von ca. 1:500.000 in Deutschland am seltensten auftretende Form des VWS ist der klinisch am schwersten verlaufende Typ 3, der autosomal-rezessiv vererbt wird. Der VWF ist nicht mehr nachweisbar oder stark verringert, so dass die betroffenen Patienten die im Vergleich schwersten Symptome aufweisen, über vermehrtes Nasenbluten bis hin zu intrazerebralen Blutungen. Die betroffenen Patienten haben homozygote oder compound-heterozygote Mutationen des VWF-Gens, die in der molekulargenetischen Diagnostik nachgewiesen werden können.

In dieser Arbeit wurden 19 Missensemutationen, die bei 18 Patienten mit klinischer Diagnose eines VWS Typ 3 gefunden worden sind, auf ihre Kausalität überprüft. Gleichzeitig sollte damit der molekulare Pathomechanismus identifiziert werden. Dazu wurden die Missensemutationen mit dem Prädiktionsprogramm Polyphen auf ihre mögliche Pathogenität überprüft und in vitro-Expressionen der jeweiligen Mutationen durchgeführt.

Die Mutationen wurden durch transiente cDNA-Transfektion in HEK-293 Zellen eingebracht. Anschließend wurden im Medium und Lysat der transfizierten Zellen mittels Immunoassayverfahren quantitative und funktionelle Untersuchungen des VWF durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Multimeranalyse durchgeführt, um qualitative Veränderungen des VWF zu detektieren.

Die Einstufung der Mutationen hinsichtlich ihrer Pathogenität durch das Polyphen-Prädiktionsprogramms konnte in 16 von 19 Fällen bestätigt werden. Durch die Ergebnisse der Expression konnten 11 Mutationen als sehr wahrscheinlich verantwortlich für die Symptome der Patienten gemacht werden, drei als nur bedingt verantwortlich und fünf Mutationen als wahrscheinlich nicht

verantwortlich. Als Pathomechanismen wurden Multimerisierungs- und Dimerisierungsstörungen, Sekretionsdefekte mit intrazellulärer Retention sowie Kollagenbindungsdefekte identifiziert. Dabei ließ sich feststellen, dass die hier untersuchten Cysteinmutationen unabhängig ihrer Lokalisation zu einer Multimerisierungsstörung führen, während andere Mutationen Defekte verursachen, die abhängig sind von der Domäne, in der sie nachgewiesen worden sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Pathogenität der einzelnen Mutationen sowohl von ihrer Lokalisation im VWF-Gen als auch von der Art der Mutation abhängig ist.

Im Hinblick auf die verbesserte molekulargenetische Diagnostik konnten in den letzten Jahren immer mehr Mutationen nachgewiesen werden, die für die Symptomatik der Patienten verantwortlich sein könnten. Durch die Entwicklung von Prädiktionsprogrammen wie dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Algorithmus PolyPhen können diese Mutationen hinsichtlich ihrer Pathogenität eingestuft werden. Die Kausalität der Mutationen hinsichtlich der Symptomatik des einzelnen Patienten ist nur durch Expressionsstudien zu beweisen oder einzugrenzen. Diese Diskrepanz zwischen berechneter Einstufung und Ergebnissen der Expressionsstudie konnte aufgezeigt werden. Außerdem wurde deutlich gemacht, dass sich die Ergebnisse der in vitro-Studie nicht in allen Fällen auf die in vivo-Symptomatik der Patienten übertragen lässt. Mögliche Gründe dafür, wie etwa eine erhöhte Clearance des VWF im Blutplasma, wurden ebenfalls dargestellt.

Durch diese Arbeit lassen sich also die hier untersuchten Missensemutationen hinsichtlich ihrer Kausalität und ihres Pathomechanismus genauer einschätzen. Dies kann ein Beitrag zur Diagnose, Behandlung und damit zum Wohlergehen von Patienten sein, bei denen diese Mutationen in der molekulargenetischen Untersuchung nachgewiesen worden sind.

