UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

> Klinikdirektor Herr Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim

Mutationsspektrum des von Willebrand-Syndroms Typ 3 Ergebnisse aus einer einzelnen Institution

Dissertation

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

vorgelegt von:

Matthias Baumeister aus München

Hamburg 2014

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.04.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Florian Langer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
1.1.	Historie	6
1.2.	Epidemiologie	7
1.3.	Der von Willebrand Faktor (VWF): Genetische Grundlage, Struktur, Funktion und Biosynthese	8
1.4.	Klassifikation und Pathophysiologie	10
1.5.	Klinik	12
1.6.	Diagnostik	13
1.7.	Therapie	16
1.8.	Fragestellung	. 17
2.	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	. 18
2.1.	Studiendesign	18
2.2.	Patienten	19
2.	2.1. Patienten DNA	.19
2.	2.2. Klinische Datenerhebung	19
2.3.	Material	20
2.	3.1. DNA Extraktion	22
2.	3.2. DNA Arbeitslösung	22
2.	3.3. Primer	.23
2.4.	Methoden	.24
2.	4.1. PCR	.24
2.	4.2. Agarose-Gelelektrophorese	.24
2.	4.3. DNA – Sequenzierung	. 25
2.	4.4. Klonierung	. 26
2.	4.5. 253-kb Deletion Analyse	. 27
2.	4.6. MLPA	. 29

2.5.	Auswertung	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Nomenklatur	31
3.1.	.1. Nomenklatur auf DNA Ebene	31
3.1	.2. Nomenklatur auf Aminosäure- / Kodon- Ebene	
3.2.	Ergebnisse: Übersicht und Mutationsverteilung	33
3.3.	Ergebnisse der Indexpatienten	35
4.	Diskussion	74
4.1.	Kleine Deletionen	75
4.2.	Duplikationen	77
4.3.	Insertionen	
4.4.	Nonsense Mutationen	
4.5.	Missense Mutationen	80
4.6.	Große Deletionen	87
4.7.	Splice Site Mutationen	89
4.8.	Unvollständige molekulargenetische Befunde	
4.9.	Strategisches Vorgehen: Molekulargenetische Diagnostik des VWS Typ 3	93
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis	
7.	Anhang	106
7.1.	Abbildungsverzeichnis	106
7.2.	Tabellenverzeichnis	108
7.3.	Abkürzungsverzeichnis	109
7.4.	Material- und Geräteliste	110
7.5.	Primerliste	111
7.6.	Rezepte	113
7.7.	PCR- und Sequenzierprogramme	115

9.	Lebenslauf	. 125
8.	Danksagung	. 124
79	MI PA Report für die Indexpatienten E13/II/1_E22/II/1 und E31/II/1	118
7.8.	Elektronische Hilfsmittel	. 117

1. Einleitung

1.1. Historie

Die Geschichte des von Willebrand Syndroms (VWS) lässt sich auf die Beobachtungen des finnischen Internisten Erik Adolf von Willebrand zurückführen, der am Deaconess Institut in Helsinki arbeitete und dort die Klinik für Innere Medizin leitete (Berntorp, 2007). Von Willebrand beschrieb 1926 erstmals eine Blutungsstörung, die er bei Patienten auf der Insel Föglö (Åland Archipel) beobachtet hatte. Bei der betroffenen Familie waren 4 Mädchen in jungen Jahren bereits an unkontrollierbaren Blutungen verstorben und die in Helsinki vorgestellte 5-jährige Patientin litt an ausgeprägten Schleimhautblutungen, vor allem aus Nase und Mund. Anders als bei der Hämophilie waren bei mehreren Familienmitgliedern weniger Muskel- und Gelenkblutungen, sondern Epistaxis, orale- und intestinale Blutungen sowie Hypermenorrhö und ausgeprägte Nachgeburtsblutungen beobachtet worden. Diese Form der Hämophilie, die beide Geschlechter betraf und als Hauptcharakteristikum eine verlängerte Blutungszeit besaß, nannte er hereditäre Pseudohämophilie (von Willebrand, 1926). Aufgrund gemeinsamer Publikationen zwischen von Willebrand und dem Leipziger Hämatologen Rudolph Jürgens wurde die Krankheit auch von Willebrand-Jürgens-Syndrom genannt (von Willebrand und Jürgens, 1933). 1953 beschrieben Alexander und Goldstein einen Zusammenhang zwischen verlängerter Blutungszeit und verminderter Faktor VIII Aktivität bei Patienten mit von Willebrand Syndrom (Alexander und Goldstein, 1953). Untersuchungen einer schwedischen Arbeitsgruppe um Inga Marie Nilsson kamen zu dem Schluss, dass der Mangel eines bisher unbekannten Plasmafaktors für die Klinik und laborchemischen Ergebnisse des von Willebrand Syndroms verantwortlich sei (Nilsson et al, 1957). Sie nannten ihn " the bleeding time correcting factor" und die Untersuchungen mit Cohn-Fraktionen I-0 war gleichzeitig die erste spezifische Substitutionstherapie für Patienten mit von Willebrand Syndrom (Nilsson, 1999). Immunologische Untersuchungen verdeutlichten einen Zusammenhang zwischen Faktor VIII (AHF, antihemophilic factor) und dem heute als von Willebrand Faktor bekannten Plasmaproteins (Zimmerman et al., 1971). Hierbei wurde nachgewiesen, dass es sich um zwei unterschiedliche Plasmaproteine handelt, die allerdings miteinander assoziiert sind. Aus diesem Grund wurde der von Willebrand Faktor (VWF) damals als Faktor VIII-related Protein (FVIIIR:Ag) bezeichnet. Mit der Möglichkeit gentechnologischer Untersuchungen gelang es 1985 mehreren Arbeitsgruppen, die kodierende DNA des von Willebrand Faktors zu analysieren, zu klonieren und die chromosomale Lage zu lokalisieren (Ginsburg et al. 1985, Lynch et al. 1985, Sadler et al. 1985, Verweij et al. 1985). Dies ermöglichte die molekulargenetische Diagnostik und bezeichnete einen weiteren Meilenstein in der Geschichte des von Willebrand Syndroms.

Die Familien der Åland Inseln sind ebenfalls ein Teil dieser Medizingeschichte und wurden wiederholt von Forschungsgruppen besucht. Auch das 1998 in Mariehamn auf den Åland Inseln abgehaltene von Willebrand Syndrom Symposium zeugt von dieser engen Verknüpfung zwischen Forschern und Familien der Åland Inseln (Berntorp et al., 1999).

1.2. Epidemiologie

Das von Willebrand Syndrom ist die häufigste vererbbare Gerinnungsstörung. Die Prävalenz wird mit ~ 1 % (0,8 - 1,3 %) angegeben und basiert unter anderem auf Studien aus Italien und den USA (Rodeghiero et al. 1987, Werner et al. 1993). Hier sei erwähnt, dass eindeutige Prävalenzangaben aufgrund Variablen wie Studiendesign, Zeitpunkt der Manifestation, Laborkonstellationen und klinischer Manifestation nicht sicher zu machen sind. Beispielsweise kann sich ein mildes VWS erst durch postpartale Blutungen oder postoperative Nachblutungen manifestieren und entzieht sich eventuell einer statistischen Erhebung im Kindesalter. Die Anzahl klinisch relevanter Fälle liegt bei etwa 1:1000 bis 1:10.000 pro Einwohner (Castaman et al. 2003, Bowman et al. 2010) und mit ca. 70 % gilt das VWS Typ 1 bisher als der häufigste Typ, gefolgt von 20-30 % VWS Typ 2 (Castaman et al. 2003). Diese Häufigkeitsverteilung muss allerdings revidiert werden, da in Zukunft durch präzisere diagnostische Möglichkeiten das VWS Typ 2 vorraussichtlich einen größeren Anteil erhält und möglicherweise der häufigste Typ wird (Schneppenheim und Budde, 2004b). Das schwere VWS Typ 3 ist dagegen mit einer Prävalenz von 0,1-5,3 auf 1.000.000 Einwohner relativ selten und variiert in der Häufigkeit zwischen Ländern und Kontinenten (Eikenboom 2001). Es folgt einem autosomal rezessiven Erbgang und betrifft das weibliche und männliche Geschlecht gleichermaßen (Mannucci et al. 1984).

Der von Willebrand Faktor (VWF): Genetische Grundlage, Struktur, Funktion und Biosynthese

Das VWF-Gen wurde 1985 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p13.3 nach NCBI Map Viewer) lokalisiert (Ginsburg et al. 1985, Verweij et al. 1985) und ist 1989 von Mancuso in Struktur und Größe beschrieben worden. Es besteht aus ca. 178 Kilobasen und 52 Exons, von denen 51 kodierend sind (Mancuso et al. 1989). Die Länge der einzelnen Exons ist mit 40 Basenpaaren (Exon 50) bis zu 1379 Basenpaaren (Exon 28) sehr variabel. Der Großteil des VWF-Gens besteht aus vier repetitiven und untereinander homologen Regionen, die im Präkursor-Protein als Domänen D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 angeordnet sind (Verweij et al. 1986) (siehe Abbildung 1). Diese Abfolge ist vermutlich während der Evolution durch Duplikation und Exon Shuffling entstanden (Gilbert 1878, Schneppenheim 2004a).



Abbildung 1: Struktur des VWF mit strukturellen und funktionellen Domänen. Lokalisation der Interaktion zwischen VWF (A1,RGD) und Thrombozyten (Gplb, GpIIb/IIIa) und Bindungsstelle für FVIII, Heparin und Kollagen;

Ansatzpunkte für Dimerisierung, Multimerisierung und enzymatische Spaltung des VWF (Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Schneppenheim)

Zusätzlich zum VWF-Gen auf Chromosom 12 existiert ein Pseudogen auf Chromosom 22 (22p12-pter), dass eine Länge von 21 Kilobasen aufweist und zu 97 % homolog zu dem eigentlichen Gen ist (Mancuso et al. 1991). Die Kenntnis der Homologie der enthaltenen Exons 23 bis 34 ist von Bedeutung für die Auswahl und das Design der Primer für diese Exons (siehe auch 2.3.3).

Der von Willebrand Faktor selbst ist ein Glykoprotein, dessen Kenntnis über Struktur und Zusammensetzung auf die Arbeiten von Wagner und Mayadas zurückzuführen ist (Wagner 1980, Mayadas und Wagner 1992). Er wird in Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet und aus identischen VWF-Untereinheiten zu Dimeren und Multimeren zusammengesetzt. Jede Untereinheit besteht aus 2813 Aminosäuren, wobei 22 Aminosäuren das Signalpeptid und 741 Aminosäuren das Propeptid darstellen (Castaman et al. 2003). Die Dimerisierung erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Disulfidbrückenbildung in der CK (cysteine knot) Domäne am C-terminalen Ende der VWF-Monomere. Neben Glykosylierung im ER und Golgi Apparat werden die Dimere ebenfalls im Golgi Apparat zu Multimeren über Disulfidbrücken in der D3 Domäne am jeweils N-terminalen Ende der Dimere verbunden. Bei einem Molekülgewicht von ~ 250 kDa (Kilo Dalton) pro Untereinheit erreichen die Dimere bzw. Multimere somit ein Molekülgewicht von 500 bis 20.000 kDa (Castaman et al. 2003).

Der von Willebrand Faktor wird zum einen regelmäßig in das Plasma freigesetzt, ansonsten in Weibel-Palade Bodies der Endothelzellen oder α -Granula der Thrombozyten gespeichert (Wagner 1990) und bei passenden Signalen (z.B. Thrombin, Plasmin) in größeren Mengen freigesetzt. Im Plasma exponieren größere Multimere bei höheren Scherkräften die proteolytische Stelle ziwschen den Aminosäuren Tyrosin 1605 und Methionin 1606 der A2 Domäne. Durch die Metalloprotease ADAMTS-13 werden an dieser Stelle die Multimere gespalten und ein Spektrum an kleineren Multimeren und Spaltprodukten wird gebildet. Zusammen mit weiteren Abbauprozessen besteht so ein Gleichgewicht aus Bildung und Abbau des VWF im Gesunden (Sadler et al. 2006).

Neben den erwähnten Domänen für Disulfidbrücken und enzymatischen Ansatzpunkten sind weitere Regionen essenziell für die Funktionalität des VWF.

9

Der VWF spielt sowohl eine Rolle in der primären, als auch in der sekundären Hämostase. In der primären Hämostase ist er beteiligt an der Adhäsion zwischen Thrombozyten und subendothelialen Kollagenfasern sowie der ermöglicht Thrombozytenaggregation untereinander und SO eine Thrombusbildung trotz hoher Scherkräfte im arteriellen Gefäßbett (Weiss et al. 1989). Dies erfolgt durch die Interaktion zwischen der A1 Domäne und Glykoprotein I b (Gplb) auf der Thrombozytenmembran, zwischen der RGD Sequenz in der Domäne C1 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ /GpIIbIIIa auf der Thrombozytenmembran sowie zwischen den Domänen A1 / A3 und den Kollagenfasern im subendothelialen Bindegewebe (Sadler et al. 2006). An der sekundären Hämostase ist der VWF indirekt beteiligt. Er bindet über die

D' Domäne und Teile der D3 Domäne den Gerinnungsfaktor FVIII und verhindert durch diesen stabilisierenden und protektiven Effekt einen übermäßigen proteolytischen Abbau des Faktors VIII (Castaman et al. 2003).

1.4. Klassifikation und Pathophysiologie

Das VWS ist ein heterogenes Krankheitsbild, das sich in unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen und einer differenzierten Klassifikation widerspiegelt. Diese Heterogenität basiert auf den multifunktionellen Eigenschaften des VWF (siehe 1.3) und dadurch mehreren möglichen Fehlerquellen, die zu einem VWS führen können. Außerdem können Defekte während der Biosynthese, Transport, Sekretion oder Abbau des VWF auftreten. So verursacht z.B. eine Störung bei der Dimerisierung/Multimerisierung oder eine verminderte ADAMTS13-Resistenz, also erhöhte Empfindlichkeit für eine proteolytische Spaltung durch ADAMTS13, ebenfalls ein VWS (Schneppenheim 2004a). Gelegentlich liegen auch mehrere dieser pathophysiologischen Mechanismen der Krankheit zu Grunde und sind nicht eindeutig voneinander zu unterscheiden. Je nach Art und Lokalisation des Defekts kann die primäre oder sekundäre Hämostase beeinträchtigt sein oder eine Störung in beiden Gerinnungsphasen vorliegen. Entsprechend variabel ist auch das klinische Erscheinungsbild.

Eine erste Einteilung des VWS wurde 1987 von Ruggeri und Zimmerman vorgenommen (Ruggeri und Zimmerman 1987). Einige der beschriebenen

10

Subtypen wurden in der Überarbeitung von Sadler 1994 übernommen und sind in einer Revision von 2006 bis heute gültig (Sadler 2006). Neue Erkenntnisse, unter anderem durch molekulargenetische und biochemische Untersuchungen, wurden in Aktualisierungen berücksichtigt, machen aber eine Neubewertung und Modifikation der Klassifikation auch in Zukunft notwendig.

Das von Willebrand Syndrom wird in quantitative und qualitative Defekte unterteilt. Zu den quantitativen Defekten zählt das VWS Typ 1 und Typ 3. Das VWS Typ 1 ist charakterisiert durch eine verminderte Konzentration des VWF bei normaler Struktur und Funktionalität und nicht signifikant verminderte Multimere (Sadler et al. 2006). Dementsprechend mild sind meist die klinischen Symptome bei diesem relativen Mangel und der Vererbungsmodus ist in der Regel autosomal dominant. Bei dem VWS Typ 3 hingegen liegt ein absoluter Mangel an VWF vor und die Konzentration von VWF:Ag ist meistens nicht detektierbar (< 5 IU dL⁻¹). Folglich sind auch die Multimere in der Regel nicht nachweisbar und es liegen meist ausgeprägte klinische Blutungssymptome vor. Der Vererbungsmodus ist autosomal rezessiv und beinhaltet häufig homozygote oder compound heterozygote Nonsense Mutationen oder Mutationen mit Leserasterverschiebung, seltener auch Missense Mutationen, Splice Site Mutationen und größere Deletionen (Sadler et al. 2006).

Das VWS Typ 2 ist durch qualitative Defekte des VWF charakterisiert und wird in die Typen 2A, 2B, 2M und 2N unterteilt. Häufig sind bestimmte Bindungsstellen und damit einzelne Funktionen des VWF betroffen oder die Bildung der Dimere/Multimere ist beeinträchtigt. Vererbt werden die Mutationen des VWS Typ 2 autosomal dominant, mit Ausnahme des Typs 2N und des Phänotyps IIC des Typs 2A, die rezessiv vererbt werden (Schneppenheim 2004a).

Bei dem Typ 2A fehlen die hochmolekularen Multimere völlig oder es besteht ein relativer Mangel, was zu einer Störung der plättchenabhängigen Funktion führt (Schneppenheim und Budde, 2004b). Eine standardisierte und qualitativ hochwertige Multimeranalyse ist deshalb für die Abgrenzung zwischen Typ 2A und Typ 1 sowie zwischen Typ 2A und Typ 2M essenziell. So sind beim Typ 2M die hochmolekularen Multimere nicht vermindert, allerdings ist die Thrombozytenadhäsion trotzdem beeinträchtigt. Hierbei ist in der Regel die Interaktion zwischen VWF und Subendothel oder zwischen VWF und Thrombozyten reduziert, z.B. durch einen Defekt in der Gplb Bindungsdomäne A1 (Meyer et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist die Affinität zwischen VWF und Gplb Bindungsstelle auf Thrombozyten beim Typ 2B erhöht. Diese spontane Aggregation führt zu einer vermehrten Spaltung der größeren Multimere und somit zu einem vermehrten Verbrauch. Ohne größere Multimere ist aber die Thrombozytenadhäsion wiederum beeinträchtigt (Sadler et al. 2006). Dem Typ 2N liegt eine Störung der Interaktion zwischen dem VWF und Faktor VIII zugrunde und somit in der Regel ein Defekt in der Faktor VIII Bindungsdomäne (D' Domäne und Teile der D3 Domäne). Die Bindungsaffinität ist vermindert und der Faktor VIII wird vermehrt abgebaut, was zu dem charakteristischen phänotypischen Erscheinungsbild führt (siehe Klinik 1.5).

Neben den beschriebenen angeborenen Formen des VWS existiert auch eine erworbene Form des VWS, die meistens mit einer weiteren Grunderkrankung vergesellschaftet ist. Der VWF liegt primär in normaler Struktur und Konzentration vor und wird in der Regel erst nach der Sekretion krankhaft verändert. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und werden hier nur exemplarisch erläutert. So führt pathologisch erhöhter Scherstress im Gefäßbett, z.B. durch eine Aortenstenose, zu einer Aktivierung und Verringerung des VWF. Auch Tumorerkrankungen, wie z.B. lympho-/myeloproliferative Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen, können durch Autoantikörper oder Adsorption an malignen Zellen zu einer Abnahme des VWF führen (Budde et al. 2010). Nicht zuletzt können auch Medikamente, wie z.B. Ciprofloxacin oder eine Hypothyreose ein erworbenes VWS verursachen (Michiels et al. 2001).

Im englischen Sprachgebrauch wird zusätzlich bei den Begrifflichkeiten der unterschiedlichen VWS Formen differenziert. So bezeichnet der Begriff "von Willebrand Disease (VWD)" lediglich die hereditäre Form und das erworbene VWS wird zusammen mit der angeborenen Form unter dem Begriff " von Willebrand Syndrom (VWS)" subsummiert.

1.5. Klinik

Wie bereits in 1.3 und 1.4 beschrieben ist das klinische Erscheinungsbild des VWS unterschiedlich ausgeprägt und variiert je nach Typ und zugrunde liegendem Defekt. Die Bandbreite reicht von asymptomatischen Patienten über

milde Blutungssymptomatik bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungen. Die Blutungssymptomatik präsentiert sich am häufigsten durch Hämatome und Schleimhautblutungen (Schneppenheim und Budde, 2004b), wovon insbesondere die Nasen- (Epistaxis) und Mundschleimhäute betroffen sind. Nach operativen Eingriffen in diesem Bereich, wie z.B. bei Tonsillektomie oder Zahnextraktion, kann es ebenfalls zu kritischen Blutungen kommen. Bei Frauen kann sich das VWS außerdem mit verstärkten Regelblutungen oder postpartalen Nachblutungen manifestieren. Betroffen sind auch die Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes und des Urogenitalsystems. Generell sind auch peri-/postoperative Blutungen und verlängerte Blutungen aus kleineren Wunden zu beobachten (Tosetto et al. 2007). Eine Sonderform stellt der Typ 2 N dar, bei dem die Bindung zu dem Gerinnungsfaktor VIII gestört ist und dadurch dessen Konzentration deutlich vermindert ist. Hierbei lässt sich das klinische Bild mit Hämarthros und Einblutungen in die Muskulatur nur schwer von der Hämophilie unterscheiden. Auch bei dem schweren VWS Typ 3 können zusätzlich zu den oben erwähnten Symptomen Blutungen in Gelenken und Muskulatur auftreten. Diese kombinierte Störung der primären und sekundären Hämostase bei dem VWS Typ 3 ist auf den absoluten Mangel des VWF und daraus resultierenden Mangel an Faktor VIII Plasma Aktivität (FVIII:C) zurück zu führen (Eikenboom 2001).