## Abkürzungsverzeichnis

---

### 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
ADAMTS13	A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin 1 like elements 13
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Aminosäure
Bp	Basepairs (Basenpaare)
CB	Collagen Binding
cDNA	Complementary DNA
CK-Domäne	Cystein Knot like Domäne
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (ADH-Analogon)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBNA	Epstein-Barr Virus nuclear antigen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII
GpIb	Glykoprotein Ib (Rezeptor der Thrombozytenoberfläche)
GpIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa (Rezeptor der Thrombozytenoberfläche)
HEK	Human embryonic Kidney
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
INR	International Normalized Ratio
Kb	Kilobase
mRNA	Messenger RNA
PBS	phosphate buffered saline

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

---

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PFA 100	Platelet Function Analyzer
Rcf	Relative centrifugal force
RIPA	Ristocetin-induzierte Plättchenagglutination
Rpm	Rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulphate
VWF	von Willebrand-Faktor
VWFpp	Propeptid des von Willebrandfaktors
VWS	Von Willebrand-Syndrom
VWF:Ag	VWF-Antigen
VWF:CB	Kollagen-Bindungsaktivität des VWF
VWF:Gplb	GPIb-Bindungsaktivität des VWF
VWF:RCo	Ristocetin-Cofaktor-Aktivität des VWF
VWF:FVIII	Gerinnungsfaktor VIII Bindungsaktivität des VWF
wt	Wildtyp

## 7 Literaturverzeichnis

- Alexander, B. & Goldstein, R., 1953. Dual hemostatic defect in pseudohemophilia. *J Clin Invest*, (32), pp.351-361.
- Bonthron, D.T. et al., 1986. Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature*, 324(6094), pp.270-273.
- Bowie, E.J. et al., 1986. Transplantation of normal bone marrow into a pig with severe von Willebrand's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 78(1), pp.26-30.
- Budde, U & Schneppenheim, R, 2001. Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 5(4), pp.335-368; quiz following 431.
- Casaña, P. et al., 2000. Q1311X: a novel nonsense mutation of putative ancient origin in the von Willebrand factor gene. *British Journal of Haematology*, 111(2), pp.552-555.
- Castaman, Giancarlo et al., 2003. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica*, 88(1), pp.94-108.
- Cruz, M.A. et al., 1995. Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF a domain polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(18), pp.10822-10827.
- Dent, J.A. et al., 1990. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), pp.6306-6310.
- Eikenboom, J. et al., 2009. Expression of 14 von Willebrand factor mutations identified in patients with type 1 von Willebrand disease from the MCMDM-1VWD study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 7(8), pp.1304-1312.
- Eikenboom, J.C., 2001. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 14(2), pp.365-379.
- Eikenboom, J.C. et al., 1993. Recessive inheritance of von Willebrand's disease type I. *Lancet*, 341(8851), pp.982-986.
- Favaloro, E.J., 2010. Genetic testing for von Willebrand disease: the case against. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 8(1), pp.6-12.
- Federici, Augusto B., 2008. Prophylaxis of bleeding episodes in patients with von Willebrand's disease. *Blood Transfusion*, 6(s2), p.s26-s32.
- Fischer, B.E. et al., 1996. Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII. *Thrombosis Research*, 84(1), pp.55-66.

## Literaturverzeichnis

---

- Foster, P.A. et al., 1987. A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(18), pp.8443-8446.
- Furlan, M., Robles, R. & Lämmle, B., 1996. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87(10), pp.4223-4234.
- Gadisseur, A. et al., 2009. Laboratory Diagnosis of von Willebrand Disease Type 1/2E (2A Subtype IIE), Type 1 Vicenza and Mild Type 1 Caused by Mutations in D3, D4, B1-B3 and C1-C2 Domains of the von Willebrand Factor Gene. *Acta Haematologica*, 121, pp.128-138.
- Ginsburg, D. et al., 1985. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4706), pp.1401-1406.
- Goodeve, A.C. et al., 2001. A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(5), pp.929-931.
- Gupta, P.K. et al., 2008. Genetic defects in von Willebrand disease type 3 in Indian and Greek patients. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 41(2), pp.219-222.
- Hamilton, K.K. & Sims, P.J., 1987. Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(2), pp.600-608.
- Hassenpflug, W.A. et al., 2006. Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. *Blood*, 107(6), pp.2339-2345.
- Holmberg, L. & Nilsson, I.M., 1985. Von Willebrand disease. *Clinics in Haematology*, 14(2), pp.461-488.
- Howard, M.A. & Firkin, B.G., 1971. Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica*, 26(2), pp.362-369.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. & Nachman, R.L., 1974. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(5), pp.1906-1909.
- Kaufmann, J.E. et al., 2000. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(1), pp.107-116.
- Kehrer, F., 1876. Die Hämophilie beim weiblichen Geschlechte. *Arch Gynäkol*, (10), pp.14-237.
- Kroner, P. et al., 1996. The defective interaction between von Willebrand factor and factor VIII in a patient with type 1 von Willebrand disease is caused by substitution of Arg19 and His54 in mature von Willebrand factor. *Blood*, 87(3), pp.1013-1021.
-