1.6. Diagnostik

Für das VWS erfolgt die Diagnostik stufenweise, um aufwändige und kostspielige Spezialuntersuchungen gezielt und sinnvoll einsetzen zu können. Grundlage aller differentialdiagnostischen Überlegungen ist eine ausführliche Eigen- und Familienanamnese. Einfache Tests, wie Blutungszeit, aPTT, Thrombozytenzahl und Adhäsionsmethoden mit hohem Scherstress, sind nicht spezifisch für das VWS, bilden aber die Basis der diagnostischen Kette (Budde et al. 2004).

Blutungszeit.

Sie erfasst Störungen in der primären Hämostase und ist bei dem VWS in der Regel verlängert, kann allerdings auch im Normalbereich liegen. Die Bedeutung der Blutungszeit ist eher historisch bedingt und findet in der heutigen Praxis kaum noch Anwendung.

aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit):

Dies ist der Globaltest der endogenen Gerinnung und somit unter anderem abhängig von Faktor VIII. Bei Patienten mit VWS ist die aPTT abhängig vom FVIII-Spiegel oft, aber nicht immer, verlängert. Hingegen findet sich eine aPTT-Verlängerung regelhaft beim schweren VWS Typ 3 und dem Typ 2N. *Thrombozytenzahl*:

Die Thrombozytenzahl dient in erster Linie der Abgrenzung zu anderen primären Hämostasestörungen, kann allerdings durch vermehrten Verbrauch (z.B. Typ 2 B) ebenfalls vermindert sein.

Adhäsionsmethoden mit hohem Scherstress:

Durch Filtermethoden kann die Blutungszeit in vitro bestimmt werden. Hierbei wird der physiologische Scherstress in Arteriolen in künstlichen Kapillaren nachgestellt und somit die primäre Hämostase getestet (Budde et al. 2004).

Besteht weiterhin der Verdacht auf ein VWS sind weitere Untersuchungen zur Bestätigung und Einteilung in einen Typ nötig. Diese erweiterte und zum Teil nur von Spezialeinrichtungen durchgeführte Diagnostik wird im Nachfolgenden vorgestellt.

VWF-Antigen (VWF:Ag):

Dies ist eine immunologische Bestimmung der VWF-Konzentration, die bei quantitativen Defekten vermindert (Typ 1), bzw. nicht nachweisbar (Typ 3) ist (Schneppenheim und Budde 2004b). Außerdem wird das VWF:Ag in Relation zu anderen Laborparametern wie z.B. VWF:RCo oder VWF:CB gesetzt und aus diesen Verhältnissen lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf den Typ ziehen.

FVIII-Aktivität (FVIII:C)

Die Aktivität des Gerinnungsfaktors FVIII im Plasma ist abhängig von der Menge des VWF und der FVIII-Bindungsaktivität des VWF, die wiederum separat gemessen werden kann (*VWF:FVIIIB*). Mit diesen Tests lässt sich der Typ 2 N diagnostizieren und aufgrund von Mangel an VWF sind die gemessenen Werte bei VWS Typ 3 Patienten ebenfalls vermindert.

Ristocetin-Cofaktoraktivität (VWF:RCo)

In vitro lässt sich mithilfe des Antibiotikums Ristocetin die Bindungsaffinität zwischen VWF und GPIb auf der Thrombozytenmembran und somit die VWF-

abhängige Thrombozytenaggregation testen (Budde et al. 2002). Bei mehreren Typen ist die VWF:RCo vermindert und ermöglicht im Verhältnis zu VWF:Ag (VWF:RCo/VWF:Ag < 0,7) eine Differenzierung zwischen quantitativen und funktionalen Defekten des VWS (Sadler et al. 2006).

Kollagenbindungskapazität (VWF:CB)

Die Kollagenbindungskapazität misst die Adhäsionsfähigkeit des VWF und Kollagen und als Quotient zu VWF:Ag die Funktionsfähigkeit des VWF. Vor allem der Verlust großer Multimere ergibt pathologische VWF:CB Befunde (Budde et al. 2004).

Ristocetin-induzierte Plättchenagglutination (RIPA)

Bei ansteigenden Ristocetin Konzentrationen wird der Schwellenwert ermittelt, der eine eindeutige Thrombozytenaggregation verursacht. Bei erhöhter Affinität zwischen VWF und Thrombozyten wird diese Aggregation bereits bei niedrigeren Konzentrationen erreicht und macht so eine Diagnose des Typs 2 B möglich (Budde et al. 2004). Im Gegensatz dazu kann die Aggregation im Rahmen eines RIPA Tests bei dem Typ 2 M auch vermindert sein (Hilbert et al. 2000).

Multimeranalyse des VWF

Durch ein Agarosegel können die VWF-Multimere der Größe nach aufgetrennt werden. Anhand der Abwesenheit jeglicher Multimere (Typ 3), Mangel an großen Multimeren (Typ 2 A) und sonstiger Zusammensetzung der Bandenstruktur, kann eine Typisierung und Subtypisierung des VWS erfolgen (Schneppenheim und Budde 2004b). Dies basiert auf der Arbeit von Ruggeri und Zimmerman (Ruggeri und Zimmerman 1980). Damals benutzte man radioaktive Materialien zur Darstellung der Banden. Heute werden dafür überwiegend Immunoblot-Techniken mit lumineszenten Nachweismethoden verwendet (Schneppenheim und Budde 2004b). Die Multimeranalyse ist jedoch schwer standardisierbar und sollte daher nur in einem Referenzlabor erfolgen.

Diese Vielzahl an diagnostischen Tests ermöglicht meist eine akkurate Einteilung des Krankheitsbildes und daraus abgeleitet die optimalen Therapieund Beratungsmöglichkeiten. Das VWS Typ 3 ist im Vergleich zu anderen Typen relativ einfach zu diagnostizieren. Es präsentiert sich in der Regel mit deutlich verlängerter Blutungszeit, sehr niedrigem Faktor VIII und nicht detektierbaren Werten für VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CB, RIPA sowie nicht nachweisbaren Multimeren im Plasma oder in Thrombozyten (Budde et al. 2002).

In den letzten Jahren haben außerdem molekulargenetische Untersuchungsverfahren an Bedeutung gewonnen. Häufig ermöglichen Kenntnisse über Mutationen und deren Lokalisation eine Vorhersage über funktionelle und strukturelle Defekte. Außerdem können z.B. homozygote oder compound heterozygote Mutationen, die Null-Allelen entsprechen, als kausal für ein VWS Typ 3 erachtet werden (Schneppenheim und Budde 2004b). Diese Phänotyp/Genotyp-Korrelationen ermöglichen eine genauere Diagnostik, Typisierung und genetische Beratung von Patienten mit VWS.

1.7. Therapie

Die Therapie des VWS ist abhängig von der Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes sowie vom Subtyp. Asymptomatische und milde Formen benötigen in der Regel keine Therapie oder können mit konservativen Methoden, wie z.B. Druckverbänden, kontrolliert werden.

Das synthetische Vasopressin-Analogon Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin, DDAVP, Minirin®) verursacht eine Ausschüttung von körpereigenen VWF aus Endothelzellen und kann somit eine transiente Verbesserung der Blutgerinnung ermöglichen (Mannucci et al. 1977, Schneppenheim und Budde 2004b). Dies funktioniert allerdings nur, solange funktionsfähiger oder nur bedingt eingeschränkter VWF synthetisiert wird, wie bei dem VWS Typ 1 und einigen Formen des Typ 2 (Federici et al. 2004), nicht jedoch bei dem VWS Typ 3. Vor Beginn der Behandlung ist deshalb die Durchführung eines Minirin-Tests empfehlenswert, um ein individuelles Ansprechen der Therapie zu bestätigen.

Die Therapie der Wahl des VWS Typ 3 ist eine Substitution des fehlenden VWF, die in der Regel durch Transfusion eines Faktor VIII/VWF-Konzentrats erfolgt, jedoch auch aus anderen Plasmapräparaten bestehen kann (Eikenboom 2001). Je nach Blutungssymptomatik kann die Substitution lediglich bei Bedarf, prophylaktisch bei operativen Eingriffen oder als Dauerprophylaxe bei ausgeprägter Blutungssymptomatik erfolgen (Berntorp

16

2006). Durch eine regelmäßige Substitution mit VWF kann es allerdings zu der Bildung von Autoantikörpern kommen und eine weitere Behandlung dadurch erschwert werden (Eikenboom 2001).

Adjuvant kann beim VWS auch das Antifibrinolytikum Tranexamsäure eingesetzt werden und in ausgewählten Fällen eine Thrombozytensubstitution sinnvoll sein (Castaman et al. 2003, Berntorp 2006). Insbesondere die schweren Formen des VWS bedürfen einer sorgfältigen Therapieabwägung und Behandlung durch ein erfahrenes Hämatologenteam.

1.8. Fragestellung

Das VWS Typ 3 ist die seltenste und zugleich schwerste Unterform des von Willebrand Syndroms. Es wird rezessiv vererbt, sodass heterozygote Träger weder klinisch noch laborchemisch eindeutig identifiziert werden können. Für eine genetische Beratung, die bei betroffenen Familien immer indiziert ist, stellt die molekulargenetische Diagnostik eine essenzielle Grundlage dar. Trotz vieler bekannter genetischer Defekte, die auch im Rahmen einer Doktorarbeit im Labor Prof. Schneppenheim nachgewiesen werden konnten, ist die Kenntnis über genetische Ursachen des VWS Typ 3 bisher unzureichend. Ziel dieser Arbeit ist es, eine molekulargenetische Aufklärung der Indexpatienten und Familien zu erreichen und dabei neue Mutationen zu identifizieren, die das VWS Typ 3 nachzuweisen. Die Arbeit versteht sich als Beitrag für die Beschreibung des Mutationsspektrums von Patienten mit VWS Typ 3 in Deutschland, das als Grundlage für ein besseres Verständnis des Krankheitsbildes sowie als Grundlage der genetischen Beratung dient.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Die DNA der Indexpatienten wurde exonweise mittels PCR (siehe auch 2.4.1) und Sequenzierung (siehe auch 2.4.3) auf Mutationen untersucht. Begonnen wurde mit Exon 18 bis Exon 28, um früh eine möglichst hohe Trefferquote zu erzielen. Diese Region beinhaltet sowohl die häufigste VWS Typ 3 Mutation c.2435delC (Zhang et al. 1992, Schneppenheim et al. 1994) in Deutschland, als auch das größte Exon (Exon 28) von c.3675 bis c.5053 (Mancuso et al. 1989) und war dadurch für den Beginn geeignet. Anschließend wurden die Exons 2 bis 17 und 29 bis 52 analysiert. Zur Analyse der einzelnen Exons gehörte ebenfalls die Untersuchung der angrenzenden Intronbereiche auf potentielle Splice Site Mutationen. Für die Detektierung homozygoter Mutationen wurde die Patientensequenz mit einer Referenzsequenz verglichen (siehe 2.5). Wurde eine eindeutige, für das VWS Typ 3 potentiell kausale Mutation gefunden, wurde eine unabhängige Bestätigungs-PCR und Sequenzierung durchgeführt. Konnten bei den Indexpatienten jeweils zwei kausale Mutationen entweder homozygot oder compound heterozygot nachgewiesen werden, so wurde auf die Sequenzierung der restlichen Exons verzichtet. Bei heterozygoten Mutationen mit Leserasterverschiebung wurde zur Bestätigung und genauen Lokalisation der Deletion, Insertion oder Duplikation eine Klonierung vorgenommen (siehe 2.4.4). Bei nicht vollständig aufgeklärten Indexpatienten wurde die 253-kb Deletion Analyse (siehe 2.4.5) sowie die Multiplex Ligationdependent Probe Amplification (MLPA, siehe 2.4.6) durchgeführt. Auch bei allen Indexpatienten mit scheinbar homozygoten Mutationen wurde eine MLPA Analyse durchgeführt, um mögliche heterozygote Mutationen gepaart mit einer größeren Deletion zu identifizieren.

Sofern möglich, wurde eine Familienanalyse angestrebt. Hierbei wurde, falls vorliegend, DNA der Eltern und Geschwister der Indexpatienten auf die relevanten Mutationen untersucht, um Aussagen bezüglich Vererbungsmodus und betroffener Angehöriger machen zu können.

18

2.2. Patienten

2.2.1. Patienten DNA

Die untersuchte DNA stammt aus Blutproben von Patienten mit dem von Willebrand Syndrom Typ 3 bzw. von Patienten mit klinischem und/oder laborchemischem Verdacht auf das von Willebrand Syndrom Typ 3. Diese Proben wurden überwiegend von Laboratorien und Kliniken zur weiteren Diagnostik und molekulargenetischen Untersuchung eingesandt oder stammen von Patienten der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Eine Genehmigung zur Weiterleitung und zur molekulargenetischen Untersuchung wurde von den Einsendern jeweils zuvor eingeholt. Aus diesem Patientenkollektiv wurden 30 Proben aus dem Zeitraum 1988 bis 2007 untersucht, nachdem zwei Indexpatienten aufgrund mangelnder DNA aus der Studie ausgeschlossen wurden. Dies erklärt das Fehlen der Indexpatienten F9/II/1 und F30/II/1.

2.2.2. Klinische Datenerhebung

Aus Arztbriefen, Laborbefunden und Korrespondenzen wurden Daten bezüglich der klinischen Manifestation und diagnostischen Parameter erhoben. Der Bleeding Score wurde soweit vorliegend berechnet (Tosetto et al. 2007). Nicht alle Patientenunterlagen waren ermittelbar und so konnte dem Anspruch auf Vollständigkeit nicht gänzlich entsprochen werden. Die vorliegenden Daten sind in Tabelle 1 und Abbildung 2 dargestellt.



Abbildung 2: Verteilung klinischer Symptome bei Patienten mit VWS Typ 3 (klinische Angaben bei 13 Patienten vorliegend) H:Hämatome, GB: Gelenkblutung, E: Epistaxis, HM: Hypermenorrhö, SB: Schleimhautblutung, MB: Muskelblutung, NB: Nierenblutung, GIB: Gastrointestinale Blutung

2.3. Material

Nähere Angaben bezüglich verwendeter Materialien und Geräten/Gerätetypen und deren Hersteller werden im Anhang aufgeführt (siehe Material- und Geräteliste 7.4). Ebenfalls die Rezepte mit Mengenangaben und Konzentrationen sowie die verwendeten Protokolle sind unter 7.6 und 7.7 im Anhang aufgelistet.

Multimere			keine		keine	keine	keine									keine		Spuren bei Verd.1:5		keine		keine Große & Mittelgroße	keine					Spuren bei Verd. 1:5		
VWF:RCF				< 1 %	3%	< 1 %		2%			< 1 %		< 1 %	< 1 %	< 5 %		< 1%		15%		< 1 %	7%			< 1 %		< 1 %			< 1 %
VWF:CB			< 2%				< 2 %								< 2 %			< 2 %		< 2 %			< 2 %					< 2 %	< 2 %	
VWF-Ag			< 1 %	< 1 %	3%	< 1 %	< 1 %	4%			< 1 %		< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1%	< 1 %	6%	< 1 %	< 1 %	6%	< 1 %	< 5 %	< 1 %		< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
FVIII:C				4%	2%	3%		8%			4%		3%	5%	2%		%L		2%		5%	5-8 %		1%	< 1 %		2%			8,4 %
μ				75 s	71 s						56 s		67 s												52 s					80 s
BT				> 20 min	> 20 min	> 20 min		> 20 min			> 20 min		> 20 min	> 20 min			> 20 min				> 20 min				> 20 min		> 20 min			
BS				ε	9	4		2			9		9	3			2	Э			5				7		7			2
Klinik				E, H, HM	E, H, GB, MB	E, H, GB		Е, Н			E, H, GB, SB		E, H, GB, SB	GB, HM			E,GB, SB, HM, NB	H, GIB			H, GB, SB				E, H,GB, HM, MB		H, GB, GIB, MB			GB
Pat#	F1/II/1	F2/II/1	F3/II/1	F4/II/1	F5/II/1	F6/II/1	F7/II/1	F8/II/1	F10/II/1	F11/II/1	F12/II/1	F13/II/1	F14/II/1	F15/II/1	F16/II/1	F17/II/1	F18/II/1	F19/II/1	F20/II/1	F21/II/1	F22/II/1	F23/II/1	F24/II/1	F25/II/1	F26/II/1	F27/II/1	F28/II/1	F29/II/1	F31/II/1	F32/II/1

-

Tabelle 1: Klinische Daten der Indexpatienten -

- T

. . .

r

Abkürzungen: E: Epistaxis, H: Hämatome, GB: Gelenkblutung, SB: Schleimhautblutung, HM: Hypermenorrhö, MB: Muskelblutung, NB: Nierenblutung, GIB: Gastrointestinale Blutung, BS: Bleeding Score, BT: Bleeding Time, PTT: Partial Thromboplastin Time, FVIII:C: Faktor VIII:C, VWF-Ag: von Willebrand Faktor Antigen, VWF-CB: von Willebrand Faktor Collagen Bindungsaktivität, VWF-RCF: von Willebrand Faktor Ristocetin Cofaktor

2.3.1. DNA Extraktion

Die untersuchte DNA stammt aus kernhaltigen Leukozyten aus EDTA-Blut der Patienten oder deren Angehörigen. Für die DNA Gewinnung wurde das Protokoll des Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega, USA) in modifizierter Form angewendet. Es beinhaltet eine einfache und ungefährliche Ausfällreaktion der Proteine (Miller et al 1988).

Der gesamte Isolationsprozess besteht aus vier Schritten:

- Die Cell Lysis Solution löst Erythrozyten auf.
 Nach Zentrifugation kann der Überstand abgegossen werden.
 Die verbleibenden Leukozyten werden resuspendiert (Vortex).
- 2) Die Nuclei Lysis Solution löst Leukozyten und deren Kerne auf.
- Mittels Protein Precipitation Solution werden vorhandene Proteine ausgefällt.

Nach Zentrifugation kann die DNA im Überstand von den ausgefallenen Proteinpellets getrennt werden.

 Ausfällen der DNA mit Isopropanol und anschließend zentrifugieren. Waschen der DNA mit 70 % Ethanol und anschließend zentrifugieren. Vorsichtiges abpipettieren des Ethanols und Luftrocknung der DNA-Pellets.

Zuletzt Rehydrierung der DNA mit DNA Rehydration Solution.

Die Asservierung erfolgte bei Minus 20 °C.

2.3.2. DNA Arbeitslösung

Für optimale Ergebnisse benötigt man Arbeitsmischungen mit möglichst gleichwertigen Konzentrationen an DNA. Voraussetzung hierfür ist die Messung der optischen Dichte der extrahierten DNA (BioPhotometer, Eppendorf). Als Referenz diente destilliertes H₂O (Aqua dest., Braun). Zielwert der Verdünnung waren 100 ng/µl. Durch Erstellen der Arbeitslösung konnte auch eine potentielle Verunreinigung der DNA-Stammlösung vermieden werden.

2.3.3. Primer

Primer sind Oligonukleotide, die die Bindungsstelle für Replikationsenzyme und den Startpunkt der DNA-Replikation darstellen. Für molekulargenetische Untersuchungen können diese Primer künstlich und gezielt hergestellt werden. Sie sind in der Regel 20-30 Nukleotide lang und flankieren bei der PCR-Reaktion (siehe 2.4.1) als Primerpaar den zu replizierenden Abschnitt. Für die PCR werden somit der Sense und Antisense Primer benötigt, für die Sequenzierung jeweils nur Sense oder Antisense Primer, alle in der Verdünnung 1:10.

Voraussetzung für die Primerauswahl ist die Kenntnis der Struktur des von Willebrand Faktor Gens auf Chromosom 12 (Mancuso et al. 1989). Im menschlichen Genom existiert außerdem auf Chromosom 22 ein VWF-Pseudogen, dass zu 97 % homolog zum VWF-Gen auf Chromosom 12 ist (Mancuso et al. 1991). Dieses Pseudogen unterscheidet sich allerdings durch fehlende Transkriptionsfähigkeit und dadurch Funktionslosigkeit (Mazurier et al. 1998). Wie bereits in 1.3 erwähnt, muss die Auswahl der Primer für die Exons 23 bis 34 selektiv erfolgen und deren komplementäre Sequenz im VWF-Gen sich von der Sequenz im Pseudogen unterscheiden, um eine versehentliche Replikation des Pseudogens zu vermeiden.

2.4. Methoden

2.4.1. PCR

Bei der Polymerase Chain Reaction (PCR) handelt es sich um eine enzymatische Vervielfältigung von DNA Abschnitten (Saiki et al. 1985 und Mullis et al. 1986). Diese erfolgt zyklisch und durchläuft die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA Strängen durch Temperaturen um 95 °C getrennt. Bei einer spezifischen Temperatur (Annealing Temperatur), die von der Länge und Sequenz des Primers abhängig ist, lagern sich diese an die komplementäre DNA Sequenz an und bilden den Startpunkt der DNA-Replikation. Anschließend erfolgt die Elongation, die enzymatische Aneinanderreihung der komplementären Nukleotide. Dadurch ist ein gewisser DNA Abschnitt während eines Zyklus verdoppelt worden. Auch der replizierte Anteil dient nun als Matrize und die Vervielfältigung erfolgt exponentiell.

Dank hitzestabiler Enzyme (Taq-Polymerase) und Heizblöcken (Thermocycler), kann die zyklische PCR Reaktion automatisch ablaufen.

Aufgrund der Größe des Von Willebrand Faktor Gens wird jedes Exon einzeln repliziert. Zusätzlich muss die Replikation des Exons 28, ebenfalls aufgrund der Länge des Exons, von mehreren Primerpaaren in kleinere Abschnitte unterteilt werden.

Gegen Ende der experimentellen Arbeit wurde das Standard-Protokoll (siehe Rezept/Protokollliste) für PCR Reaktionen geändert. Durch GOTaq Green (Promega, USA) wurde die Rezeptur vereinfacht und es konnte auch auf den Loading Buffer verzichtet werden.

2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

Bei der PCR-Produktion entstehen neben der gewünschten Ziel-DNA auch kürzere Fragmente und die Primeroligonukleotide verbleiben ebenfalls in der Produktlösung. Für eine fehlerlose Sequenzierung ist also eine Aufreinigung des PCR-Produkts nötig, die mit Gelelektrophorese erfolgen kann. Die

Laufgeschwindigkeit einer Gelelektrophorese ist abhängig von der Konzentration (entspricht Netzdichte) des Polysacharid-Gels (1,2%), dem Ladeund Laufpuffer, der Größe der Nukleinsäurestränge sowie der angelegten Spannung (100-200 V). Die Größe der PCR-Produkte kann mittels mitlaufender DNA-Leiter (MBI Fermentas, Litauen) detektiert werden. Um die PCR-Produkte sichtbar zu machen, wird dem Agarose-Gel Ethidiumbromid zugefügt. Wandert die DNA entlang eines elektrischen Feldes durch das Gel, kann Ethidiumbromid an die DNA binden und diese unter UV-Licht sichtbar machen.

Nach der Photodokumentation (siehe Abbildung 3) können die fluoreszierenden Proben auf dem UV-Lichttisch (Spectroline) ausgeschnitten werden. Zuletzt kann die Agarose von dem PCR-Produkt mittels Zentrifuge (10 min bei 5000 U/min) und Aufreinigungssäule (Millipore Ultrafree) getrennt werden.



Abbildung 3: Photodokumentation der Gelelektrophorese Exon 18, Patienten F18/II/1-F32/II/1 Kammern neben DNA-Leiter frei; fehlendes Signal bei Pat F30/II/1

2.4.3. DNA – Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Analyse der Nukleotidabfolge der Patienten-DNA. Die angewandte Methode basiert auf der Kettenabbruchmethode, die 1977 von Frederick Sanger beschrieben wurde (Sanger et al. 1977). Das PCR Produkt wird zyklisch denaturiert und mithilfe von DNA-Polymerase und einem Primer linear amplifiziert. Zusätzlich zu den vier Basen in Form von 2'Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) wird eine geringe Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP), den Menge von vier Basen entsprechend, zugegeben. Da ddNTP keine 3'Hydroxygruppe besitzt, kann keine weitere Base angebaut werden (Terminator). Dadurch entstehen unterschiedlich lange Nukleotidketten, an deren Ende sich mit vier unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markierte ddNTPs befinden. Im DNA Sequenziergerät (ABI-Prism 310 Genetic Analyzer und ABI-Prism 3130

Genetic Analyzer, USA) werden die Nukleotidketten mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Farbstoffe durch einen



Abbildung 4: Ausschnitt Chromatogramm Pat.F4/II/1 Exon 43; Sequenzierung in Antisense Richtung

Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Basenabfolge kann somit detektiert und an einem angeschlossenen PC-System in einem Chromatogramm wiedergegeben werden (siehe Abbildung 4).

Für den Sequenzierungsansatz wurde das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) verwendet. Die Annealing Temperatur der Sequenzierung richtete sich nach dem verwendeten Primer und betrug 52°C bis 63°C. Vor der Auswertung am Sequenziergerät wurde das Sequenzierungsprodukt entsprechend den Protokollbedingungen mit dem Dye Ex 96 Kit (Dye Ex 96 Kit, Qiagen) aufgereinigt. Das Sequenzierungsprotokoll wurde im Laufe der Doktorarbeit geändert (siehe Rezept/Protokollliste). Hierdurch konnte sowohl PCR-Produkt als auch Big Dye (Applied Biosystems, USA) eingespart werden.

2.4.4. Klonierung

Eine genetische Deletion (Basenverlust), Insertion (Einfügen von Basen) oder Duplikation (Verdopplung eines Basenabschnittes) kann eine numerische Aberration und Leserasterverschiebung zur Folge haben. Finden diese Mutationen heterozygot statt, so kann eine Aussage bezüglich der Lokalisation und Basenabfolge im Gen nicht sicher getroffen werden, da das mütterliche und väterliche Allel bei der Sequenzierung übereinander abgebildet werden. Können die Allele nach der Replikation (PCR, siehe 2.4.1) allerdings isoliert werden, so ist eine getrennte Sequenzierung und Analyse der Mutation möglich. Hierfür wird das Prinzip der Klonierung zu Hilfe genommen. Darunter versteht man den Einbau und Vermehrung fremder DNA in einen Vektor. Wird dieser Vektor in Empfängerzellen eingeschleust (z.B. in E.coli Bakterien), bezeichnet man dies als Transfektion oder Transformation (Löffler und Petrides, 1998). Die DNA der Patienten mit heterozygoten Frameshift Mutationen wird mittels PCR repliziert. Mithilfe der Taq Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) wird am 3' Ende des PCR-Produkts ein Desoxyadenosintriphosphat (dATP) angebaut. Dadurch kann ein Plasmidvektor, der gleichzeitig eine Kanamycin- und Ampicillinresistenz enthält, überlappender Thyminbase das PCR-Produkt aufnehmen. mit Dieser Einbauschritt wird von Topoisomerasen des Vaccinia Virus ermöglicht (Shuman 1991 und 1994). Erhitzt man E.coli Bakterien kurzfristig (30 s) auf 42 °C, werden die Lipidmembranen durchlässig und die Plasmidvektoren können von der Bakterienzelle aufgenommen werden. Lediglich Bakterien mit Plasmidvektoren, also mit Kanamycin- und Ampicillinresistenz, können nun in einem Nährmedium (SOC-Medium, Invitrogen) auf Agarplatten (mit Antibiotikum versetzt) wachsen. Die Vektoren enthalten zusätzlich ein letales lacZ α – ccdB Fusionsgen (Bernard und Couturier, 1992). Nach Einbau des PCR Produkts werden die Expression des Gens gestört und eine positive Selektion der rekombinanten Vektoren sichergestellt (Bernard et al. 1994).

Nach 12-18 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C werden mehrere Kolonien für eine Colony PCR von den Agarplatten entnommen. Die Colony PCR wird mit plasmidspezifischen Primern durchgeführt. Sequenziert man diese PCR Produkte der einzelnen Bakterienkolonien, erhält man getrennt die Sequenzen der beiden Allele der Patienten DNA. Sowohl die Darstellung des Wildtypallels als auch die Basenabfolge des mutierten Allels ist so ohne Überlagerung möglich.

2.4.5. 253-kb Deletion Analyse

Komplette VWF Gen Deletionen können ebenfalls Ursache des schweren von Willebrand Syndroms Typ 3 sein. Eine 253-kb (kb: kilobasen) Deletion ist homozygot und compound heterozygot aus Untersuchungen an deutschen und italienischen Patienten mit von Willebrand Syndrom Typ 3 bekannt

(Schneppenheim et al. 2007). Die Bruchpunkte der Deletion liegen zwischen CD9-Gen und VWF-Gen sowie im Intron 3 des in Richtung Telomer angrenzenden TMEM16B Gens (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Schematische Darstellung des VWF Gens (52 Exons) und der 253-kb Deletion mit angrenzenden Genen CD9 (8 Exons) und TMEM16B (27 Exons) Lokalisation am distalen Ende des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p13.3) Cen: Richtung Centromer, Tel: Richtung Telomer, - ->: Bruchpunkte und Länge der 253-kb Deletion (Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Schneppenheim)

Spezifische Wildtyp- und Deletions-PCR Primer machen eine Amplifikation in

Anwesenheit oder Abwesenheit der Deletion möglich.

Für die Analyse wurden folgende Primer verwendet:

- Sense wild-type specific primer
- Sense deletion specific primer
- Common antisense primer

Die Annealing Temperatur betrug 61°C.

Die anschließende Gelelektrophorese erlaubte folgende Konstellationen:

- Wildtyp (279 bp Fragmente)
- Deletion homozygot (228 bp Fragmente)
- Deletion heterozygot (beide Fragmente)

Zusätzlich zur DNA Leiter (MBI Fermentas, Litauen) wurde bekannte Patienten-DNA mit heterozygoter sowie homozygoter 253-kb Deletion als Kontrolle untersucht (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Photodokumentation der 253-kb Deletion Analyse 1. Kammer: Kontrolle homozygote Deletion 2. Kammer: Kontrolle heterozygote Deletion

2. Kammer: Kontrolle neterozygote Deletic 3-7. Kammer: Wildtyp (WT) der Patienten F6/II/1, F11/II/1 bis F14/II/1

homo hetero WT WT WT WT WT

2.4.6. MLPA

Größere Deletionen Duplikationen VWF oder im Gen werden bei PCR Reaktionen und Sequenzierungen nicht erfasst. herkömmlichen Neuerdings kann mittels Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) die relative Kopienanzahl von über 50 DNA Zielsequenzen gleichzeitig bestimmt werden. Das Prinzip basiert auf Amplifikation von MLPA Sonden, die indirekt die Menge der vorliegenden DNA Sequenzen darstellen (Schouten et al. 2002). Verwendet wurde das SALSA MLPA KIT P011-B1 und P012-B1 VWF (MRC Holland, Niederlande) und wird im Folgenden näher erläutert.

Im ersten Schritt wird die zu untersuchende DNA bei 98 °C denaturiert. Nun können die MLPA Sonden (Oligonukleotide) während einer Inkubationszeit von 16-20 Stunden an die Zielsequenz binden (Hybridisierung). Jede Sonde besteht aus zwei Oligonukleotidketten, die zusätzlich je eine PCR Primer Sequenz beinhalten. Nur wenn diese beiden Sondenabschnitte lückenlos an die Zielsequenz gebunden haben, können sie im nächsten Schritt von einer Ligase verknüpft werden (15 min bei 54 °C, anschließend Inaktivierung der Ligase bei 98 °C). Lediglich ligierte Sonden haben beide Primer Sequenzen und können in der anschließenden PCR Reaktion exponentiell vermehrt werden. Da die MLPA Sonden und nicht die Zielsequenzen amplifiziert werden und diese identische Primersequenzen enthalten, ist lediglich ein Primerpaar für die PCR Reaktion nötig. Jede Sonde hat eine individuelle Länge und eine Auftrennung nach Größe ist mittels Kapillarelektrophorese im ABI-Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) möglich. Die detektierten Signale sind somit proportional zu den untersuchten Zielsequenzen und können mit einer Referenzprobe verglichen werden. Somit ist eine Aussage bezüglich Deletionen oder Duplikationen möglich (siehe auch Ergebnisse 0 Patient F13/II/1, F22/II/1 und F31/II/1, Diskussion 4.6 und Anhang 7.9).

2.5. Auswertung

Die ausgedruckten Chromatogramme wurden zuerst auf Signalstärke und Hintergrund überprüft. Nur Sequenzen mit eindeutiger Basenabfolge wurden ausgewertet. Mutationen mit Leserasterverschiebung waren unschwer zu und konnten direkt der Klonierung (siehe 2.4.4) erkennen und Bestätigungsanalyse zugeführt werden. Weitere Auffälligkeiten in der Sequenz wurden mit der Nukleotidsequenz des von Willebrand Faktor Gens abgeglichen (Mancuso et al. 1989). Eine Standard-Kodon-Tabelle ermöglichte die Identifikation von Stoppkodons sowie Änderungen in der Aminosäureabfolge. Ebenfalls geklärt werden musste der tatsächliche Krankheitswert einer Mutation oder ob lediglich ein Polymorphismus vorlag. Dies fand mithilfe der VWF Online Datenbank der University of Sheffield und der unveröffentlichten Datenlage der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf statt. Unbekannte und nicht veröffentlichte Missense Mutationen mit unklarem Krankheitswert wurden mit dem PolyPhen-2 Prediction Programm der Universität Harvard auf mögliche Auswirkungen auf Proteinebene untersucht und zum Teil im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit einer Expressionsstudie unterzogen (nicht Bestandteil dieser Arbeit).

Mutationen im Intronbereich wurden mit drei verschiedenen Splice Site Prediction Programmen auf potentielle Splice Site Mutationen untersucht. Hierbei kam der NetGene2 Server des Center for Biological Sequence Analysis der Technischen Universität Dänemarks, die Splice Site Prediction des Berkeley Drosophila Genome Project sowie der Alternative Splice Site Predictor (Wang und Marin 2006) der Universität von Sevilla zum Einsatz. Mit diesen Programmen konnten Aussagen bezüglich der Wahrscheinlichkeit getroffen werden, mit der Mutationen im Intron Veränderungen in der Splice Site hervorrufen (Hebsgaard et al. 1996, Brunak et al. 1991).

Homozygote Mutationen wurden durch elektronischen Abgleich der Patientensequenz mit der VWF Referenzsequenz im Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) identifiziert.

30

3. Ergebnisse

3.1. Nomenklatur

Für die Dokumentation von Mutationen ist eine einheitliche Nomenklatur unersetzlich. Um Ergebnisse auch im internationalen Wissenschaftskontext nachvollziehen zu können, bedarf es gemeinsamer Standards. Diese werden von der Human Genome Variation Society regelmäßig aktualisiert und auf ihrer Website veröffentlicht (www.hgvs.org/mutnomen). Für diese Arbeit waren in erster Linie die Nomenklatur auf DNA Ebene und Bezeichnungen für Aminosäuren von Bedeutung. Diese Standards (V2.0) basieren auf der Arbeit von den Dunnen und Antonarakis (den Dunnen und Antonarakis, 2000). Die für diese Arbeit relevanten Begriffe werden im Folgenden erklärt.

3.1.1. Nomenklatur auf DNA Ebene

Die verwendete DNA Referenzsequenz und Nummerierung bezieht sich auf die kodierenden Abschnitte des Gens. Dies wird mit " c" (,coding') kenntlich gemacht (z.B. c.2435delC). Der Vorteil liegt in der schnelleren Auffindung des betreffenden Abschnitts und macht eine Kalkulation (geteilt durch 3) der betroffenen Aminosäure möglich. Dies wäre bei genomischen DNA Referenzsequenzen nicht möglich. Die verwendete Referenzsequenz stammt von Mancuso (Mancuso et al. 1989). Dadurch ergibt sich auch die Nummerierung der Nukleotidabfolge, die mit A = 1 des Startkodons (ATG) des Gens beginnt. Bei der Nomenklatur für Nummerierungen im Intronbereich wurden vermehrt Änderungen vorgenommen. Aktuell wird der Abstand vom letzten Nukleotid des vorherigen Exons bzw. vom ersten wieder kodierenden Nukleotid des folgenden Exons mit " + " respektive " – " angegeben (Beispiel: anstatt IVS36+77C>T jetzt c.2451+77C>T) (Dalgleish et al. 2010).

Alle Nukleotide sind wiederum durch Abkürzungen ihrer Basen repräsentiert, nämlich A für Adenin, T für Thymin, G für Guanin und C für Cytosin. Wenn ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird, spricht man von einer Substitution, die mit " > " ausgedrückt wird (Bsp.: c.970C>T, d.h. C wird durch T ersetzt). Im Gegensatz zu einer Substitution bleibt die Anzahl der Nukleotide bei einer Deletion nicht gleich. Darunter versteht man den Verlust eines oder mehrerer Nukleotide, der mit "del" gekennzeichnet wird. Falls mehrere Nukleotide entfernt sind, muss zusätzlich der Bereich zwischen erstem und letztem entfernten Nukleotid mit "_" angegeben werden (Bsp.: c.3771_3772delGT).

Liegen im Vergleich zur Referenzsequenz zusätzliche Nukleotide vor, kann eine Duplikation oder Insertion vorliegen. Bei einer Duplikation (duplication: "dup") ist eine zusätzliche Kopie eines oder mehrerer Nukleotide an deren 3' Ende vorhanden. Eingefügte Nukleotide, die nicht eine Kopie der in 5'-Richtung angrenzenden Nukleotide sind, werden als Insertion bezeichnet (insertion: "ins"). Sowohl bei Duplikationen mit mehreren Nukleotiden als auch bei allen Insertionen muss der Bereich der Kopievorlage bzw. der flankierende Bereich mit " _ " angezeigt werden. (Bsp.: c.2861_2862insAA oder c.6221_6224dupCCAA)

Entspricht die untersuchte Sequenz der Referenzsequenz und es wurde keine Mutation gefunden, ist dies mit " = " deklariert. Bei unklaren Befunden ist dies mit "? " (unknown: "? ") gekennzeichnet.

Mutationen eines Allels werden mit " [" und "] " eingeklammert und mit " ; " von Mutationen des anderen Allels getrennt (Bsp.: c.[7176T>G] ; [7176T>G] Patient ist homozygot für die Substitution von T nach G an der Position c.7176).

3.1.2. Nomenklatur auf Aminosäure- / Kodon- Ebene

Zur Kennzeichnung der Aminosäureebene wird ein "p. " (Protein: "p. ") verwendet. Die fortlaufende Nummerierung der Aminosäuresequenz bzw. Kodonnummer startet mit dem ersten kodierenden Basentriplet (ATG) und dadurch mit der Aminosäure Methionin (Met/M) an Position p.1 (Goodeve und Peake 2001) und endet bei Aminosäure Lysin (Lys/K) an Position p.2813. Hieraus lässt sich auch rechnerisch die Nukleotidnummer ableiten und eine Verwirrung mit anderen Nummerierungen (mit/ohne Propeptid) wird verhindert.

Die jeweiligen Aminosäuren werden im Einbuchstabenkode angegeben, gefolgt von der Nummer der betroffenen Aminosäure bzw. des Kodons. Anschließend wird die Veränderung an der Aminosäureposition spezifiziert. Wird eine Aminosäure durch eine andere ersetzt, so wird diese aufgeführt (Bsp.: p.R273W). Hat ein Nukleotidaustausch zu einem STOPP-Kodon (TAA, TAG oder TGA) geführt, wird dies anstatt mit einem "X" neuerdings mit einem "*" dargestellt (siehe www.hgvs.mutnomen/standards.html). Alternativ wäre auch die Abkürzung " Ter " (Termination: " Ter ") im Dreibuchstabenkode möglich. Kommt es zu einer Leserasterverschiebung, z. B. aufgrund einer Deletion, Insertion oder Duplikation, wird dies mit " fs " (Frameshift: "fs") protokolliert. Bei detaillierteren Angaben wird zusätzlich die Anzahl der folgenden Aminosäuren angegeben bis es zu einem STOPP-Kodon kommt (Bsp.: p.V546Wfs*31). Die erste veränderte Aminosäure (im Beispiel Tryptophan, W) wird hierbei dazu gezählt. Es ist zu betonen, dass jegliche Aminosäureveränderung theoretisch hergeleitet und nicht experimentell verifiziert wurde.