## Literaturverzeichnis

---

- Kroner, P A et al., 1991. Abnormal binding of factor VIII is linked with the substitution of glutamine for arginine 91 in von Willebrand factor in a variant form of von Willebrand disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(29), pp.19146-19149.
- Lenk, H. et al., 1988. Frequency of different types of von Willebrand's disease in the GDR. *Acta Medica Scandinavica*, 224(3), pp.275-280.
- Lenting, P.J. et al., 2004. An Experimental Model to Study the in Vivo Survival of von Willebrand Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), pp.12102 - 12109.
- Levine, J.D. et al., 1982. Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Blood*, 60(2), pp.531-534.
- Loesberg, C. et al., 1983. The effect of calcium on the secretion of factor VIII-related antigen by cultured human endothelial cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 763(2), pp.160-168.
- Lynch, D.C. et al., 1985. Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell*, 41(1), pp.49-56.
- Mancuso, D.J. et al., 1991. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*, 30(1), pp.253-269.
- Mancuso, D.J. et al., 1989. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(33), pp.19514-19527.
- Marti, T. et al., 1987. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry*, 26(25), pp.8099-8109.
- Mayadas, T.N. & Wagner, D.D., 1992. Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), pp.3531 -3535.
- Mazzucato, M. et al., 1999. Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(5), pp.3033-3041.
- Michiels, J.J. et al., 2009. Laboratory and molecular characteristics of recessive von Willebrand disease type 2C (2A subtype IIC) of variable severity due to homozygous or double heterozygous mutations in the D1 and D2 domains. *Acta Haematologica*, 121(2-3), pp.111-118.
- Nichols, W.L. et al., 2008. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(2), pp.171-232.
- Nilsson, I.M., Blomback, M. & von Francken, I., 1957. On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. *Acta Medica Scandinavica*, 159(1), pp.35-57.
- Peake, I.R. & Goodeve, A.C., 2010. Genetic testing for von Willebrand disease: the case for. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 8(1), pp.13-16.
-

## Literaturverzeichnis

---

- Ramensky, V., Bork, P. & Sunyaev, S., 2002. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*, 30(17), pp.3894-3900.
- Ribba, A.S. et al., 2001. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(3), pp.848-854.
- Ribes, J.A., Francis, C.W. & Wagner, D.D., 1987. Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(1), pp.117-123.
- Riddell, A.F. et al., 2009. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood*, 114, pp.3489-3496.
- Rodeghiero, F, Castaman, G & Dini, E., 1987. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*, 69(2), pp.454-459.
- Rosenberg, J.B. et al., 2002. The role of the D1 domain of the von Willebrand factor propeptide in multimerization of VWF. *Blood*, 100(5), pp.1699 -1706.
- Ruggeri, Z M & Ware, J., 1992. The structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, 67(6), pp.594-599.
- Ruggeri, Z M & Ware, J., 1993. von Willebrand factor. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(2), pp.308-316.
- Ruggeri, Zaverio M, 2007. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thrombosis research*, 120(Suppl 1), p.S5-S9.
- Sadler, J.E., 1994. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 71(4), pp.520-525.
- Sadler, J.E., 1998. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry*, 67, pp.395-424.
- Sadler, J.E. et al., 2006. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 4(10), pp.2103-2114.
- Sadler, J.E. et al., 1985. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(19), pp.6394-6398.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5463-5467.
- Schlüter, T. & Bohnensack, R., 1999. Serotonin-induced secretion of von Willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic AMP-signaling systems independent of increased cytoplasmic calcium concentration. *Biochemical Pharmacology*, 57(10), pp.1191-1197.
-