3.2. Ergebnisse: Übersicht und Mutationsverteilung

Die genetische Ursache des VWS Typ 3 konnte bei 21 der 30 Indexpatienten komplett aufgeklärt werden. Es wurden 8 homozygote und 13 compound heterozygote Mutationen nachgewiesen. Bei den restlichen 9 Indexpatienten gelang lediglich der Nachweis je einer heterozygoten Mutation. In der Zusammenschau aller Ergebnisse stellte sich heraus, dass zwei Indexpatienten eher als Typ 2 A bzw. Typ 2 N einzuordnen sind (F2/II/1 und F23/II/1). Daraus ergibt sich eine molekulargenetische Analyse von 28 Indexpatienten mit VWS Typ 3 und somit 56 Allelen. Identifiziert wurden 16 kleine Deletionen, 12 Nonsense Mutationen, 6 Missense Mutationen, 5 Splice Site Mutationen, 4 Duplikationen, 3 große Deletionen und 1 Insertion (Mutationsverteilung siehe Abbildung 7). Das Mutationsspektrum ergab ein heterogenes Bild und lediglich vier Mutationen traten innerhalb des Patientenkollektivs gehäuft auf. Die Mutation c.2435delC wurde zweimal heterozygot (F10/II/1, F17/II/1) und einmal homozygot (F20/II/1) nachgewiesen und die Mutation c.2269_2270delCT einmal heterozygot (F13/II/1) und einmal homozygot (F14/II/1) identifiziert. Sowohl die Mutation c.6221_6224dupCCAA (F26/II/1 und F31/II/1) als auch c.7483delC (F7/II/1 und F29/II/1) konnten je bei zwei Indexpatienten heterozygot gefunden werden. Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit 21 neue, bisher nicht beschriebene und das VWS Typ 3 verursachende Mutationen identifiziert werden. Alle Mutationen der untersuchten Indexpatienten und deren Veränderung auf Aminosäureebene sind in Tabelle 2 dargestellt.



Abbildung 7: Verteilung der Mutationen von 28 Indexpatienten (n=56 Allele) mit VWS Typ 3

Patient	1.Ex	1.NT	1.AA	2.Ex	2.NT	2.AA
F1/II/1	7	c.817C>T	p.R273W		c.?	p.?
F2/II/1	28	c.4121G>A	p.R1374H	28	c.4751A>G	p.Y1584C
F3/II/1	42	c.7176T>G	p.Y2392*	42	c.7176T>G	p.Y2392*
F4/II/1		c.8155+6T>A	p.?		c.8155+6T>A	p.?
F5/II/1	14	c.1636delG	p.V546Wfs*31		c.?	p.?
F6/II/1	8	c.970C>T	p.R324*	31	c.5335C>T	p.R1779*
F7/II/1	26	c.3382C>T	p.Q1128*	44	c.7483delC	p.L2495Cfs*8
F8/II/1		c.2442+4A>G	p.?	21	c.2771G>A	p.R924Q
F10/II/1	18	c.2435deIC	p.P812Rfs*31		c.?	p.?
F11/II/1	18	c.2377C>T	p.Q793*	18	c.2377C>T	p.Q793*
F12/II/1	44	c.7448dupA	p.Y2483*	44	c.7448dupA	p.Y2483*
F13/II/1	17	c.2269_2270delCT	p.L757Vfs*22	48 bis 52	Deletion Exon 48-52	p.?
F14/II/1	17	c.2269_2270delCT	p.L757Vfs*22	17	c.2269_2270delCT	p.L757Vfs*22
F15/II/1	28	c.4636delG	p.V1546*		c.?	p.?
F16/II/1	26	c.3518G>T	p.C1173F		c.?	p.?
F17/II/1	18	c.2435deIC	p.P812Rfs*31		c.?	p.?
F18/II/1	25	c.3360G>A	p.W1120*	43	c.7300C>T	p.R2434*
F19/II/1	28	c.3771_3772delGT	p.Y1258Cfs*34	52	c.8255G>A	p.G2752D
F20/II/1	18	c.2435deIC	p.P812Rfs*31	18	c.2435delC	p.P812Rfs*31
F21/II/1	9	c.1093C>T	p.R365*	9	c.1093C>T	p.R365*
F22/II/1	28	c.4570delG	p.V1524*	1 bis 52	Deletion Exon 1-52	p.?
F23/II/1	19	c.2451T>A	p.H817Q	19	c.2451T>A	p.H817Q
F24/II/1	45	c.7651C>T	p.Q2551*		c.?	p.?
F25/II/1	9	c.1051delG	p.V351Cfs*106		c.8155+3G>T	p.?
F26/II/1		c.3223-1G>A	p.?	36	c.6221_6224dupCCAA	p.K2075Nfs*16
F27/II/1	52	c.8262T>G	p.C2754W		c.?	p.?
F28/II/1	44	c.7524_7525delGG	p.D2509Lfs*23	51	c.8216G>A	p.C2739Y
F29/II/1	44	c.7483deIC	p.L2495Cfs*8		c.?	p.?
F31/II/1	36	c.6221_6224dupCCAA	p.L2075Nfs*16	6 bis 52	Deletion Exon 6-52	p.?
F32/II/1	22	c.2861_2862insAA	p.V955Rfs*25	28	c.4251delG	p.H1419Mfs*22

Tabelle 2:	Ubersicht	der	Mutationen	aller	Indexpatienten

Abkürzungen: Ex: Exon, NT: Nukleotid, AA: Aminosäure, alles weitere siehe Nomenklatur 3.1

3.3. Ergebnisse der Indexpatienten

<u>F1/II/1</u>



Abbildung 8: Sequenzierung Pat F1/II/1 Exon 7 mit der Mutation c.817C>T in Antisense Richtung (1) im Vergleich zum Wildtyp in Sense Richtung (2)

Bei der Indexpatientin F1/II/1 wurde die Mutation c.817C>T im Exon 7 gefunden (siehe Abbildung 8). Diese Missense Mutation ersetzt die Aminosäure Arginin (Arg/R) durch Tryptophan (Trp/W) an Position p.273 (p.R273W). Aus Untersuchungen an türkischen Familien ist bekannt, dass diese Mutation keine Beeinträchtigung auf die Dimerisierung, allerdings erheblichen Einfluss auf die Multimerisierung und Sekretion des VWF zur Folge hat (Allen et al. 2000a). Sowohl bei Patienten mit von Willebrand Syndrom Typ 1 als auch Typ 3 wurde diese Mutation gefunden. Unklar blieb allerdings, wie es zu unterschiedlichen VWF Konzentrationen im Plasma kam. Klinische Daten für die Indexpatientin F1/II/1 lagen nicht vor. Eine zweite Mutation konnte nicht nachgewiesen werden.

<u>F2/II/1</u>

c. [4121G>A] ; [4751A>G]

p. [R1374H] ; [Y1584C]



Abbildung 9: Sequenzierung Exon 28 des Indexpatienten F2/II/1 Mutation c.4121G>A (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Der Indexpatient F2/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation c.4121G>A (siehe Abbildung 9), die mit der Aminosäureveränderung p.R1374H einhergeht und für die Mutation c.4751A>G (siehe Abbildung 10), die die Missense Mutation p.Y1584C zur Folge hat. Die Mutation c.4121G>A ist aus der Literatur sowohl bei Patienten mit von Willebrand Syndrom Typ 1 (Goodeve et al. 2007b) als auch bei Patienten mit von Willebrand Syndrom Typ 2A bekannt und wird als Typ 2A Mutation klassifiziert (Corrales et al. 2009). Die Rolle der Mutation p.Y1584C ist bis dato nicht abschließend geklärt. Einerseits als Polymorphismus beschrieben (Cumming et al. 2006), ist die Mutation wohl eher als Typ 1 Missense Mutation zu beurteilen (James et al. 2007), allerdings mit inkompletter Penetranz (Goodeve 2007a). Die ausgeprägte Blutungssymptomatik mit Epistaxis, Hämatomen und rezidivierendem Hämarthros des Indexpatienten F2/II/1 lässt sich auf den Verlust der großen Multimere zurückführen. Die Triplet-Struktur der einzelnen Oligomere war allerdings vorhanden und die VWF:Ag Konzentration lag bei 17% (Normalwert 50-160 %). Der RIPA-Test (Ristocetin induzierte Plättchen Aggregation) zeigte eine Aggregation bei höchster Konzentration (1,5 mg/ml). In der Zusammenschau aller Ergebnisse liegt somit bei dem Indexpatienten F2/II/1 kein VWS Typ 3 sondern ein Typ 2 A von Willebrand Syndrom mit ausgeprägter Blutungssymptomatik vor.


Abbildung 10: Sequenzierung Exon 28 des Indexpatienten F2/II/1 Mutation c.4751A>G (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

<u>F3/II/1</u>



Abbildung 11: Sequenzierung Exon 42 des Indexpatienten F3/II/1 homozygote Nonsense Mutation c.7176T>G (1) führt zu p.Y2392* im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Der Indexpatient F3/II/1 ist homozygot für die Mutation c.7176T>G im Exon 42 (siehe Abbildung 11). Diese führt zu einer Nonsense Mutation p.Y2392* und kann somit als ursächlich für das phänotypische Krankheitsbild erachtet werden. Multimere konnten nicht nachgewiesen werden und das VWF:Ag betrug < 1 % (Normalwert 50-160 %). Die Mutation ist bisher nicht veröffentlicht worden, allerdings aus zwei türkischen Familien mit von Willebrand Syndrom Typ 3 Patienten bekannt und im Labor Peake untersucht worden (http://www.vwf.group.shef.ac.uk).

<u>F4/II/1</u>

```
c.[8155+6T>A] ; [8155+6T>A]
```

p.[?];[?]



Abbildung 12: Sequenzierung Pat. F4/II/1 mit der Mutation c.8155+6T>A (1) im Vergleich zum Wildtyp (2); Position 3 kennzeichnet die Grenze von Exon (50) und folgendem Intron; Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Die Indexpatientin F4/II/1 ist homozygot für die Mutation c.8155+6T>A (siehe Abbildung 12). Die Sequenzierung sämtlicher weiterer Exons mit angrenzender Intronbereiche sowie die Suche nach weiteren kausalen homozygoten Mutationen blieb ohne Ergebnis. Auch die Suche nach größeren Deletionen mittels MLPA bzw. 253-kb Deletion Analyse ergab unauffällige Befunde. Der ausgeprägte Phänotyp zeichnete sich durch Epistaxis, Hämatomen und Hypermenorrhö aus und die VWF:Ag Konzentration betrug < 1 %. In der Literatur ist diese Mutation bisher nicht beschrieben worden. Nach Angaben des NetGene2 Server (Splice Site Prediction Programm) ändert sich die Donor Splice Site Wahrscheinlichkeit von 0.47 nach 0.34. Laut den Splice Site Prediction Programmen Alternative Splice Site Predictor und Splice Site Prediction (siehe auch 2.5) fällt die Donor Splice Site allerdings komplett weg und die Mutation könnte demnach als kausale Mutation des VWS Typ 3 betrachtet werden. Eine klärende Studie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt und eine Aussage bezüglich Auswirkung auf Proteinebene konnte nicht getroffen werden (p.?).

Im Rahmen der Familienanalyse konnte die Mutation c.8155+6T>A sowohl bei der Mutter (F4/I/1) als auch beim Vater (F4/I/2) der Indexpatientin heterozygot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13). Klinische und laborchemische Daten der Eltern konnten allerdings nicht erhoben werden.



Abbildung 13: Nachweis der heterozygoten Mutation c.8155+6T>A bei der Mutter (F4/I/1) (4) und beim Vater (F4/I/2) (5) der Indexpatientin (F4/II/1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Position 3 markiert den Übergang von Exon 50 zum angrenzenden Intronbereich; Alle Sequenzierungen in Sense Richtung

Die Schwester (F4/II/2) der Indexpatientin leidet ebenfalls unter einem VWS Typ 3, das sich mit Epistaxis, Hämatomen, Gelenkblutung und Sekundärblutung präsentierte und ebenfalls mutmaßlich auf die homozygote Splice Site Mutation c.8155+6T>A zurückzuführen ist (siehe Abbildung 14). Die gemessene VWF:Ag Konzentration bei der Schwester betrug < 1 %.

Der Stammbaum der Familie F4 ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 14: Nachweis der homozygoten Mutation c.8155+6T>A (6) bei der Schwester (F4/II/2) der Indexpatientin im Vergleich zum Wildtyp (2); Position 3 markiert den Übergang von Exon 50 zum angrenzenden Intronbereich; Alle Sequenzierungen in Sense Richtung



Abbildung 15: Stammbaum der Familie F4 Mutter (F4/I/1) und Vater (F4/I/2) heterozygot, Indexpatientin (F4/II/1) und Schwester (F4/II/2) homozygot für die Mutation c.8155+6T>A Stammbaum erstellt mit PED4-Stammbaumprogramm

<u>F5/II/1</u>

- c.[1636delG]; [=] p.[V546Wfs*31]; [=] CGGGG CCACCCGGGG CCGGGGNNN 125 130 120 125 130 125 2 1450 1500 1500 1550 1500 450
 - Abbildung 16: Sequenzierung Pat 5/II/1 Exon 14 mit Deletion c.1636delG und folgender Leserasterverschiebung (1) die nach 31 Aminosäuren zum STOPP-Kodon (Ter/*) führt sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2); Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

Die Indexpatientin F5/II/1 ist heterozygot für die Deletion c.1636delG im Exon 14 (Abbildung 16). Dadurch kommt es theoretisch zu einer Veränderung der Aminosäuren von Valin (V) nach Tryptophan (W) an Position p.546 und einer nachfolgenden Leserasterverschiebung, die nach 31 Aminosäurepositionen zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) an Position p.576 führt. Eine weitere Mutation, die die ausgeprägte Symptomatik mit Epistaxis, Hämatomen, Gelenkblutungen und Muskeleinblutungen erklären kann, wurde nicht gefunden. Das VWF:Ag betrug 3 % und Multimere konnten keine nachgewiesen werden.

<u>F6/II/1</u>

```
c.[970C>T] ; [5335C>T]
p.[R324*] ; [R1779*]
```



Abbildung 17: Sequenzierung Pat F6/II/1 Exon 8 und Exon 31 mit den Mutationen c.970C>T (1) und c.5335C>T (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) bzw. (4) Alle Sequenzierungen in Sense Richtung

Die Indexpatientin F6/II/1 ist compound heterozygot für die Mutationen c.970C>T (Exon 8) und c.5335C>T im Exon 31(siehe Abbildung 17). Die Mutation c.970C>T ist bisher einmal in der Literatur beschrieben worden (Schneppenheim et al. 1994) und beide führen theoretisch zu einem Basentriplett TGA, dass ein vorzeitiges Terminationskodon kodiert. Somit wären diese beiden Nonsense Mutationen als kausal für das phänotypische Erscheinungsbild anzusehen. Dies äußerte sich in Epistaxis, Hämatomen und Gelenkblutungen. Die VWF:Ag Konzentration lag bei <1% und es wurden keine Multimere nachgewiesen. Bei dem Bruder der Indexpatientin wurde ebenfalls die Mutation c.970C>T nachgewiesen, allerdings entspricht die Sequenzierung des Exons 31 dem Wildtyp (siehe Abbildung 18). Die VWF:Ag Konzentration war auf 25 % vermindert und es lagen keine klinischen Symptome vor.



Abbildung 18: Sequenzierung F6/II/2 (Bruder der Indexpatientin) Exon 8 (1) und Exon 31 (2) mit Mutation c.970C>T (1) und WT (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Untersuchungen bei beiden Eltern ergaben keine Sequenzabweichungen beim Vater F6/I/2 (siehe Abbildung 20) und die bekannte Nonsense Mutation c.970C>T bei der Mutter F6/I/1 (siehe Abbildung 19). Klinische Daten oder Laborparameter wurden bei den Eltern nicht erhoben. Der Stammbaum der Familie F6 ist in Abbildung 21 dargestellt.



Abbildung 19: Sequenzierung F6/I/1 (Mutter der Indexpatientin) Exon 8 (1) und Exon 31 (2) mit Mutation c.970C>T (1) und Wildtyp im Exon 31 Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Abbildung 20: Sequenzierung F6/I/2 (Vater der Indexpatientin) Exon 8 (1) und Exon 31 (2) In beiden Sequenzierungen lag der Wildtyp vor Beide Sequenzierungen in Sense Richtung



<u>F7/II/1</u>

c. [3382C>T] ; [7483delC] p. [Q1128*] ; [L2495Cfs*8]



Abbildung 22: Sequenzierung Pat F7/II/1 Exon 26 mit der Mutation c.3382C>T (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen

Die Indexpatientin F7/II/1 ist compound heterozygot für die Mutationen c.3382C>T und c.7483delC die im Exon 26 bzw. Exon 44 liegen. Durch die Substitution von C nach T an Position c.3382 verändert sich das Basentriplett von CAG (Glutamin/Q) zu TAG (Ter/*) und somit zu einem Terminationskodon (siehe Abbildung 22). Diese Nonsense Mutation ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden, ebenso wenig wie die Deletion an Position c.7483, die zu

einem Aminosäureaustausch von Leucin (Leu/L) nach Cystein (Cys/C) und einer Leserasterverschiebung führt (siehe Abbildung 23). Nach 8 Aminosäuren entsteht auch hier ein vorzeitiges Terminationskodon an Position p.2502.

Bei der Patientin wurde eine VWF:Ag Konzentration von < 1 % gemessen und Multimere konnten nicht nachgewiesen werden.



Abbildung 23: Sequenzierung Pat F7/II/1 Exon 44 mit Deletion c.7483delC und folgender folgender Leserasterverschiebung (1) die nach 8 Aminosäurepositionen zum STOPP Kodon führt (Ter/*) sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2)

Alle Sequenzierungen in Antisense (ASN) Richtung

<u>F8/II/1</u>

- c. [2442+4A>G] ; [2771G>A]
- p. [?]; [R924Q]



Abbildung 24: Sequenzierung Pat F8/II/1 Exon 18 und angrenzender Intronbereich mit Mutation c.2442+4A>G (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Position 3: Übergang Exon-Intron Beide Sequenzierungen in Antisense Richtung

Der Indexpatient F8/II/1 ist compound heterozygot für die Mutationen c.2442+4A>G im Intron auf Exon 18 folgend (siehe Abbildung 24) und c.2771G>A im Exon 21 (siehe Abbildung 25). Die Mutation im angrenzenden Intronbereich verursacht laut NetGene2 Server (Splice Site Prediction Programm) ein Wegfallen der Donor Splice Site und somit eine theoretisch kausale Splice Site Mutation, die in der bisher veröffentlichten Literatur nicht beschrieben wurde. Zu dem gleichen Ergebnis kam die Analyse mittels Splice Site Prediction im Gegensatz zu dem Alternative Splice Site Predictor, der lediglich eine Reduktion der Donor Splice Site Wahrscheinlichkeit von 0.933 auf 0.863 prognostizierte.

Die Mutation c.2771G>A, die zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch Glutamin führt (p.R924Q), wurde in der bisherigen Literatur unterschiedlich betrachtet. Initial wurde die Mutation als Polymorphismus beschrieben (Hilbert et al. 2003) und konnte in einer weiteren Arbeit bei 3 % gesunder Kaukasier nachgewiesen werden (Hickson et al. 2010). Allerdings trat die Missensemutation auch in VWS Typ 1-Patientenkollektiven und bei Patienten mit VWS Typ 2N auf (Goodeve et al. 2007b, Casais et al. 2006). Auch wurde c.2771G>A bei Patienten mit VWS Typ 3 identifiziert und diskutiert, ob p.R924Q ein Marker für ein Nullallel darstellen könnte (Lester et al. 2008). In vitro führt der Aminosäureaustausch zu keiner Veränderung der VWF Expression, in vivo ist er jedoch mit einer Reduktion des VWF und FVIII:C assoziiert (Hickson et al 2010). Inwieweit eine weitere, mit der Mutation p.R924Q eng verknüpfte Mutation diese unterschiedlichen Phänotypen erklärt, kann abschließend nicht beurteilt werden, da ausser der oben erwähnten Splice Site Mutation keine weitere Sequenzabweichung festgestellt wurde. Eine Verifizierung mittels in vitro Splicings (Exon-trapping kit) ist für die Splice Site Mutation erforderlich und war nicht Bestandteil dieser Arbeit. Klinisch litt der Indexpatient unter Epistaxis und Hämatomen und die VWF:Ag Konzentration lag bei 4 %.