## Literaturverzeichnis

---

- Schneppenheim, R et al., 2001. Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood*, 97(7), pp.2059-2066.
- Schneppenheim, R et al., 1996. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thrombosis and Haemostasis*, 76(4), pp.598-602.
- Schneppenheim, R et al., 2000. Von Willebrand Disease type 2M "Vicenza" in Italian and German patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. *Thrombosis and Haemostasis*, 83(1), pp.136-140.
- Schneppenheim, R, Krey, S., et al., 1994. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Human Genetics*, 94(6), pp.640-652.
- Schneppenheim, Reinhard, 2006. *Von Willebrand-Syndrom und von Willebrand-Faktor: aktuelle Aspekte der Diagnostik und Therapie* 2nd ed., Bremen: Uni-Med.
- Schneppenheim, Reinhard et al., 2009. Response to DDAVP in children with von Willebrand disease type 2. *Hämostaseologie*, 29(2), pp.143-148.
- Schneppenheim, R, & Budde, U, 2011. Von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9: 209–215. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04324.x.
- Shelton-Inloes, B.B., Titani, K. & Sadler, J.E., 1986. cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry*, 25(11), pp.3164-3171.
- Siedlecki, C.A. et al., 1996. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*, 88(8), pp.2939-2950.
- Sporn, L.A. et al., 1985. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(3), pp.1102-1106.
- Sporn, L.A., Marder, V.J. & Wagner, D.D., 1987. von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood*, 69(5), pp.1531-1534.
- Spreafico, M. & Peyvandi, F., 2008. Combined FV and FVIII deficiency. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(6), pp.1201-1208.
- Titani, K. et al., 1986. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*, 25(11), pp.3171-3184.
- Verweij, C.L. et al., 1985. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Research*, 13(13), pp.4699-4717.
- Voorberg, J. et al., 1991. Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. *The Journal of Cell Biology*, 113(1), pp.195-205.
-

## Literaturverzeichnis

---

- Wagner, D.D., Olmsted, J.B. & Marder, V.J., 1982. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(1), pp.355-360.
- Ware, J. et al., 1991. Identification of a point mutation in type IIB von Willebrand disease illustrating the regulation of von Willebrand factor affinity for the platelet membrane glycoprotein Ib-IX receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), pp.2946-2950.
- von Willebrand, E., 1926. Hereditär pseudohemofili. *Finska Läkaresällskapets Handlingar*, 672, pp.7-112.
- von Willebrand, E. & Jürgens, R., 1933. Über ein neues vererbbares Blutungsübel: die konstitutionelle Thrombopathie. *Dtsch Arch Klin Med*, (175), pp.453-483.
- Yurkanis Bruice, P., 2004. Organic Chemistry. In *Organic CHEmistry*. Pearson Education Inc., pp. 960-962.
- Zhang, Z.P. et al., 1992. Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. *American Journal of Human Genetics*, 51(4), pp.850-858.
- Zimmerman, Theodore S., Ratnoff, O.D. & Powell, A.E., 1971. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. *Journal of Clinical Investigation*, 50(1), pp.244-254.

## Anhang

---

### 8 Anhang

#### 8.1 Material

##### Laborgeräte und -materialien

Gerät/Material	Typ	Hersteller
96 well Mikrotiter Platten		
96 well Platten	Multiply-PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophoresekammer	Phero-Stab 500	BioTecFischer, Reiskirchen
ELISA-Lesegerät		
Glaspipetten	356525, 356551, 356543	FalCon, Gräfeling-Locham
Inkubator	VaroCell	Varolab, Giesen
Inkubator		Heraeus, Hanau
Plastikpipetten	Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht
Photometer		Eppendorf, Hamburg
Sequencer	Abi-Prism 310-Genetic-Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler	Trio, T-Gradient 96	Biometra, Göttingen
Reaktionsgefäße		Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	The Imager	Appligene Oncor, Illkirch
Vakuum-Manifold	Vac-Man	Promega, Madison, USA
Vakuum-Pumpe	XX5522050	Millipore, Schwalbach
Vortex	REAX top	Heidolph, Schwalbach
Wasserbad	GFL	Günter Wilke, Hamburg
Zellkulturflaschen		Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge	5417c	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Rotanta	Hettich, Bäch, Schweiz

## Anhang

### Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
GIBCO™ GlutaMAX™-I Supplement	Invitrogen, Carlsbad, USA
Opti-MEM	Invitrogen, Carlsbad, USA

### Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller
1. Antikörper: Rabbit anti human VWF (polyklonal)	A 0082	Dako, Glostrup, Dänemark
2. Antikörper: Goat anti rabbit IgG/HRP	P 0448	Dako, Glostrup, Dänemark
2. Antikörper: Rabbit anti humanVWF/HRP (polyklonal)	P 0226	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti Flag	M2	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua dest.		
Collagen human Type III		
DNA-Standardmarker		
GPIIb $\alpha$ -Fragment		
LB-Agar		Invitrogen, Carlsbad, USA
LE Agarose		Biozym, Hess. Oldenburg
Lipofectamine 2000		Invitrogen, Carlsbad, USA
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli		Invitrogen, Carlsbad, USA
PBS		Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteaseinhibitor complete EDTAfree		F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Schwefelsäure	0,5M	
TMB Substrat	T8665	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau		Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA		Invitrogen, Carlsbad, USA

## Anhang

---

### Kits

QuickChange II Site-Directed MutaGenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
<i>Sequencing kit (Big dye etc)</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden

### Software

Programm	Version	Hersteller
DNAsis	2.6	Hitachi
Excel	2007	Microsoft
Lasergene	8	DNASStar
PED	4.2	H. Plendl
Powerpoint	2007	Microsoft
Word	2007	Microsoft

### Websites

Seite	Adresse
BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
ISTH-SSC VWF Online Database	<a href="http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html">http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html</a>
PolyPhen	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/</a>
PubMed home	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
Splice Site prediction	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>
VWDGuidelines	<a href="http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/3_diagnosisandevaluation.htm">http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/3_diagnosisandevaluation.htm</a>

## Anhang

### Oligonukleotide

Metabion, Martinsried, Deutschland

Exon	Mutation	Sequenz 5'→ 3' 1. sense 2. antisense
4	V86E	1. GGC AAG AGA GTG AGC CTC TCC GAG TAT CTT GGG GAA TTT TTT GAC ATC 2. GAT GTC AAA AAA TTC CCC AAG ATA CTC GGA GAG GCT CAC TCT CTT GCC
5	L129R	1. CTG AGG CTG GGT ACT ACA AGC <b>GGT</b> CCG GTG AGG CCT ATG GCT TTG 2. CAA AGC CAT AGG CCT CAC CGG <b>ACC</b> GCT TGT AGT ACC CAG CCT CAG
5	G163V	1. CAA CAA GAC CTG CGG GCT GTG TGT CAA CTT TAA CAT CTT TGC TGA AG 2. CTT CAG CAA AGA TGT TAA AGT TGA CAC ACA GCC CGC AGG TCT TGT TG
7	Y271H	1. CCT GCC CTG CCC TCC TGG AGC <b>ACG</b> CCC GGA CCT GTG CCC AGG 2. CCT GGG CAC AGG TCC GGG CGT <b>GCT</b> CCA GGA GGG CAG GGC AGG
8	N318K	1. GAC CTG CCA GAG CCT GCA CAT CAA AGA AAT GTG TCA GGA GCG ATG C 2. GCA TCG CTC CTG ACA CAT TTC TTT GAT GTG CAG GCT CTG GCA GGT C
9	G360S	1. CCG GAA AGC GCT ACC CTC CCA GCA CCT CCC TCT CTC GAG ACT GC 2. GCA GTC TCG AGA GAG GGA GGT GCT GGG AGG GTA GCG CTT TCC GG
10	W377C	1. GCA TTT GCC GAA ACA GCC AGT <b>GTA</b> TCT GCA GCA ATG AAG AAT GTC CA 2. TGG ACA TTC TTC ATT GCT GCA GAT <b>ACA</b> CTG GCT GTT TCG GCA AAT GC
14	G525E	1. GGG AAG ACC TGC GGC CTG TGT <b>GAG</b> AAT TAC AAT GGC AAC CAG GGC 2. GCC CTG GTT GCC ATT GTA ATT CTC ACA CAG GCC GCA GGT CTT CCC
25	W1120S	1. CAG CAT GGC AAG GTG GTG ACC <b>TCG</b> AGG ACG GCC ACA TTG TGC CC 2. GGG CAC AAT GTG GCC GTC CTC <b>GAG</b> GTC ACC ACC TTG CCA TGC TG
28	I1380V	1. GAC CGC CCT GAA GCC TCC CGC GTC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC 2. GCT GGC CAT CAG GAG CAG GGC GAC GCG GGA GGC TTC AGG GCG GTC
28	N1435S	1. CAT CGA GAA GCA GGC CCC TGA GAG CAA GGC CTT CGT GCT GAG CAG 2. CTG CTC AGC ACG AAG GCC TTG CTC TCA GGG GCC TGC TTC TCG ATG
31	K1794E	1. GTG CCA GGC CGG GAG CCT <b>CAG</b> AGG CGG TGG TCA TCC TGG TC 2. GAC CAG GAT GAC CAC CGC <b>CTC</b> TGAG GCT CCC GGC CTG GCA C
39	F2267I	1. GAG GAT GGA GTC CAG CAC CAG <b>ATC</b> CTG GAA GCC TGG GTC CCG 2. CGG GAC CCA GGC TTC CAG GAT CTG GTG CTG GAC TCC ATC CTC
40	C2304Y	1. CCC ACG GCC AAA GCT CCC ACG <b>TAT</b> GGC CTG TGT GAA GTA GCC CG 2. CGG GCT ACT TCA CAC AGG CCA <b>TAC</b> GTG GGA GCT TTG GCC GTG GG