Abbildung 25: Sequenzierung Pat F8/II/1 Exon 21 mit der Sequenzvariante c.2771G>A (1) die zu einer Aminosäuresubstitution p.R924Q führt im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

<u>F10/II/1</u>

- c. [2435delC] ; [=]
- p. [P812Rfs*31] ; [=]



Abbildung 26: Sequenzierung Pat F10/II/1 Exon 18 mit der Mutation c.2435delC (1) und folgender Leserasterverschiebung die nach 31 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

Die Indexpatientin ist heterozygot für die Mutation c.2435delC im Exon 18 (siehe Abbildung 26). Diese Deletion führt zu einem Austausch der Aminosäure Prolin (Pro/P) durch Arginin an Position p.812 (Arg/R)und einer Leserasterverschiebung, die nach 31 Aminosäuren ein vorzeitiges Terminationskodon (Ter/*) zur Folge hat. Heterozygot ist diese Deletion bei Patienten mit VWS Typ 1 bekannt (Goodeve et al. 2007b, James et al. 2007). Tritt sie allerdings homozygot oder in Kombination mit einer anderen für das VWS Typ 3 kausalen Mutation auf, so liegt ein VWS Typ 3 vor. Die Mutation 2435delC ist gleichzeitig die häufigste Mutation des schweren VWS Typ 3 in der deutschen und schwedischen Population (Schneppenheim et al. 1994, Zhang et al. 1992) und ebenfalls bei polnischen (Schneppenheim et al. 1996) und italienischen Patienten beobachtet worden (Baronciani et al. 2003). In der Doktorarbeit, die dieser Arbeit vorangegangen ist, wurde ebenfalls die Mutation c.2435delC als häufigste genetische Ursache des VWS Typ 3 identifiziert. Bei 23 untersuchten Patienten lag die Deletion zweimal homozygot und fünfmal heterozygot vor (Harbeck-Seu, 2010). Inwieweit bei der Indexpatientin F10/II/1 tatsächlich ein VWS Typ 3 vorlag, kann abschließend nicht beurteilt werden, da keine weitere Mutation oder größere Deletion gefunden wurde und weder klinische noch laborchemische Daten vorlagen.

<u>F11/II/1</u>

- c. [2377C>T] ; [2377C>T]
- p. [Q793*] ; [Q793*]



Abbildung 27: Sequenzierung Pat F11/II/1 Exon 18 mit der homozygoten Mutation c.2377C>T (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Antisense Richtung

Der Indexpatient ist homozygot für die Mutation c.2377C>T im Exon 18, die zu einer Veränderung des Basentripletts von CAG (Glutamin/Q) zu TAG und damit zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) führt (siehe Abbildung 27). Diese Nonsense Mutation ist in der Literatur bislang nicht beschrieben worden. Weder klinische Daten noch elterliche Konsanguinität konnten eruiert werden.

<u>F12/II/1</u>

c. [7448dupA] ; [7448dupA]

p. [Y2483*] ; [Y2483*]



Abbildung 28: Sequenzierung Pat F12/II/1 Exon 44 mit der homozygoten Mutation c.7448dupA (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Antisense

Der Indexpatient F12/II/1 ist homozygot für die Mutation c.7447dupA im Exon 44 (siehe Abbildung 28). Dadurch verändert sich das Basentriplett von TAC nach TAA an Position p.2483 und die Aminosäure Tyrosin (Tyr/Y) wird durch ein vorzeitiges Terminationskodon (Ter/*) ersetzt (p.Y2483*). Diese Nonsense Mutation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden und kann im vorliegenden Fall für die ausgeprägte Klinik mit Epistaxis, Gelenkblutungen, Hämatomen und Sekundärblutungen sowie für die VWF:Ag Konzentration von < 1 % verantwortlich sein.

<u>F13/II/1</u>

```
c. [2269_2270delCT] ; Deletion Exon 48 - 52
```

```
p. [L757Vfs*22] ; [ ? ]
```



Abbildung 29: Sequenzierung Pat F13/II/1 Exon 17 mit der Mutation c.2269_2270delCT mit folgender Leserasterverschiebung (1) die nach 22 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Sense Richtung

Der Indexpatient F13/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.2269 2270delCT im Exon 17 (siehe Abbildung 29). Diese Deletion verursacht theoretisch einen Austausch der Aminosäure Leucin (Leu/L) durch Valin (Val/V) an Position p.757 folgender mit Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) nach 22 Positionen. Diese Mutation wurde bisher bei einer italienischen Patientin mit VWS Typ 3 beschrieben (Baronciani et al. 2003) und im Rahmen dieser Arbeit bei einer weiteren Patientin in homozygoter Form nachgewiesen (siehe F14/II/1). Inwieweit ein Verwandtschaftsverhältnis zwischen den Familien 13 und 14 besteht, konnte nicht geklärt werden. Es lagen auch keine weiteren Informationen bezüglich klinischer Symptomatik und laborchemischer Befunde vor. Zusätzlich zu der Deletion lag bei dem Indexpatienten F13/II/1 eine Deletion der Exons 48 bis 52 vor, die mittels MLPA (siehe 2.4.6) nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 30 und Anhang 7.9). Die genauen Bruchpunkte und somit die Reichweite der Deletion in das angrenzende TMEM16B-Gen (siehe Abbildung 5) konnte mit dieser Methode nicht ermittelt werden.



Abbildung 30: Auszug aus dem MLPA Report des Indexpatienten F13/II/1 oben: Signalstärke der Patientenprobe (grün) im Vergleich zur Referenzprobe (blau) unten: Abweichung der Patientenprobe vom Mittelwert der Referenzproben Nachweis einer Deletion der Exons 48 bis 52, Normalwerte für Exon 41 und 44 bis 47

<u>F14/II/1</u>

- c. [2269_2270delCT] ; [2269_2270delCT]
- p. [L757Vfs*22] ; [L757Vfs*22]



Die Indexpatientin ist homozygot für die Mutation c.2269_2270delCT (siehe Abbildung 31) im Exon 17, die bereits bei dem Indexpatienten F13/II/1 beschrieben wurde. Hier sei ausdrücklich erwähnt, dass die identische Mutation bei den Indexpatienten F13/II/1 und F14/II/1 dem Zufall geschuldet ist. Sowohl die unabhängige Bestätigungs-PCR und Sequenzierung, die Klonierung bei der heterozygoten Indexpatientin F13/II/1 als auch die Familienanalyse der Familie F14 haben jeweils die vorliegende Mutation bestätigt.

Klinisch hat sich das VWS Typ 3 bei der Indexpatientin F14/II/1 mit Epistaxis, Hämatomen, Gelenkblutung und Sekundärblutungen manifestiert. Die Konzentration des VWF:Ag betrug < 1 %. Dieselbe phänotypische Ausprägung lag bei der Schwester (F14/II/2) der Indexpatientin vor, die ebenfalls homozygot für die Mutation c.2269_2270delCT ist (siehe Abbildung 32) und unter einem VWS Typ 3 leidet. DNA des Vaters (F14/I/2) lag zur Untersuchung nicht vor und bei der Mutter (F14/I/1) konnte die Deletion heterozygot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 32). Der Stammbaum der Familie F14 ist in Abbildung 33 dargestellt.



<u>F15/II/1</u>

```
c. [4636delG] ; [ = ]
```

p. [V1546*] ; [=]



Abbildung 34: Sequenzierung Pat F15/II/1 Exon 28 mit der Mutation c.4636delG und folgender Leserasterverschiebung (1) die direkt zu einem STOPP Kodon führt (Ter/*) sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2)

Die Indexpatientin F15/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.4636delG im Exon 28 (siehe Abbildung 34). Diese Deletion verursacht eine Leserasterverschiebung und eine Veränderung des Basentripletts von GTG nach TGA. Dadurch wird theoretisch die Aminosäure Valin (Val/V) an Position p.1546 durch ein vorzeitiges Terminationskodon (Ter/*) ausgetauscht. Bisher wurde diese Deletion einmal in der Literatur bei einer Familie mit VWS Typ 3 beschrieben (Schneppenheim et al. 1994). Eine weitere VWS Typ 3 verursachende Mutation oder größere Deletion konnte nicht nachgewiesen werden. Klinisch manifestierte sich das VWS Typ 3 bei der Patientin mit Hypermenorrhö und Gelenkblutung. Die Konzentration des VWF: Ag betrug < 1 %.

<u>F16/II/1</u>

c. [3518G>T] ; [=] p. [C1173F] ; [=]

Die Indexpatientin F16/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.3518G>T im Exon 26 (siehe Abbildung 35). Dies führt zu einem Austausch der Aminosäure Cystein (Cys/C) an Position p.1173 durch Phenylalanin (Phe/F). Diese Missense Mutation ist bei Patienten mit VWS Typ 2A/IIE beschrieben und einer Expressionsstudie unterzogen worden (Schneppenheim et al. 2010). Eine weitere kausale Mutation, bzw. eine größere Deletion mittels MLPA und 253-kb Deletions Analyse konnte bei der Indexpatientin nicht gefunden werden. Klinisch manifestierte sich das VWS Typ 3 durch Gelenkblutungen und postoperativer Blutungskomplikation. Die Konzentration des VWF:Ag betrug < 1 % und es konnten keine Multimere nachgewiesen werden.



Abbildung 35: Sequenzierung Pat F16/II/1 Exon 26 mit der Mutation c.3518C>T (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Antisense Richtung

<u>F17/II/1</u>

c. [2435delC] ; [=] p. [P812Rfs*31] ; [=]

Die Indexpatientin ist heterozygot für die Mutation c.2435delC (siehe Abbildung 36) die bereits bei der Indexpatientin F10/II/1 eingehend beschrieben wurde. Daten zur klinischen Ausprägung des vorliegenden VWS Typ 3 konnten keine erhoben werden. Die gemessene VWF:Ag Konzentration lag bei < 1 % und Multimere konnten keine nachgewiesen werden. Die Analyse aller weiterer Exons und die Suche nach größeren Deletionen mittels MLPA und 253-kb Deletions Analyse ergaben allesamt unauffällige Befunde.



Abbildung 36: Sequenzierung Pat F17/II/1 Exon 18 mit der Mutation c.2435delC und folgender Leserasterverschiebung (1) die nach 31 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

<u>F18/II/1</u>

```
c. [3360G>A] ; [7300C>T]
```

p. [W1120*] ; [R2434*]



Abbildung 37: Sequenzierung Pat F18/II/1 Exon 25 mit der Mutation c.3360G>A (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Indexpatientin F18/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation Die c.3360G>A (siehe Abbildung 37) im Exon 25 und für die Mutation c.7300C>T (siehe Abbildung 38) im Exon 43. Die Substitution von Guanin zu Adenin an Position c.3360 führt zu einer Veränderung des Basentripletts von TGG (Tryptophan/W) zu TGA und somit zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) an Position p.1120. Diese Nonsense Mutation wurde in der bisherigen Literatur nicht beschrieben. Ein weiteres vorzeitiges Terminationskodon wurde bei der Indexpatientin im Exon 43 gefunden. Dort führt eine Substitution von Cytosin durch Thymin an Position c.7300 zu einer Veränderung des Basentripletts von CGA (Arginin/R) nach TGA und somit ebenfalls zu einem vorzeitigen STOPP Kodon (Ter/*). Diese Nonsense Mutation wurde bisher bei einem indischen Patienten mit VWS Typ 3 gefunden und von Baronciani beschrieben (Baronciani et al. 2003). Das VWS Typ 3 manifestierte sich bei der Indexpatientin durch Epistaxis, Einblutungen in Gelenk und Niere sowie durch Hypermenorrhö und interventionsbedürftige Sekundärblutungen nach einer Operation bzw. Traumata. Daten bezüglich einer Multimeranalyse konnten nicht erhoben werden und die gemessene VWF:Ag Konzentration betrug < 1 %.



<u>F19/II/1</u>

- c. [3771_3772delGT] ; [8255G>A]
- p. [Y1258Cfs*34] ; [G2752D]



Abbildung 39: Sequenzierung Pat F19/II/1 mit der Mutation c.3771_3772delGT und folgender Leserasterverschiebung (1), die nach 34 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon führt (Ter/*) sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2)

Alle Sequenzierungen in Sense Richtung

Indexpatientin F19/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation Die c.3771 3772delGT im Exon 28 (siehe Abbildung 39) und c.8255G>A im Exon 52 (siehe Abbildung 40). Die 2 Basen Deletion im Exon 28 verursacht einen Austausch der Aminosäure Tyrosin (Tyr/Y) durch Cystein (Cys/C) an Position p.1258 und eine Leserasterverschiebung, die nach 34 weiteren Aminosäuren ein vorzeitiges Terminationskodon (Ter/*) zur Folge hat. Aus der Literatur ist diese Mutation bisher nicht bekannt, ebenso wenig wie die Missense Mutation c.8255G>A, die in einem Aminosäureaustausch von Glycin (Gly/G) durch Asparagin (Asp/D) an Position p.2752 resultiert. Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wurde die Mutation c.8255G>A (p.G2752D) in einer Expressionsstudie untersucht. In homozygoter Form konnten bei dieser Missense Mutation Multimere nachgewiesen werden und die VWF:Ag Konzentration im Lysat war mit 12,3 % deutlich vermindert (siehe auch 4.5 Missense Mutation, Daten mit freundlicher Genehmigung von Rachel Ginsburg).

Das VWS Typ 3 äußerte sich bei der Indexpatientin mit Magenblutungen und Hämatomen. Bei der Multimeranalyse ließen sich bei einer Verdünnung von 1:5 lediglich Spuren von Multimeren nachweisen. Die Bestimmung der VWF:Ag Konzentration ergab Werte von < 1%.





Abbildung 40: Sequenzierung Pat F19/II/1 Exon 52 mit der Mutation c.8255G>A (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Position 3 markiert die Grenze zwischen Exon 52 und Intron Beide Sequenzierungen in Antisense Richtung

F20/II/1

- c. [2435delC] ; [2435delC]
- p. [P812Rfs*31] ; [P812Rfs*31]



Abbildung 41: Sequenzierung Pat F20/II/1 Exon 18 mit der homozygoten Mutation c.2435delC (1) im Vergleich zum Wildtyp Beide Sequenzierungen in Antisense Richtung

Die Indexpatientin F20/II/1 ist homozygot für die Mutation c.2435delC (siehe Abbildung 41), die bereits bei den Indexpatienten F10/II/1 und F17/II/1 beschrieben wurde. Es lagen weder klinische Daten noch eine Multimeranalyse vor, die dokumentierte VWF:Ag Konzentration lag bei 9 %.

F21/II/1

- c. [1093C>T] ; [1093C>T]
- p. [R365*] ; [R365*]





Der Indexpatient F21/II/1 ist homozygot für die Mutation c.1093C>T (siehe Abbildung 42) im Exon 9. Dies führt zu einer Veränderung des Basentripletts von CGA nach TGA und somit von der Aminosäure Arginin (Arg/R) direkt zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) an Position p.365. Diese Nonsense Mutation ist bereits bei einer Patientin mit VWS Typ 3 beschrieben worden (Bahnak et al. 1991). Mittels MLPA konnte eine größere Deletion inklusive Exon 9 ausgeschlossen werden. Somit ist die homozygote Nonsense Mutation alleine für die phänotypische Ausprägung mit einer VWF:Ag Konzentration von < 1 % und fehlenden Multimeren verantwortlich.

F22/II/1

- c. [4570delG] ; Deletion Exon 1 52
- p. [V1524*] ; [?]



Abbildung 43: Sequenzierung Pat F20/II/1 Exon 28 mit der heterozygoten Mutation c.4570delG (1) im Vergleich zum Wildtyp (2)

Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Der Indexpatient F22/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.4570delG im Exon 28 (siehe Abbildung 43). Daraus resultiert eine Leserasterverschiebung und eine Veränderung des Basentripletts an Position p.1524 von GTG (Valin/V) zu TGA und somit direkt zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*). Beschrieben wurde diese Nonsense Mutation bisher in heterozygoter Form bei einem Patienten mit VWS Typ 2A (Phänotyp Subtyp IIC Miami) im Labor von Professor Schneppenheim (http://www.vwf.group.shef.ac.uk).

Die Untersuchung aller Exons mittels MLPA (siehe 2.4.6) ergab eine heterozygote Deletion aller Exons 1 bis 52 des VWF-Gens (siehe Abbildung 44

und Anhang 7.9). Gleichzeitig ergab die 253-kb Deletion Analyse unauffällige Befunde, sodass bei dem Indexpatient F22/II/1 eine große Deletion mit bisher unbekannten Bruchpunkten vorliegt.

Das VWS Typ 3 äußerte sich bei dem Indexpatienten F22/II/1 durch Hämatome, Gelenkblutung sowie postoperative bzw. posttraumatische Sekundärblutungen. Die VWF:Ag Konzentration betrug < 1%.



Abbildung 44: Auszug aus dem MLPA Report des Indexpatienten F22/II/1 oben: Signalstärke der Patientenprobe (grün) im Vergleich zur Referenzprobe (blau) unten: Abweichung der Patientenprobe vom Mittelwert der Referenzproben Nachweis einer heterozygoten Deletion aller Exons

F23/II/1

- c. [2451T>A] ; [2451T>A]
- p. [H817Q] ; [H817Q]



Abbildung 45: Sequenzierung Pat F23/II/1 Exon 19 mit der homozygoten Mutation c.2451T>A (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Die Indexpatientin F23/II/1 ist homozygot für die Mutation c.2451T>A (siehe Abbildung 45) im Exon 19. Dieser Basenaustausch führt zur Substitution der Aminosäure Histidin (His/H) durch Glutamin (Gln/Q) an Position p.817 und beeinträchtigt die Interaktion zwischen VWF und FVIII. Diese Missense Mutation ist heterozygot, gepaart mit einer weiteren Missense Mutation und einer Deletion mit Leserasterverschiebung bekannt bei einem Patienten mit VWS Typ 1 (Kroner et al. 1996) und homozygot bei einer Patientin mit VWS Typ 2N (Rick und Krizek 1996). Innerhalb dieser Studie lag die VWF:Ag Konzentration bei 45 % und die Multimere lagen innerhalb der Norm (Rick und Krizek 1996). Bei der Indexpatientin F23/II/1 betrug die VWF:Ag Konzentration 6 % und die großen und mittelgroßen Multimere konnten nicht nachgewiesen werden. Die FVIII-Aktivität wurde mit 5-8 % angegeben, eine FVIII-Bindungsaktivität (VWF:FVIIIB) wurde nicht bestimmt.

Inwieweit die vorliegende Missense Mutation für die fehlenden Multimere bei der Indexpatientin F23/II1 verantwortlich ist, kann nicht abschließend beurteilt werden. Aus weiteren Studien ist zwar ein Einfluss von Typ 2N Mutationen auf das Multimerspektrum bekannt (Allen et al. 2000b, Jorieux et al. 2000, Schneppenheim et al. 2004c) jedoch bleibt der Einfluss von p.H817Q zweifelhaft, insbesondere da bei der Patientin mit VWS Typ 2N die Multimere innerhalb der Norm lagen (Rick und Krizek 1996).

Die Sequenzierung der restlichen Exons ergab 2 weitere homozygote Mutationen: c.4138A>G (p.I1380V) und c.4304A>G (p.N1435S), beide im Exon 28. Bisher sind beide von französischen und amerikanischen Arbeitsgruppen als Polymorphismus beschrieben worden (http://www.vwf.group.shef.ac.uk) und wurden im Rahmen einer Doktorarbeit einer Expressionsstudie unterzogen (nicht Bestandteil dieser Arbeit). Die Analyse der Multimere ergab bei beiden Mutationen unauffällige Befunde und die VWF:Ag Konzentration im Lysat war mit 56,9 % (p.I1380V) bzw. 86,3% (p.N1435S) vermindert (Daten mit freundlicher Genehmigung von Rachel Ginsburg). Eine große Deletion und daraus resultierender Pseudohomozygotie konnte mittels MLPA Analyse ausgeschlossen werden.

Es bleibt zu diskutieren, ob ein additiver Effekt aller gefundenen Mutationen für die schwere phänotypische Ausprägung der Indexpatientin F23/II/1 verantwortlich ist und ob eine Klassifikation als VWS Typ 2N eher zutreffend ist.

<u>F24/II/1</u>

- c. [7651C>T] ; [=]
- p. [Q2551*]; [=]



Der Indexpatient F24/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.7651C>T (siehe Abbildung 46) im Exon 45. Dadurch ändert sich das Basentriplett an Position p.2551 von CAG zu TAG und damit von der Aminosäure Glutamin (Gln/Q) zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*). Diese Nonsense Mutation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Über das klinische Erscheinungsbild des VWS Typ 3 des Indexpatienten konnten keine Daten

erhoben werden. Die Sequenzierung der restlichen Exons sowie die 253-kb Deletions Analyse und MLPA Analyse ergaben allesamt unauffällige Befunde. Die gemessene VWF:Ag Konzentration lag bei < 1% und es konnten keine Multimere nachgewiesen werden.

<u>F25/II/1</u>

- c. [1051delG] ; [8155+3G>T]
- p. [V351Cfs*106] ; [?]