## Anhang

43	C2431Y	1. CAC CTG CCT TCC CGA CAA GGT GTA TGT CCA CCG AAG CAC CAT CTA C 2. GTA GAT GGT GCT TCG GTG GAC ATA CAC CTT GTC GGG AAG GCA GGT G
45	C2533R	1. CCC TGC CTC ATC AAT GAG CGT GTC CGA GTG AAG GAG GAG GTC 2. GAC CTC CTC CTT CAC TCG GAC ACG CTC ATT GAT GAG GCA GGG
48	T2647M	1. GTT GTG GGA GAT GTT TGC CTA TGG CTT GCA CCA TTC AGC TAA GAG G 2. CCT CTT AGC TGA ATG GTG CAA GCC ATA GGC AAA CAT CTC CCA CAA C
51	C2739R	1. CAG TAT GTC AAG GTG GGA AGC CGT AAG TCT GAA GTA GAG GTG GAT ATC 2. GAT ATC CAC CTC TAC TTC AGA CTT ACG GCT TCC CAC CTT GAC ATA CTG
52	G2752D	1. GTG GAT ATC CAC TAC TGC CAG GAC AAA TGT GCC AGC AAA GCC ATG 2. CAT GGC TTT GCT GGC ACA TTT GTC CTG GCA GTA GTG GAT ATC CAC

## 8.2 Rezepte, Ansätze und Programme

### Rezepte

#### Agarosegel

LE Agarose	3 g	Biozym, Hess. Oldenburg
1fach TAE-Puffer 1:50	297 ml	
Ethidiumbromid	30 µl	

#### Gel loading buffer III

Bromphenolblau	0,25%	
Xylenecynat	0,25%	
Glycerin in Aqua bidest.	30%	

### Immunoassayverfahren

#### VWF:Ag Coating Buffer

DiNatriumcarbonat	0,53g	
Natriumhydrogencarbonat	0,42g	
Natriumacid	0,05g	
Aqua bidest	100ml	

auf pH 9,6 einstellen.