Abbildung 47: Sequenzierung Pat F25/II/1 Exon 9 mit der Mutation c.1051delG und folgender Leserasterverschiebung (1), die nach 106 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon führt (Ter/*) sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

Der Indexpatient F25/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation c.1051delG (siehe Abbildung 47) im Exon 9 und c.8155+3G>T im Exon 50 angrenzenden Intronbereich (siehe Abbildung 48). Die bisher nicht veröffentlichte 1 Basen Deletion (c.1051delG) führt direkt zu einer Veränderung der Aminosäure Valin (Val/V) an Position p.351 zu Cystein (Cys/C) und nachfolgender

Leserasterverschiebung, die nach 106 Aminosäuren in einem Terminationskodon resultiert.

Durch die Splice Site Mutation c.8155+3G>T wird das Exon 50 in der Transkription und Translation übersprungen und konnte in einer weiteren Familie mit VWS Typ 3 nachgewiesen werden (Mertes et al. 1994). Von den drei Splice Site Prediction Programmen prognostizierte eines das Wegfallen der Splice Site (Alternative Splice Site Predictor) und die anderen beiden eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit von 0.54 auf 0.35 (NetGene2 Server) bzw. 0.94 auf 0.51 (Splice Site Prediction).

Die gemessene VWF:Ag Konzentration des Indexpatienten F25/II/1 lag bei 1 % und Daten zur Multimeranalyse oder dem klinischen Erscheinungsbild lagen nicht vor.



Abbildung 48: Sequenzierung Pat F25/II/1 Exon 50 und angrenzendem Intronbereich mit der Mutation c.8155+3G>T (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Position 3 markiert den Übergang von Exon 50 zum angrenzenden Intron Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

<u>F26/II/1</u>

c. [3223-1G>A] ; [6221_6224dupCCAA]

p. [?]; [K2075Nfs*16]



Abbildung 49: Sequenzierung Pat F26/II/1 Exon 25 und angrenzendem Intronbereich mit der Mutation c.3223-1G>T (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Position 3 markiert die Grenze zwischen Intron und Exon 25 Beide Sequenzierungen in Sense Richtung

Die Indexpatientin F26/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation c.3223-1G>T (siehe Abbildung 49) und c.6221_6224dupCCAA (siehe Abbildung 50) im Exon 36. Durch den Basenaustausch von G nach T an Position c.3223-1 wird die Acceptor Splice Site mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.19 anstatt 0.95 verwendet (NetGene2 Server), bzw. fällt die Acceptor Splice Site komplett weg (Splice Site Prediction und Alternative Splice Site Predictor) und das Exon 36 wird theoretisch nicht transkribiert.

Im Gegensatz dazu folgt aus der Duplikation im Exon 36 eine Substitution der Aminosäure Lysin (Lys/K) durch Asparagin (Asn/N) an Position p.2075 und eine Leserasterverschiebung, die nach 16 weiteren Aminosäuren zu einem vorzeitigen Terminationskodon führt. Sowohl die Splice Site Mutation als auch die Duplikation sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden, können aber jeweils als kausale VWS Typ 3 Mutation erachtet werden. Das VWS Typ 3 manifestierte sich bei der Indexpatientin mit Epistaxis, Hämatomen, Hypermenorrhö sowie Einblutungen in Gelenke und die Muskulatur. Die VWF:Ag Konzentration betrug < 1 % und Daten zur Multimeranalyse lagen nicht vor.



Abbildung 50: Sequenzierung Pat F26/II/1 Exon 36 mit der Mutation c.6221_6224dupCCAA und folgender Leserasterverschiebung (1) die nach 16 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt, sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

<u>F27/II/1</u>

c. [8262T>G] ; [=]

p. [C2754W] ; [=]



Die Indexpatientin F27/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.8262T>G (siehe Abbildung 51) im Exon 52. Die Aminosäuren verändern sich an Position p.2754 von Cystein (Cys/C) zu Tryptophan (Trp/W). Somit steht ein Cystein weniger zur Disulfidbrückenbildung am C-terminalen Ende der VWF-Monomere zu Verfügung. Daraus resultiert ein Dimerisierungsdefekt, der bereits bei einem Patient mit VWS Typ 3 beschrieben wurde (Schneppenheim et al. 2001).

Die Analyse aller weiterer Exons und angrenzender Intronbereiche sowie die Suche nach größeren Deletionen mittels 253-kb Deletion Analyse und MLPA ergaben allesamt unauffällige Befunde. Leider waren auch hier keine Daten bezüglich klinischem Erscheinungsbild und laborchemischen Ergebnissen zu erheben, so dass eine endgültige Einordnung der erhobenen Ergebnisse nicht erfolgen konnte.

F28/II/1

- c. [7524_7525delGG] ; [8216G>A]
- p. [D2509Lfs*23] ; [C2739Y]



Abbildung 52: Sequenzierung Pat F28/II/1 Exon 44 mit der Mutation c.7524_7525delGG und folgender Leserasterverschiebung (1), die nach 23 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon führt (Ter/*) sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

Der Indexpatient F28/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation c.7524_7525delGG (siehe Abbildung 52) im Exon 44 und c.8216G>A (siehe Abbildung 53) im Exon 51. Die 2-Basendeletion im Exon 44 führt zu einer Substitution der Aminosäure Asparaginsäure (Asp/D) an Position p.2509 durch Leucin (Leu/L) und nachfolgender Leserasterverschiebung, die nach 23 weiteren Aminosäurepositionen in einem vorzeitigen Terminationskodon endet. Im Exon 51 führt der Basenaustausch zu einer Veränderung des Basentripletts von TGT zu TAT und somit zu der Aminosäure Tyrosin (Tyr/Y) anstatt Cystein (Cys/C). Diese Missense Mutation ist bereits compound heterozygot in einem

schwedischen und finnischen Patientenkollektiv mit VWS Typ 3 beschrieben und als kausale Mutation eingestuft worden (Zhang et al. 1994).

Der gemessene VWF (VWF:Ag) des Indexpatienten F28/II/1 lag unterhalb der Nachweisgrenze (< 1%) und klinisch äußerte sich das VWS Typ 3 mit Hämatomen, gastrointestinalen Blutungen und Blutungen in Gelenke und der Muskulatur.



F29/II/1

- c. [7483delC] ; [=]
- p. [L2495Cfs*8] ; [=]



Abbildung 54: Sequenzierung Pat F29/II/1 Exon 44 mit der Mutation c.7483delC und folgender Leserasterverschiebung (1), die nach 8 weiteren Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt, sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Antisense Richtung

Die Indexpatientin F29/II/1 ist heterozygot für die Mutation c.7483delC (siehe Abbildung 54) im Exon 44, die zu einem Austausch der Aminosäure Leucin (Leu/L) durch Cystein (Cys/C) an Position p.2495 führt. Die folgende

Leserasterverschiebung endet nach 8 Aminosäurepositionen in einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) und dadurch in einem Abbruch der Translation. Diese Deletion ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden, konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit bei einer weiteren Indexpatientin (F7/II/1) nachgewiesen werden. Eine weitere für das VWS Typ 3 als kausal anzusehende Mutation ist bei der Analyse der Exons 2 bis 52 und angrenzender Intronbereiche sowie der 253-kb und MLPA Analyse nicht gefunden worden. Die VWF:Ag Konzentration der Indexpatientin betrug < 1 % und die Multimere waren bei einer Verdünnung von 1:5 lediglich schattenhaft nachweisbar.

<u>F31/II/1</u>

- c. [6221_6224dupCCAA] ; Deletion Exon 6 52
- p. [K2075Nfs*16] ; [?]



Abbildung 55: Sequenzierung Pat F31/II/1 Exon 36 mit der heterozygoten Mutation c.6221_6224dupCCAA (1) im Vergleich zum Wildtyp (2) Beide Sequenzierungen in Antisense Richtung

Der Indexpatient F31/II/1 ist heterozygot für die Duplikation

c.6221_6224dupCCAA im Exon 36 (siehe Abbildung 55), die bereits bei der Indexpatientin F26/II/1vorgestellt wurde. Auch hier erfolgt theoretisch eine Leserasterverschiebung und durch ein vorzeitiges Terminationskodon ein frühzeitiger Abbruch der Translation. Desweiteren ergab die Untersuchung aller Exons mittels MLPA (siehe 2.4.6) eine heterozygote Deletion der Exons 6 bis einschließlich 52 (siehe Abbildung 56 und Anhang 7.9). Eine Aussage, inwieweit die große Deletion Teile des angrenzenden TMEM16B-Gens (siehe Abbildung 5) beinhaltet und wo exakt die Bruchpunkte dieser Deletion liegen, kann nicht getroffen werden.

Über eine mögliche Verwandtschaft der Familien F26 und F31 konnte nichts in Erfahrung gebracht werden. Ebenso wenig standen Ergebnisse einer Multimeranalyse und klinische Parameter zur Verfügung. Die VWF:Ag Konzentration des Indexpatienten betrug < 1 %.



Abbildung 56: Auszug aus dem MLPA Report des Indexpatienten F31/II/1 oben: Signalstärke der Patientenprobe (grün) im Vergleich zur Referenzprobe (blau) unten: Abweichung der Patientenprobe vom Mittelwert der Referenzprobe Nachweis einer heterozygoten Deletion der Exons 6-52, Normalwerte für Exon 1-5

F32/II/1

- c. [2861_2862insAA] ; [4251delG]
- p. [V955Rfs*25] ; [H1419Mfs*22]



Abbildung 57: Sequenzierung Pat F32/II/1 Exon 22 mit der Mutation c.2861_2862insAA und folgender Leserasterverschiebung (1), die nach 25 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt, sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2)

Alle Sequenzierungen in Sense Richtung

Die Indexpatientin F32/II/1 ist compound heterozygot für die Mutation c.2861_2862insAA (siehe Abbildung 57) im Exon 22 und c.4251delG (siehe Abbildung 58) im Exon 28. Durch die Insertion erfolgt ein Austausch der Aminosäure Valin (Val/V) durch Arginin (Arg/R) an Position p.955 und nachfolgender Leserasterverschiebung, die nach 25 Aminosäurepositionen in einem präterminalen Terminationskodon (Ter/*) endet. Ebenfalls ein vorzeitiger Abbruch der Translation resultiert aus der Leserasterverschiebung, die 1-Basendeletion an Position c.4251 hervorgerufen wird (p.H1419Mfs*22).
Beide Mutationen sind bisher nicht aus Publikationen bekannt. Die Indexpatientin litt unter rezidivierenden Gelenkblutungen und die gemessene VWF:Ag Konzentration betrug < 1%.



Abbildung 58: Sequenzierung Pat 32/II/1 Exon 28 mit der Mutation c.4251delG und folgender Leserasterverschiebung (1), die nach 22 Aminosäurepositionen zu einem STOPP Kodon (Ter/*) führt, sowie Sequenzierung nach Klonierung (3) im Vergleich zum Wildtyp (2) Alle Sequenzierungen in Sense Richtung

4. Diskussion

Aus einer Vielzahl von Studien ist bekannt, dass dem phänotypisch relativ homogenen VWS Typ 3 eine genetische Heterogenität zugrunde liegt (Schneppenheim et al. 1994, Baronciani et al. 2003), die das gesamte Spektrum der Mutationsformen beinhalten kann. Auch in dieser Arbeit wurden Deletionen (groß und klein), Insertionen, Duplikationen, Splice Site Mutationen sowie Missense- und Nonsense Mutationen in unterschiedlicher Häufung (siehe Abbildung 7) nachgewiesen. Aufgrund des autosomal rezessiven Erbganges (Nyman et al. 1981, Zhang et al. 1993) bedarf es allgemein für die Manifestation eines schweren VWS Typ 3 zweier als kausale Mutationen erachtete Mutationen, die entweder in homozygoter oder compound heterozygoter Form vorliegen können. Die Kausalität der einzelnen Mutationen ist wiederum abhängig von den Folgen auf DNA- und Proteinebene und wird in den jeweiligen Kapiteln der Mutationsformen diskutiert. Allgemein sei erwähnt, dass homozygote oder compound heterozygote Mutationen, aus denen Nullallele resultieren, in der Regel als kausal für das VWS Typ 3 betrachtet werden und in einer Vielzahl bei diesem Patientenkollektiv nachgewiesen wurden (Ginsburg und Sadler 1993, Baronciani et al. 2003). Dagegen ist eine Klassifikation nach VWS Typ 3 basierend auf dem Genotyp bei Missense Mutationen, In-frame Veränderungen der Nukleotidanzahl und Splice Site Mutationen ungleich schwerer. Die klinische Manifestation und Relevanz dieser Mutationen ist nicht sicher ableitbar und kann lediglich mit Wahrscheinlichkeiten angegeben werden (siehe 4.5 und 4.7). Dadurch ist auch eine Abgrenzung zu schweren Formen des VWS Typ 1 schwierig (Eikenboom et al. 1998).

Tritt eine der VWS Typ 3 Mutationen lediglich heterozygot auf, so ist eine Einteilung abhängig von dem klinischen Erscheinungsbild und laborchemischen Parametern. Hierbei können die Symptome und Laborergebnisse dem Bild eines VWS Typ 1 ähneln oder die Patienten ohne phänotypische Auffälligkeiten als asymptomatische Träger der heterozygoten Mutation gelten (Eikenboom 2001). Da heterozygote Träger von VWS Typ 3 Mutationen somit weder klinisch noch laborchemisch sicher zu identifizieren sind, ist die molekulargenetische Analyse der Patienten und Angehörigen für eine ausreichende Beratung umso bedeutsamer.

Ebenso heterogen wie die Mutationsformen sind auch die Lokalisationen der in dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen im VWF Gen, die von Exon 7 bis Exon 52 auf 23 verschiedene Exon- und Intronbereiche verteilt und in Abbildung 59 dargestellt sind. Dies bestätigt die bisherigen Kenntnisse über die Breite des Mutationsspektrums, die ebenfalls in der Vorarbeit von Anja Harbeck-Seu (Harbeck-Seu 2010) und Arbeiten über das VWS Typ 3 beschrieben wurden (Ginsburg und Sadler 1993, Zhang et al. 1994). Hieraus lassen sich wiederum Empfehlungen bezüglich strategischem Vorgehen bei der molekulargenetischen Diagnostik von VWS Typ 3 Patienten ableiten, die im Kapitel 4.9 vorgestellt werden.



Abbildung 59: Mutationsspektrum und Lokalisation der identifizierten Mutationen

4.1. Kleine Deletionen

Der Verlust von genetischem Material kann sich von einem einzelnen Nukleotid bis hin zu ganzen Chromosomensegmenten erstrecken. Eine Unterteilung erfolgt in der Regel nach Lokalisation und Größe. Deletionen innerhalb des Chromosoms werden als interstitiell bezeichnet, am Ende eines Chromosoms als terminale Deletion (http://ihg.gsf.de/ihg/patinfo/glossar_f.html). Nach Größe wird zwischen Mikrodeletionen kleiner als 2 Megabasen (< 2 Mb) bzw. zwischen Deletionen im Kilobasen und Megabasen Bereich differenziert (Murken et al. 2006). Die Unterteilung in dieser Arbeit bezieht sich auf Deletionen einzelner Nukleotide (kleine Deletion) im Vergleich zum Verlust ganzer Exons bzw. des gesamten VWF-Gens (große Deletion), obwohl diese ebenfalls im

Größenbereich von Kilobasen liegen und somit klassischerweise zu Mikrodeletionen gehören würden. Alle in dieser Arbeit nachgewiesenen kleinen Deletionen haben eine Größe von 1 bzw. 2 Nukleotiden (siehe Tabelle 3). Unabhängig von der Bezeichnung ist die Lokalisation der Deletion in der kodierenden Region für den Krankheitswert relevant und kann zwei mögliche Konsequenzen haben. Ist die Anzahl der verloren gegangenen Nukleotide durch 3 teilbar, könnte das Protein ohne die dadurch kodierten Aminosäuren gebildet werden und die pathophysiologische Auswirkung dessen in der Regel milder ausfallen (In-Frame Deletion). Alternativ resultiert nämlich jede sonstige, nicht durch 3 teilbare Deletion in der kodierenden Region in einer Leserasterverschiebung. Dies führt entweder direkt an der Position der Deletion oder nach einer Abfolge veränderter Aminosäuren zu einem vorzeitigen Terminationskodon (http://www.genome.gov/glossary/). Ein Abbau der mRNA mittels , nonsense mediated RNA decay (NMD)⁺ ist meist die Folge (Frischmeyer und Dietz 1999) und somit resultiert aus einem vorzeitigen STOPP-Kodon in der Regel ein Nullallel. Tritt eine Frame Shift Deletion homozygot oder compound heterozygot mit einer weiteren Mutation auf, die zu einem Nullallel führt, so führen beide Nullallele zu einem absoluten Mangel des Genprodukts. Somit sind kleine Deletionen, die zu einer Leserasterverschiebung führen, als kausal für das VWS Typ 3 zu erachten. Insgesamt stellen kleine Deletionen zusammen mit Nonsense Mutationen die häufigste genetische Ursache eines VWS Typ 3 dar (Sadler et al. 2006). Dies konnte mit dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden. 28,6 Prozent der nachgewiesenen Mutationen sind kleine Deletionen und alle in dieser Arbeit identifizierten Deletionen führen zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einem vorzeitigen Terminationskodon. Die häufigste nachgewiesene Deletion ist die so genannte ,Åland Islands Mutation' c.2435delC (Schneppenheim 2004a) mit einer Allelfrequenz von 7,1 Prozent (4/56 Allele). Damit liegt die Allelfrequenz unterhalb der ermittelten Häufigkeit bei VWS Typ 3 Patienten aus Schweden (50 %), Deutschland (12,5 %), Polen (75 %) und Ungarn (12,5 %) (Zhang et al. 1992, Schneppenheim et al. 1994, Schneppenheim 2004a, Mohl et al. 2011). Mit einer Allelfrequenz von 5,4 % (3/56 Allele) wurde die Zweibasendeletion c.2269_2270delCT als zweithäufigste Deletion identifiziert, die bereits bei einer italienischen Patientin heterozygot beschrieben wurde (Baronciani et al. 2003). Zwei Mal wurde die

Einbasendeletion c.7483delC heterozygot nachgewiesen, was eine Allelfrequenz von 3,6 Prozent (2/56 Allele) in diesem Patientenkollektiv ergibt. Alle weiteren kleinen Deletionen wurden einmal nachgewiesen und haben somit eine Allelfrequenz von je 1,8 % (1/56 Allele). Außer den Mutationen c.4570delG (http://www.vwf.group.shef.ac.uk) und c.4636delG (Schneppenheim et al. 1994) sind diese Deletionen erstmals identifiziert worden. Die beschriebenen kleinen Deletionen sind zusammenfassend in Tabelle 3 aufgeführt.

Exon	NT	ΔΔ	Ref	
	0.1051dolC	n \/2510fo*106	2	
9	c. T05 TdelG		<u> </u>	
14	c.1636delG	p.V546Wfs*31	?	
17	c.2269_2270delCT	p.L757Vfs*22	1	
18	c.2435delC	p.P812Rfs*31	1,2,3	Tabelle 3: Übersicht kleiner Deletioner
28	c.3771_3772delGT	p.Y1258Cfs*34	?	NT: Nukleotid, AA: Aminosäure
28	c.4251delG	p.H1419Mfs*22	?	1: Baronciani et al. 2003
28	c.4570delG	p.V1524*	4	2: Zhang et al. 1992
28	c.4636delG	p.V1546*	3	3: Schneppenheim et al. 1994
44	c.7483delC	p.L2495Cfs*8	?	nachgewiesen im Labor Prof.
44	c.7524_7525delGG	p.D2509Lfs*23	?	Schneppenheim

4.2. Duplikationen

Zusätzliche Nukleotide können durch Duplikationen oder Insertionen verursacht werden. Viele der Duplikationen wurden und werden weiterhin als Insertionen bezeichnet, obwohl sie eine Kopie der Nukleotide am 3' Ende darstellen und dadurch nach heutigen Empfehlungen als Duplikation beschrieben werden sollten. Der Vorteil liegt in einer einfacheren Darstellung und verhindert eine Verwirrung bezüglich der Position einer Insertion (http://www.hgvs.org/mutnomen/). Außerdem ist der genetische Pathomechanismus einer Duplikation durch Verrutschen der DNA-Polymerase bei der Replikation und damit Verdopplung einer gewissen Nukleotidabfolge wahrscheinlicher als der Zusatz gewisser Nukleotide "von aussen" bei einer Insertion (Viguera et al. 2001, http://www.hgvs.org/mutnomen/). Exemplarisch würde die 1994 von Zhang beschriebene Frameshift Insertion c.1657insT nach heutigen Gesichtspunkten als c.1657dupT geführt werden.

Daraus ergibt sich ein verzerrtes Bild bei der Häufigkeitsverteilung und Duplikationen werden in Zukunft einen höheren Stellenwert bei den

identifizierten Mutationsformen eines VWS Typ 3 erhalten. An der Kausalität der Mutationen verändert diese Verschiebung der Häufigkeiten allerdings nichts. Sowohl bei Insertionen als auch bei Duplikationen kommt es, sofern die Anzahl der zusätzlichen Nukleotide nicht Basentripletts entspricht, zu einer Leserasterverschiebung. Die Unterbrechung der Proteinsynthese ist die Folge und dies führt, wie bereits in 4.1 beschrieben, zu einem Nullallel, das gepaart mit einer weiteren kausalen Mutation den schweren Typ 3 des VWS verursacht (Zhang et al. 1997).

Die Duplikationen in dieser Arbeit sind allesamt bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Die 4bp Duplikation c.6221_6224dupCCAA kam bei 2 Indexpatienten heterozygot vor und ergibt eine Allelfrequenz von 3,6 Prozent (2/56 Allele), ebenso wie die homozygote 1bp Duplikation c.7448dupA des Indexpatienten F12/II/1, die ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Die neu identifizierten Duplikationen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Exon	NT	AA	Ref.	
36	c.6221_6224dupCCAA	p.L2075Nfs*16	?	Tabelle 4: Ubersicht Duplikationer
44	c.7448dupA	p.Y2483*	?	? : bisher nicht veröffentlicht

4.3. Insertionen

Als Insertionen werden Mutationen bezeichnet, bei denen genetisches Material zusätzlich in die DNA eingebaut wird. Dies kann einzelne Nukleotide bis hin zu Chromosomenstücke betreffen (http://www.genome.gov/Glossary/). Für das VWS Typ 3 sind insbesondere Insertionen einzelner Nukleotide relevant und in diversen Studien nachgewiesen worden (Abuzenadah et al. 1999, Baronciani et al. 2003, Gupta et al. 2008). Das Duplikationen als Sonderform einer Insertion betrachtet werden können, erschwert die Abgrenzung dieser beiden Mutationsformen (siehe auch 4.2). Ein Teil, der in der Vergangenheit als Insertionen beschriebenen Mutationen, würde demnach bei einer Neubeurteilung mittlerweile als Duplikation gelten. Trotzdem behalten Insertionen eine gewisse Relevanz im Mutationsspektrum des VWS Typ 3 und werden vorraussichtlich auch in Zukunft bei Patienten nachgewiesen. Bei den meisten VWF-Gen Insertionen handelt es sich um den Einbau von 1- bzw. 2 Basenpaaren. Daraus resultiert wie bei Deletionen oder Duplikationen eine Leserasterverschiebung, die in einem präterminalen STOPP-Kodon endet und somit einem Nullallel entspricht (siehe auch 4.1 und 4.2). Damit ist ebenfalls die Kausalität der Insertionen mit Leserasterverschiebung für das VWS Typ 3 geklärt. In dieser Arbeit wurde die 2-bp Insertion c.2861_2862insAA bei einer Indexpatientin heterozygot nachgewiesen. Diese Mutation ist aus der Literatur nicht bekannt und im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben worden (siehe Tabelle 5).

Exon	NT	AA	Ref.	Tabelle 5: Übersicht Insertionen
22	c.2861_2862insAA	p.V955Rfs*25	?	?: bisher nicht veröffentlicht

4.4. Nonsense Mutationen

Unter Nonsense Mutationen versteht man eine Substitution eines einzelnen Basenpaares, die das Basentriplett dahingehend verändert, dass ein STOPPanstelle Kodon des bisherigen Aminosäurekodons tritt (http://www.genome.gov/Glossary/). Somit führt jede Veränderung der Basentripletts mit dem Ergebnis TAA, TAG oder TGA zu einem vorzeitigen Terminationskodon (Ter/*) und zu einem Abbruch der Translation. Wie bei Mutationen mit Leserasterverschiebung resultieren aus vorzeitigen STOPP-Kodons wiederum theoretisch trunkierte, also verkürzte Proteine. In der Regel kommt es allerdings in vivo zu einem Abbau der mRNA [nonsense mediated RNA decay (NMD)] und somit zu Nullallelen. Somit ist der Nachweis von homozygoten oder compound heterozygoten Nonsense Mutationen als plausibel und kausal für das VWS Typ 3 zu erachten.

Zusammen mit Frameshift Mutationen sind Nonsense Mutationen die häufigste genetische Ursache des VWS Typ 3 (Sadler et al. 2006) und in jedem größeren VWS Typ 3 Patientenkollektiv nachgewiesen worden (Ginsburg und Sadler 1993, Baronciani et al. 2003, Gupta et al. 2008). In dieser Arbeit waren Nonsense Mutationen mit 21,4 % die zweithäufigste Mutationsform nach den kleinen Deletionen mit 28,6 %. Drei der Nonsense Mutationen wurden homozygot nachgewiesen (R365*, Q793*, Y2392*) und sechs Mutationen heterozygot. Exemplarisch sei die Indexpatientin F6/II/1 vorgestellt, die compound heterozygot für die Nonsense Mutationen p.R324* und p.R1779* ist.

Bei beiden Mutationen ergab eine Substitution von Cytosin durch Thymin eine Veränderung des Basentripletts von CGA (Arg/R) zu TGA (Ter/*) und somit zu einem vorzeitigen STOPP-Kodon. Die in der Literatur beschriebene Nonsense Mutation p.R324* stammt allerdings von eben dieser Indexpatientin bzw. deren Familie (Schneppenheim et al. 1994). Damals konnte jedoch keine zweite kausale VWS Typ 3 Mutation gefunden werden. Die jetzige komplette Sequenzierung aller Exons ergab zum einen die Bestätigung der bekannten Mutation p.R324*, zum anderen den Nachweis der zweiten Nonsense Mutation p.R1779* und somit konnte die genetischen Ursache für das VWS Typ 3 bei der Indexpatientin aufgelöst werden. Da allein bei der Indexpatientin die Mutation p.R1779* identifiziert wurde, ist von einer Neumutation auszugehen. Alternativ käme ein intragenes Crossover beim Bruder der Indexpatientin in Betracht, der lediglich heterozygot für die Mutation p.R324* ist und bei VWF:Ag Werten von 25 % klinisch keine Symptomatik aufweist (siehe auch 3.3 F6l/II/1).

Insgesamt wurden in dieser Arbeit vier bereits zuvor bekannte Nonsense Mutationen und fünf Nonsense Mutationen erstmalig beschrieben. Eine Übersicht ist in Tabelle 6 dargestellt.

Exon	NT	AA	Ref.]
8	c.970C>T	p.R324*	1	
9	c.1093C>T	p.R365*	2,3,5	Tabelle 6: Übersicht Nonsense
18	c.2377C>T	p.Q793*	?	
25	c.3360G>A	p.W1120*	?	NI: NUKIEOTIG, AA: AMINOSAURE
26	c.3382C>T	p.Q1128*	?	1: Schneppenheim et al. 1994
31	c.5335C>T	p.R1779*	?	2: Bahnak et al. 1991
42	c.7176T>G	p.Y2392*	4	3: Baronciani et al. 2000 4: Abuzenadab et al. 1999 Labor I.
43	c.7300C>T	p.R2434*	5	Peake
45	c.7651C>T	p.Q2551*	?	5: Baronciani et al. 2003

4.5. Missense Mutationen

Anders als bei Nonsense Mutationen wird bei einer Missense Mutation durch eine Substitution eines einzelnen Basenpaares das Basentriplett dahingehend verändert, dass lediglich eine Aminosäure im synthetisierten Protein durch eine andere ersetzt wird und es zu keinem vorzeitigen Abbruch der Translation kommt. Dies kann folgenlos für die Funktionalität des Proteins bleiben, allerdings auch zu einer Einschränkung der Funktion führen bis hin zu einem totalen Funktionsverlust bzw. Ausbleiben einer korrekten posttranslationellen

Prozessierung. Daraus ergibt sich allerdings eine Problematik für die Kausalität von Missense Mutationen des VWS Typ 3. Anders als bei Nullallelen kann bei Missense Mutationen pauschal nicht sicher vorhergesagt werden, ob die jeweilige Mutation den schweren Phänotyp eines VWS Typ 3 verursacht oder nicht. Außerdem können Missense Mutationen, z.B. compound heterozygot gepaart mit einer Mutation mit Nullallel, für einen etwas milderen Phänotyp als das klassische VWS Typ 3 verantwortlich sein und demnach eher als VWS Typ 1 klassifiziert werden (Eikenboom et al. 1998). Prinzipiell gehören aber Missense Mutationen zum Mutationsspektrum des VWS Typ 3 und konnten bei diversen VWS Typ 3 Patienten nachgewiesen werden (Allen et al. 2000, Eikenboom 2001, Baronciani et al. 2003). Obwohl der Pathomechanismus bei vielen dieser Missense Mutationen noch nicht ausreichend geklärt ist, treten z.B. gehäuft Missense Mutationen am C-terminalen Ende des VWF-Gens auf. Diese Cystein-reiche Region ist verantwortlich für eine korrekte Dimerisierung des VWF. Aminosäuresubstitutionen, die Cystein involvieren, können dort zu schweren Dimerisierungsdefekten und einem VWS Typ 3 führen (Voorberg et al. 1991, Eikenboom 2001, Schneppenheim et al. 2001).

Insgesamt muss jede Missense Mutation individuell betrachtet werden und auf Plausibilität und Kausalität geprüft werden. Eine genaue Betrachtung der klinischen Daten und laborchemischen Ergebnisse ist für die korrekte Einteilung ebenfalls essenziell. Um eine Aussage bezüglich der Auswirkung der Aminosäuresubstitution auf die Struktur und Funktion des VWF treffen zu können, ist außerdem der Einsatz des Polyphen-2 Prediction Programms möglich (Adzhubei et al. 2010, http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/). Damit wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der eine Missense Mutation auch einen schädigenden Einfluss auf das Protein hat. Die möglichen Antwortkategorien sind probably (wahrscheinlich), possibly (möglicherweise), benign (gutartig, nicht schädigend) und unknown (unbekannt), verbunden mit einem Wahrscheinlichkeitsscore. Nachteil dieser einfachen theoretischen Überprüfung ist die mangelnde Aussagekraft über das Ausmaß der Schädigung. So kann damit ein Einfluss der Aminosäuresubstitution auf die Struktur und Funktion des VWF bestätigt werden, nicht jedoch zwischen phänotypisch gesunder, Typ 1-, Typ 2- oder Typ 3-Ausprägung differenziert werden. Aufwendiger, aber auch genauer, ist die Durchführung einer

81

Expressionsstudie, bei der mittels genetisch modifizierter Zellen die Auswirkungen von Missense Mutationen auf Synthese und Sekretion des VWF gemessen werden können. Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit wurde von Rachel Ginsburg unter anderem die Missense Mutation p.G2752D aus dieser Arbeit untersucht. Eine Übersicht der in dieser Arbeit gefundenen Missense Mutationen ergibt Tabelle 7, gefolgt von einer individuellen Betrachtung der einzelnen Mutationen.

Exon	NT	AA	Ref.
7	c.817C>T	p.R273W	1
21	c.2771G>A	p.R924Q	2,3
26	c.3518G>T	p.C1173F	4
51	c.8216G>A	p.C2739Y	5
52	c.8255G>A	p.G2752D	?
52	c.8262T>G	p.C2754W	6

Tabelle 7: Übersicht Missense Mutationen NT:Nukleotid, AA: Aminosäure ?: bisher nicht veröffentlicht 1: Allen et al. 2000a 2: Casais et al. 2006 3: Goodeve et al. 2007b 4: Schneppenheim et al. 2010 5: Zhang et al. 1994 6: Schneppenheim et al. 2001

p.R273W

Die Missense Mutation p.R273W ist bereits aus mehreren türkischen Familien bekannt. Dort führte sie in homozygoter Form zu kaum (0.06 IU/mL und 0.09 IU/mL) bzw. zu nicht mehr nachweisbaren (< 0,01 IU/mL) VWF:Ag-Werten und Multimeren im Plasma. Durch Expression in COS-7 Zellen konnte gezeigt gestörte Multimerisierung p.R273W werden, dass durch zu diesen ausgeprägten quantitativen Defekten des VWF führen kann (Allen et al. 2000a). Dies deckt sich mit der Vorhersage des Polyphen-2 Prediction Programms, nach dem die Missense Mutation p.R273W als ,probably damaging' (Score: 1,0) eingestuft wird (Alle nachfolgenden Vorhersagen wurden mit dem Polyphen-2 Prediction Programm http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/ ermittelt). Somit kann die Missense Mutation p.R273W als kausal für das VWS Typ 3 betrachtet werden. Inwieweit dies auch für die Indexpatientin F1/II/1 zutrifft, bleibt abschließend ungeklärt, da weder eine zweite Mutation noch klinische oder laborchemische Daten identifiziert werden konnten.

<u>p.R924Q</u>

Die Bedeutung und klinische Relevanz der Missense Mutation p.R924Q konnte bislang nicht abschließend aufgeklärt werden. Primär wurde sie als Polymorphismus klassifiziert (Hilbert et al. 2003). In unterschiedlichen weiteren Arbeiten zeigte sich eine variable Häufigkeit in der gesunden Kontrollgruppe, die vermutlich auf einen osteuropäischen Ursprung zurückzuführen ist. So konnte bei keinem der 183 gesunden Argentinier, jedoch bei 3,1 % europäischer Kaukasier (n= 1115) und insbesondere in der tschechischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 10,2 % p.R924Q nachgewiesen werden (Casais et al. 2006, Hickson et al. 2010). Gehäuft wurde die Mutation in Patientenkollektiven mit VWS Typ 1 sowie bei Patienten mit VWS Typ 2 N beobachtet (Casais et al. 2006, Goodeve et al. 2007b, James et al. 2007). Expressionsstudien kamen zu dem Ergebnis, dass die Missense Mutation p.R924Q alleine keinen Einfluss auf die VWF Expression in vitro hat (Berber et al. 2009, Hickson et al. 2010). In der Arbeit von Hickson und Kollegen konnte aber gezeigt werden, dass p.R924Q in vivo mit einer Reduktion von VWF und FVIII:C assoziiert ist, insbesondere wenn bei dem Individuum die Blutgruppe 0 vorlag (Hickson et al. 2010). Auch das Polyphen-2 Prediction Programm bestätigt einen schädigenden Einfluss der Mutation auf die Funktion des VWF (,probably damaging' Score: 0,999). Die Lokalisation der Mutation p.R924Q in der D3 Domäne und die Substitution der Aminosäure Arginin durch Glutamin lassen demnach an eine Störung der FVIII-Bindung sowie eine Störung der Multimerisation denken. In Kombination mit anderen Mutationen kann p.R924Q bis zur Absenz von VWF und Multimeren und somit einem VWS Typ 3 führen. Bei einem Patienten mit VWS Typ 3 trat p.R924Q homozygot in Kombination mit c.4944delT auf, bei einem weiteren VWS Typ 3 Patient heterozygot in Kombination mit einer Missense & Splice Site Mutation p.[R924Q; C1927R]; c.[1533+1G>T] (Lester et al. 2008, Hickson et al. 2010). Auch bei zwei ungarischen Patienten mit VWS Typ 3 war neben der homozygoten Splice Site Mutation c.3379+1G>A die Mutation c.2771G>A homozygot nachweisbar (Mohl et al. 2011).

Inwieweit die bei dem Indexpatient F8/II/1 zusätzlich vorliegende Splice Site Mutation dafür ausreicht oder eine bislang undetektierte Mutation, die mit der Missensemutation c.2771G>A verknüpft ist, erforderlich ist, bedarf weiteren Untersuchungen.

<u>p.C1173F</u>

In einem VWS Typ 2A/IIE Patientenkollektiv ist die Missense Mutation p.C1173F bei drei Patienten nachgewiesen worden (Schneppenheim et al. 2010).

Laut Polyphen-2 Prediction Programm ist die Aminosäuresubstitution p.C1173F mit einem Score von 0,999 ,probably damaging'. Gerade der Austausch der Aminosäure Cystein in der D3-Domäne des VWF und deren Rolle bei der Disulfidbrückenbildung und Multimerisierung legt einen Zusammenhang und einen Multimerisierungsdefekt nahe. Im Rahmen der oben genannten Studie wurde auch die Mutation p.C1173F einer Expressionsstudie unterzogen. In homozygoter Form zeigte sich eine signifikante Reduktion des VWF:Ag sowie der großen Multimere im Medium im Vergleich zur Messung im Lysat, was wiederum einen Sekretionsdefekt nahe legt (Schneppenheim et al. 2010).

Obwohl bei der Indexpatientin F16/II/1 lediglich eine Mutation nachgewiesen werden konnte, erscheint eine ursächliche Beteiligung der Missense Mutation p.C1173F am phänotypischen Erscheinungsbild plausibel. Eine VWF:Ag Konzentration von < 1 % und fehlende Multimere lassen bei der Indexpatientin F16/II/1 keinen Zweifel an der Diagnose eines VWS Typ 3 und somit kann die Missense Mutation p.C1173F als mitverursachend für das VWS Typ 3 betrachtet werden.

<u>p.C2739Y</u>

1994 ist die Missense Mutation p.C2739Y von Zhang und Mitarbeitern bei einem VWS Typ 3 Patienten compound heterozygot zusammen mit einer 1-bp Insertion beschrieben worden (Zhang et al. 1994). Auch wenn hier eine Expressionsstudie am aussagekräftigsten wäre, so kann man durchaus die Missense Mutation p.C2739Y als kausal für das VWS Typ 3 einordnen. Die Lokalisation der Mutation im Exon 51 und die Veränderung der Aminosäure Cystein spricht auch hier für einen schädigenden Einfluss auf die Dimerisierung, der bereits von weiteren Missense Mutationen in der CK-Domäne bekannt ist (Schneppenheim et al. 1996b, Montgomery et al. 1999, Schneppenheim et al. 2001). Auch das Polyphen-2 Prediction Programm geht von einer wahrscheinlichen Schädigung mit einem Score von 0,959 aus. Bei dem Indexpatient F28/II/1 wurde die Missense Mutation p.C2739Y compound heterozygot zusammen mit einer 2-bp Deletion nachgewiesen und äußerte sich in Hämatomen, Gelenk-, Muskel- und Gastrointestinalen Blutungen und einem VWF:Ag unterhalb der Nachweisgrenze.

<u>p.G2752D</u>

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Missense Mutation p.G2752D erstmalig bei einer Patientin zusammen mit der Mutation c.3771_3772delGT compound heterozygot beschrieben. Die Vorhersage mit dem Polyphen-2 Prediction Programm ergibt eine wahrscheinliche Schädigung durch diese Mutation (Score: 0,996). Interessanterweise führt die Mutation in vitro in homozygoter Form nicht zu einem VWS Typ 3 ähnlichen Bild. Dies konnte mithilfe einer Expressionsstudie im Rahmen der Promotion von Rachel Ginsburg im Labor Prof. Schneppenheim gezeigt werden. Bei Zellen mit homozygoter Mutation p.G2752D war die VWF:Ag Konzentration sowohl im Medium als auch im Lysat deutlich vermindert (VWF:Ag 12,3 % Medium, 52,1 % Lysat), jedoch ebenso wie die Multimere weiterhin deutlich nachweisbar (Daten mit freundlicher Genehmigung von Rachel Ginsburg). Im Gegensatz dazu waren bei der Indexpatientin die Multimere bei einer Verdünnung von 1:5 lediglich spurenhaft nachweisbar und die VWF:Ag Konzentration lag bei < 1 %. So ist davon auszugehen, dass die Mutation in vivo compound heterozygot mit einer Mutation die zu einem Nullallel führt ein VWS Typ 3 verursachen kann. Ansonsten wurden keine weiteren möglicherweise kausalen Mutationen bei der Indexpatientin nachgewiesen. Die Missense Mutation p.G2752D kann somit in einer bestimmten Konstellation zu einem VWS Typ 3 führen und hat unabhängig davon einen Einfluss auf die Funktionalität und quantitative Synthese des VWF. Als Pathomechanismus liegt ein Einfluss auf die Dimerisierung in der CK-Domäne nahe.