#### CBA Coating Buffer Wash Buffer

H <sup>2</sup> O	880 ml	
10fach PBS	100 ml	
PBS+5% PSA	20 ml	

#### Wash Buffer

100% Essigsäure	1ml	
0,9% NaCl	166ml	

### VWF Multimer-Analyse

#### Proben-Puffer (10-fach) pH 8

Trizma Base	0,1 M	Merck, Darmstadt
Di-Natrium EDTA	1 mM ad 100ml	Merck, Darmstadt
SDS (vor Gebrauch)	2% (w/v)	BioRad, Hercules, USA
Bromphenolblau	0,01%	Sigma, St. Louis, USA

## Anhang

---

### Sammelgelpuffer pH 6,8

Trizma Base	0,125 M ad 500ml A. dest.	Merck, Darmstadt
-------------	---------------------------	------------------

### Sammelgel

HGT (P) – Agarose	0,8% in Sammelgelpuffer	FMC, Philadelphia, USA
SDS	0,1%	BioRad, Hercules, USA

### Trenngelpuffer pH 8,8

Trizma Base	0,375 M ad 600ml A. dest.	Merck, Darmstadt
-------------	---------------------------	------------------

### Trenngel

LGT-Agarose Typ V II	1,6% in Trenngelpuffer	Sigma, St.Louis, USA
SDS	0,1%	BioRad, Hercules, USA

### Elektrodenpuffer pH 8,35

Trizma Base	0,05 M	Merck, Darmstadt
Glyzin	0,384 M ad 3 l pH 8,35	Merck, Darmstadt
SDS (vor Gebrauch)	0,1% (w/v)	BioRad, Hercules, USA

### Jodphenol-Lösung

4-Jodphenol	0,045 M	Aldrich, St.Louis, USA
DMSO	5 ml	Sigma, St. Louis, USA

### Luminol-Lösung pH 7,8

Luminol	0,226 M	Sigma, St.Louis, USA
DMSO	5 ml	Sigma, St.Louis, USA

200 mg Luminol in 5 ml DMSO lösen. In 500 ml TBS pH 8,3 aufnehmen. Vor Gebrauch 10 ml Luminollösung mit 100 µl 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 200 µl Jodphenol-Lösung versetzen.

## Ansätze

### Mutagenese

5 µl	10fach Pfu Puffer
1 µl	dNTP mix
1,25 µl	Oligonukleotidprimer (sense)
1,25 µl	Oligonukleotidprimer (antisense)
1 µl	Wildtyp VWF Plasmid cDNA
Ad 39,5 µl	Aqua bidest.

Anschließend wurde 1µl TurboPfu HF DNA Polymerase (2,5U/µl) zugesetzt.

## Anhang

---

### Sequenzierung

1,5 µl	jeweiliger Primer 1:10 für bestimmte Genregion
3 µl	cDNA Plasmidpräparation
3 µl	5x Sequencing Buffer
1 µl	Sequencing RR-100 Big Dye
ad 11,5 µl	Aqua bidest

### Schemata zur Thermocyclerprogrammierung

#### Mutagenese

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95 °C	5 Minuten
23	95°C	30 Sekunden
	55°C	1 Minute
	68°C	28 Minuten (1min/kb Plasmid)
	8°C	Pause

#### Sequenzierung zur Kontrolle der Mutagenese

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95 °C	5 Minuten
60	95 °C	30 Sekunden
	55 °C	30 Sekunden
	60 °C	4 Minuten

#### Sequenzierung

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95 °C	5 Minuten
70	95 °C	30 Sekunden
	55 °C	30 Sekunden
	60 °C	4 Minuten
	8 °C	Pause

### 8.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Blutersippe von den Åland-Inseln.....	1
Abbildung 2: Struktur-Funktionsbeziehungen der Domänen des VWF. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Schneppenheim. ....	5
Abbildung 3: Prozentuale Verteilung der VWS-Typen. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Budde.....	9
Abbildung 4: Lokalisationen der Mutationen beim schweren VWS Typ 3.....	11
Abbildung 5: Spektrum der Blutungssymptomatik beim VWS Typ 3. ....	12
Abbildung 6: Schema zur ortsspezifischen Mutagenese .....	21
Abbildung 7: Klonbildung eines E. coli-Stamms .....	22
Abbildung 8: Digestion der Plasmidpräparation mit EcoR. ....	24
Abbildung 9: Konzentration des VWF:Ag p.V86E. ....	38
Abbildung 10: Stammbaum der Indexpatientin 02.....	40
Abbildung 11: Multimeranalyse und Konzentrationen Patientin 02. ....	42
Abbildung 12: Konzentration des VWF:Ag p.G163V. ....	44
Abbildung 13: Stammbaum der Familie der Indexpatientinnen 04 und 05. ....	45
Abbildung 14: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.Y271H.....	47
Abbildung 15: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.N318K.....	49
Abbildung 16: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.G360S.....	51
Abbildung 17: Stammbaum der Familie der Indexpatientin 08. ....	52
Abbildung 18: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.W377C. ....	54
Abbildung 19: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.W1120S. ....	56
Abbildung 20: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration Patientin 10.....	59
Abbildung 21 Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.K1794E.....	61
Abbildung 22: Multimeranalyse und Diagramm p.C2304Y und p.T2647M. ....	64
Abbildung 23: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.C2431Y.....	66
Abbildung 24: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.C2533R.....	68
Abbildung 25: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.C2739R.....	70
Abbildung 26: Multimeranalyse und Diagramm der Konzentration p.G2752D.....	72

---

## Anhang

---

<i>Abbildung 27: Lokalisation der kausalen Missensemutationen.....</i>	81
<i>Abbildung 28: Lokalisation der Cysteinmutationen. ....</i>	82
<i>Abbildung 29: Lokalisation der Nicht-Cysteinmutationen .....</i>	84
<i>Abbildung 30: Lokalisation der Mutationen ohne Effekt auf VWF .....</i>	78

### Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Blutungssymptome in % bei Patienten mit VWS.....</i>	10
<i>Tabelle 2: Charakteristische Befundkonstellationen der Typen des VWS.....</i>	13
<i>Tabelle 4: Funktionelle Parameter der Mutation p.V86E . ....</i>	38
<i>Tabelle 5: Ergebnisse der Diagnostik der Familie der Patientin 02. ....</i>	39
<i>Tabelle 6: Funktionelle Parameter der Mutationen bei Pat. 03.....</i>	42
<i>Tabelle 7: Funktionelle Parameter der Mutation p.G163V. ....</i>	44
<i>Tabelle 8: Ergebnisse der Diagnostik der Familie der Patientinnen 04 und 05. ....</i>	46
<i>Tabelle 9: Funktionelle Parameter der Mutation p.Y271H .....</i>	47
<i>Tabelle 10: Funktionelle Parameter der Mutation p.N318K .....</i>	49
<i>Tabelle 11: Funktionelle Parameter der Mutation p.G360S. ....</i>	51
<i>Tabelle 12: Ergebnisse der Diagnostik der Familie der Patientin 08. ....</i>	53
<i>Tabelle 13: Funktionelle Parameter der Mutation p.W377C .....</i>	54
<i>Tabelle 14: Funktionelle Parameter der Mutation p.W1120S. ....</i>	56
<i>Tabelle 15: Funktionelle Parameter der Mutationen der Patientin 10.....</i>	59
<i>Tabelle 16: Funktionelle Parameter der Mutation p.K1794E .....</i>	61
<i>Tabelle 17: Funktionelle Parameter der Mutationen p.C2304Y und p.T2647M ...</i>	64
<i>Tabelle 18: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2431Y .....</i>	66
<i>Tabelle 19: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2533R .....</i>	68
<i>Tabelle 20: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2739R .....</i>	70
<i>Tabelle 21: Funktionelle Parameter der Mutation p.C2752D .....</i>	72

### 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim für die Vergabe des interessanten Themas und die kontinuierliche und zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Tobias Obser danke ich für die freundliche Anleitung zur Arbeit im Labor und die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der experimentellen Studien.

Herrn Florian Oyen danke ich für seine Unterstützung und Hilfe, insbesondere bei der Durchführung der Sequenzierungen. Ihnen sowie allen weiteren Mitarbeitern des Labors der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie danke ich für die freundliche Zusammenarbeit während meiner Zeit im Labor.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Budde und seinen Mitarbeitern für die Anleitung zur Durchführung der Multimeranalysen und der damit erforderlichen Betreuung sowie für die Hilfe bei der Recherche zu Patientendaten. In diesem Zusammenhang danke ich besonders Frau Dr. Sonja Schneppenheim für ihre große Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben und mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite standen.

## **10 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....