<u>p.C2754W</u>

Die Analyse der Missense Mutation p.C2754W mithilfe des Polyphen-2 Prediction Programms ergibt eine wahrscheinliche Schädigung durch die Mutation mit einem Score von 0,988. Auch der Nachweis der Mutation bei einer Patientin mit VWS Typ 3 ist wenig überraschend, da ein Patient mit eben dieser Mutation in homozygoter Form und eine darauffolgende Expressionsstudie die Kausalität der Mutation für das VWS Typ 3 bereits beweisen konnte (Schneppenheim et al. 2001). Als Pathomechanismus lieat ein Dimerisierungsdefekt in der CK-Domäne zugrunde, der auf den Ausfall einer Disulfidbrückenbindung zurückzuführen ist. Unglücklicherweise fehlen zu einer abschließenden Beurteilung und Einordnung die klinischen Daten und Laborparameter der Indexpatientin F27/II/1 sowie der Nachweis einer zweiten Mutation.

weitere Missense Mutationen

Die unterschiedlichen Auswirkungen von Missense Mutationen machen die Ergebnisse der Indexpatienten F2/II/1 und F23/II/1 deutlich. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt können beide Indexpatienten nicht als VWS Typ 3 Fälle klassifiziert werden. Bei dem Indexpatienten F2/II/1 ist die Sachlage eindeutig und die Missense Mutationen p.R1374H und p.Y1584C verursachen ein VWS Typ 2 A (siehe 3.3 F2/II/1). Die Situation der Indexpatientin F23/II/1 stellt sich dagegen komplizierter dar. Führend erscheint die homozygote Missense Mutation p.H817Q, die zu einem FVIII-Bindungsdefekt und dadurch zu einem Typ 2 N führt (Rick und Krizek 1996), jedoch auch bei Patienten mit dem Typ 1 und 2 B heterozygot beobachtet wurde (Kroner et al. 1996, Rick und Krizek 1996, Piao et al. 1993). Die FVIII-Bindungsaktivität des VWF (VWF:FVIIIB) wurde bei der Indexpatientin nicht gemessen und die verminderten Werte der FVIII-Aktivität (FVIII:C) zwischen 5 % und 8 % können auf die deutlich erniedrigte VWF:Ag Konzentration von 6 % zurückzuführen sein. Somit kann eine Diagnose VWS Typ 2N nicht abschließend gestellt werden. Hinzu kommen die Missense Mutationen p.11380V und p.N1435S die beide homozygot nachgewiesen wurden und laut Polyphen-2 Prediction Programm als nicht schädigend (p.I1380V: benign, Score 0,000) bzw. als möglicherweise schädigend eingestuft werden (p.N1435S: possibly damaging, Score 0,575). In der Expressionsstudie von Rachel Ginsburg zeigten beide Mutationen verminderte Werte von VWF:Ag im Vergleich zum Wildtyp, (p.I1380V: 94,8 % Medium, 56,9 % Lysat; p.N1435S: 80,8 % Medium, 86,3 % Lysat) allerdings normale Multimere (Daten mit freundlicher Genehmigung von Rachel Ginsburg). So liefert keine der Missense Mutationen eine plausible Erklärung für das Fehlen der großen und mittelgroßen Multimere bei der Indexpatientin. Für eine Abgrenzung der Typen 2A und 2B wäre außerdem ein RIPA-Test sinnvoll. Möglicherweise führt ein additiver Effekt der Missense Mutationen und eventuell weitere, nicht identifizierte Ursachen zu diesem Mischbild des von Willebrand Syndroms.

4.6. Große Deletionen

Wie bereits in 4.1 beschrieben, bezieht sich der Begriff "große Deletion" in dieser Arbeit auf den Verlust einzelner Exons bis hin zu Deletionen des gesamten VWF-Gens. Homozygote und heterozygote Deletionen des gesamten VWF-Gens sowie partielle Deletionen sind als erste genetische Ursache des VWS Typ 3 identifiziert worden (Shelton-Inloes et al. 1987, Ngo et al. 1988, Peake et al. 1990). Aus weiteren Patientenkollektiven mit VWS Typ 3 ist bekannt, dass große Deletionen im Verhältnis zu Nonsense Mutationen oder kleinen Deletionen deutlich seltener auftreten. Baronciani und Mitarbeiter identifizierten bei einer von 40 VWS Typ 3 Patienten eine homozygote Deletion der Exons 23-52 (Baronciani et al. 2003). Auch die homozygote komplette VWF-Gen Deletion in der Arbeit von Schneppenheim et al. uwrde lediglich bei einem von 32 Patienten nachgewiesen (Schneppenheim et al. 1994). Mittlerweile konnten die Bruchpunkte bei diesem Patienten und den Patienten aus den Arbeiten von Shelton-Inloes und Ngo identifiziert und als 253-kb Deletion beschrieben werden (Schneppenheim et al. 2007).

Auch ohne Kenntnis der genauen Bruchpunkte und dadurch Wissen über die exakte Auswirkung auf Proteinebene, können große Deletionen als kausal für das VWS Typ 3 erachtet werden. Ein homozygotes Fehlen des gesamten VWF-Gens ist selbsterklärend für den Ausfall jeglicher VWF Funktionen. Dies gilt

ebenso für eine compound heterozygote Konstellation einer gesamten Gendeletion zusammen mit Mutationen, die zu einem Nullallel führen oder bereits als kausal für das VWS Typ 3 beschrieben wurden. Bei Deletionen einzelner Exons kommen mehrere Erklärungen und plausible Pathomechanismen in Frage. Zum einen führt der Verlust eines gewissen Genabschnitts zu einer Beeinträchtigung der Funktion oder Prozessierung. So kann z.B. bei der Deletion von Exon 48 bis 52 (Indexpatient F13/II/1, siehe auch Abbildung 30) davon ausgegangen werden, dass durch den Wegfall der CK-Domäne keine ausreichende Dimerisierung erfolgen kann. Zum anderen können Deletionen, die angrenzende Introns betreffen, mögliche Splicing Defekte hervorrufen. Zuletzt können auch große Deletionen zu Leserasterverschiebungen und somit zu vorzeitigen Terminationskodons führen. Theoretisch kann jedoch in diesen Fällen, ohne die Kenntnis der Bruchpunkte, trunkiertes **VWF-Protein** jeweiligen ein nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit identifizierten 3 heterozygoten großen Deletionen wurden mittels MLPA ermittelt (siehe auch 2.4.6). Im Vergleich zu älteren Methoden, wie Southern Blotting oder Gendosis Analyse mittels ,Denaturing High Performance Liquid Chromatography⁴ (DHPLC) auf dem WAVE-System (Transgenomic, USA), war dies deutlich zeitsparender und zuverlässiger. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 abgebildet. Die MLPA Reporte der Indexpatienten F13/II/1, F22/II/1 und F31/II/1 sind in Abbildung 30Abbildung 44Abbildung 56 sowie komplett im Anhang unter 7.9 dargestellt.

Exon	NT	AA	Ref.
48-52	Deletion Exon 48-52	?	?
Jun 52	Deletion Exon 6-52	?	?
Jan 52	Deletion Exon 1-52	?	?

Tabelle 8: Übersicht große Deletionen NT: Nukleotid, AA: Aminosäure ?: nicht bekannt bzw. nicht veröffentlicht

Vorteil dieser schnellen und einfachen Methode ist die Möglichkeit, auch bei größeren Patientenkollektiven mit relativ geringem Arbeitsaufwand große Deletionen festzustellen. In dieser Arbeit waren die Indexpatienten F22/II/1 und F31/II/1 als homozygot für die jeweilige 1-bp Deletion und Duplikation eingestuft worden. Erst im Rahmen der MLPA Durchführung stellte sich die Pseudohomozygotie dieser beiden Patienten heraus. Es ist deshalb anzunehmen, dass in der Vergangenheit auch in anderen Arbeiten bei einigen

der als homozygot beschriebenen Mutationen tatsächlich eine Pseudohomozygotie durch eine nicht identifizierte große Deletion bestand.

Für eine komplette Aufklärung der hier erstmals beschriebenen großen Deletionen steht noch eine unabhängige Bestätigungsuntersuchung, z.B. eine Analyse der Bruchpunkte aus, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Es lagen außerdem keine Daten bezüglich des Vorkommens inhibitorischer Antikörper bei den Indexpatienten vor. Dies konnte in der Vergangenheit, allerdings bei homozygoten Trägern großer Deletionen, beobachtet werden (Shelton-Inloes et al. 1987, Ngo et al. 1988, Schneppenheim et al. 2007).

4.7. Splice Site Mutationen

Im Rahmen der Prozessierung werden aus der Prä-mRNA die Introns mittels Splicen entfernt und die jeweiligen Exons zusammengefügt. Für die Erkennung und den Beginn des Splice-Vorgangs ist die Basenabfolge, insbesondere an der Exon-Intron Grenze von Bedeutung. Entsteht durch Mutation im Intronbereich eine essenzielle Veränderung der Erkennungssequenz, können ein fehlender oder fehlerhafter Splice-Vorgang und somit ein Wegfall ganzer Exons oder Veränderungen der mRNA die Folge sein (http://ihg.gsf.de/ihg/patinfo/glossar_f.html, Löffler und Petrides 1998).

In mehreren Patientenkollektiven mit VWS Typ 3 konnten Splice Site Mutationen nachgewiesen (Zhang et al. 1994, Baronciani et al. 2003) und vereinzelt auch deren Auswirkung auf mRNA Ebene bestätigt werden (Mertes et al. 1994, Eikenboom et al. 1998).

Allgemein zeigen Splice Site Mutationen eine große Variabilität in der Auswirkung auf Proteinebene und so lassen sich durch alleinige Kenntnis der Mutation keine sicheren Rückschlüsse auf die Kausalität beim VWS Typ 3 ziehen.

Trotz Mutation kann ein normaler Splice Vorgang erfolgen, ebenso wie die Möglichkeit einer normalen Restsplicefunktion bei wirksamer und nachgewiesener Splice Site Mutation (Mertes et al. 1994). Desweiteren können bei Wegfall einer Splice Site alternative, kryptische Splice Sites erkannt werden. Dies kann wiederum zu einer Verkürzung/Verlängerung der mRNA und somit zu einer veränderten Proteinfunktion, Funktionslosigkeit des Proteins oder Abbau der mRNA führen. Bei genauer untersuchten Splice Site Mutationen bei VWS Typ 3 Patienten führte der Ausfall einer Splice Site zu einem Wegfall eines Exons und Aufgrund Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen STOPP-Kodon (Mertes et al. 1994, Eikenboom et al. 2001). Je nach Lokalisation und Basenanzahl kann der Wegfall eines Exons in einem eingeschränkten, funktionslosen, trunkierten oder fehlenden VWF resultieren. Allgemein können also Splice Site Mutationen für ein VWS Typ 3 ursächlich sein, bedürfen aber einer individuellen Betrachtung und gegebenenfalls weiterer Diagnostik.

Eine Möglichkeit der Einordnung von Mutationen im Intronbereich liefern Splice Site Prediction Programme. Mittels künstlicher neuronaler Netze (artificial neural network) können Angaben bezüglich Wahrscheinlichkeiten und Auswirkungen von Splice Site Mutationen gemacht werden (siehe auch 2.5). Neben diesen theoretischen Analysen können präzisere Aussagen nach Isolation und Replikation der mRNA und mittels in vitro Splicing Verfahren getroffen werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Eine Übersicht der in dieser Arbeit gefundenen Splice Site Mutationen ergibt Tabelle 9, gefolgt von einer individuellen Betrachtung der einzelnen Mutationen.

Intron	NT	Ref.
18	c.2442+4A>G	?
24	c.3223-1G>A	?
50	c.8155+3G>T	1
50	c.8155+6T>A	?

Tabelle 9: Übersicht Splice Site Mutationen NT: Nukleotid ?: bisher nicht veröffentlicht 1: Mertes et al. 1994

<u>c.2442+4A>G</u>

Eine Substitution von Adenin zu Guanin am 5'-Ende des Introns (Donor Splice Site) führt nach zwei Splice Site Prediction Programmen theoretisch zu einem Wegfall der Donor Splice Site (siehe auch Ergebnisse F8/II/1). Unter der Annahme eines dadurch verursachten Exon Skippings und somit Wegfall des Exon 18 und folgender Leserasterverschiebung, kann die Splice Site Mutation c.2442+4A>G als potentielle VWS Typ 3 verursachende Splice Site Mutation betrachtet werden. Ohne Analyse der Patienten-mRNA oder in vitro Splicing kann eine abschließende Beurteilung der potentiellen Splice Site Mutation jedoch nicht erfolgen.

<u>c.3223-1G>A</u>

Eindeutiger ist die Sachlage bei der Mutation c.3223-1G>A, die heterozygot bei einer Patientin identifiziert werden konnte, auch wenn für eine abschließende Beurteilung auch hier eine Analyse der Patienten-mRNA oder Kontrolluntersuchung mittels in vitro Splicing notwendig ist. Am 3' Ende des Introns 24, unmittelbar an dem Intron-Exon Übergang zu Exon 25, führt eine Substitution von Guanin zu Adenin laut aller verwendeter Splice Site Prediction Programme zu einem Wegfall derselben. Somit ist anzunehmen, dass das Exon 25 beim spleißen übersprungen wird und aufgrund der nicht durch drei zu teilenden Basenanzahl im Exon 25 eine Leserasterverschiebung mit konsekutivem Terminationskodon die Folge ist. Somit ist die Splice Site Mutation c.3223-1G>A mit oben genannter Einschränkung als kausal für das VWS Typ 3 zu erachten.

<u>c.8155+3G>T</u>

Eine Substitution vom Guanin zu Thymin am 5' Ende des Introns 50 führt laut Alternative Splice Site Predictor zu einem Wegfall der Splice Site, bei den anderen verwendeten Vorhersageprogrammen lediglich zu einer reduzierten Wahrscheinlichkeit, dass die Splice Site erkannt und genutzt wird. Bei einer Familie mit an VWS Typ 3 erkrankten Mitgliedern wurde diese Mutation von der Arbeitsgruppe um Mertes genauer untersucht. Es konnte durch Analyse von DNA und mRNA nachgewiesen werden, dass die Mutation c.8155+3G>T mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem Wegfall des Exons 50 und somit zu einem trunkierten und damit instabilen Protein führt. Außerdem ist dieser Genbereich aufgrund der Häufigkeit von Cystein für die Dimerisierung essenziell und 14 der 16 Cysteine sind in der Region bei dieser Mutation in dem Monomer nicht mehr enthalten (Mertes et al. 1994). Infolgedessen kann die Splice-Site Mutation c.8155+3G>T als kausal für das VWS Typ 3 betrachtet werden.

<u>c.8155+6T>A</u>

Ebenfalls im Intron 50, jedoch drei Basenpaare weiter, konnte die Mutation c.8155+6T>A bei einer Indexpatientin und deren Schwester homozygot und bei nachgewiesen deren Eltern heterozygot werden. Klinisch und gerinnungsdiagnostisch sind beide an einem Typ 3 VWS erkrankt. Zwei Vorhersageprogramme prognostizieren für diese Mutation einen Wegfall der Splice Site, NetGene2 eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit. Es würde entsprechend der Splice-Site Mutation c.8155+3G>T ebenfalls zu einem Exon Skipping von Exon 50 mit Leserasterverschiebung und trunkiertem Protein kommen, dass auch, sofern überhaupt sezerniert, eine fehlerhafte Dimerisierung zur Folge hätte. Demnach kann die Splice-Site Mutation c.8155+6T>A als potentiell kausal für ein VWS Typ 3 betrachtet, eine kryptische Splice Site oder Restfunktion jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch hier kann weitere Diagnostik z.B. mit in vitro Splicing oder Analyse von Patienten mRNA weitere Aufschlüsse geben.

4.8. Unvollständige molekulargenetische Befunde

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei 9 von 30 Indexpatienten lediglich eine relevante Mutation gefunden werden. Unter den zahlreichen möglichen Ursachen sollen einige im Folgenden kurz betrachtet werden.

Bei 2 der 30 Indexpatienten konnte eine Einordnung zum Typ 3 VWS nicht nachvollzogen werden und es erfolgte der Ausschluss aus der Studiengruppe. Auch bei den verbliebenen 9 Indexpatienten besteht die Möglichkeit, dass es sich tatsächlich um eine andere Unterform des VWS oder Gerinnungsstörung handelt. Jedoch ist aufgrund vorliegender diagnostischer Parameter die Diagnose VWS Typ 3 bei 6 Patienten als sicher zu betrachten, bei 3 Indexpatienten mit nur einer gefundenen Mutation waren keine Laborparameter einsehbar und es musste sich somit auf die Diagnosestellung durch das Einsendelabor bzw. Klinik verlassen werden. Insbesondere die Abgrenzung zu schweren VWS Typ 1 Formen ist hier aber nicht sicher möglich.

Gleichermaßen ist die Fehlerquelle Mensch als mögliche Ursache anzusehen. Von der Blutentnahme und Beschriftung bis hin zur übersehenen Mutation in der Auswertung können, trotz sorgfältigster Arbeitsweise, menschliche Fehler entlang der Arbeitsschritte mitverantwortlich für fehlende Mutationen sein.

Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass lediglich die Exons mit angrenzenden Intronbereichen untersucht wurden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass Mutationen z.B. in der Promotorregion oder im weiteren Intronbereich zu fehlender Transkription oder fehlerhaften Splicing Vorgängen führen können und in dieser Arbeit nicht erfasst wurden. Zum Beispiel konnten bei VWS Typ 1 Patienten Mutationen in der Promotorregion nachgewiesen werden (Goodeve et al. 2007b, James et al. 2007). Dies wäre auch bei VWS Typ 3 Patienten denkbar.

Nicht zuletzt können sich primär als Polymorphismus deklarierte Mutationen bei eingehender Untersuchung als genetisch und klinisch relevant herausstellen. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen und entsprechend der VWF Datenbank der Universität Sheffield als Polymorphismus beschriebenen Mutationen wurden als nicht kausal betrachtet. Eine gewisse Relevanz, insbesondere in Kombination mit weiteren Mutationen, lässt sich für die identifizierten "Polymorphismen" jedoch nicht sicher ausschliessen.

Ferner lässt die komplexe Proteinsynthese des VWF Raum für mögliche Fehlerquellen, die außerhalb des VWF-Gens zu suchen und zu finden sind. Weiterführende Forschungen entsprechend der oben aufgeführten Überlegungen hätten jedoch den Rahmen dieser Doktorarbeit überschritten.

4.9. Strategisches Vorgehen: Molekulargenetische Diagnostik des VWS Typ 3

Aufgrund der gesammelten Erfahrung im Rahmen dieser Doktorarbeit sowie neueren verfügbaren Analyseverfahren ist für die molekulargenetische Diagnostik des VWS Typ 3 sowohl bei einzelnen Patienten als auch bei größeren Kollektiven ein modifiziertes strategisches Vorgehen empfehlenswert. Begonnen werden sollte mit Analyseverfahren, die in der Lage sind, große Deletionen zu erfassen, z.B. das Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Verfahren. Verhältnismäßig einfach und kostengünstig können hierdurch größere Deletionen und Duplikationen des VWF-Gens erfasst werden. Eine Falschinterpretation im weiteren Verlauf bei Pseudohomozygotie kann ebenfalls verhindert werden. Im Anschluss daran ist ein Screening auf die

93

häufigste bisher bekannte Mutation c.2435delC sinnvoll. Falls durch diese beiden diagnostischen Schritte keine vollständige Aufklärung erreicht wurde, sollte bis zum Erhalt einer kausalen homozygoten bzw. compound heterozygoten Mutation(en) das restliche Gen sequenziert werden.

5. Zusammenfassung

Das von Willebrand Syndrom Typ 3 ist eine sehr seltene und schwere Form der Gerinnungsstörung, die autosomal rezessiv vererbt wird. Die Kenntnis von kausalen Genmutationen und Identifikation von heterozygoten Trägern ist für die Diagnostik und genetische Beratung der Patienten und deren Familien unerlässlich. Obwohl bereits zahlreiche Mutationen identifiziert wurden, ist das Wissen über das Mutationsspektrum des von Willebrand Syndroms Typ 3 in Deutschland bislang unzureichend.

In dieser Arbeit wurde Patienten-DNA von 30 Indexpatienten und teilweise deren Angehörigen mittels PCR, Sequenzierung, Klonierung sowie MLPA-Analyse auf Mutationen im VWF-Gen untersucht. Zwei der 30 Indexpatienten wurden im Verlauf anderen VWS-Typen zugeordnet. Bei den verbliebenen Patienten mit VWS Typ 3 konnten 35 unterschiedliche Mutationen identifiziert werden, die teilweise homozygot oder aber gehäuft auftraten. Davon sind 21 Mutationen in der Literatur bislang nicht bekannt und konnten somit erstmals bei Patienten mit VWS Typ 3 beschrieben werden. Außerdem bestätigte sich die Annahme eines heterogenen Mutationsspektrums bezüglich Mutationstyp und Lokalisation mit lediglich einzelnen Häufungen, wie z.B. der 1-Basendeletion c.2435delC.

Durch die Bestätigung bekannter Typ 3 Mutationen sowie der Identifikation von 21 neuen Mutationen, konnte ein Beitrag zum besseren Verständnis des VWS Typ 3 geleistet und ein umfassenderes Mutationsspektrum beschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

Abuzenadah AM, Gursel T, Ingerslev J et al., Mutational analysis of the von Willebrand factor gene in 27 families from Turkey with von Willebrand disease. Thromb Haemost 82 (supplement) (1999), 283.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR, A method and server for predicting damaging missense mutations, Nat Methods 7 (2010) 248-9.

Alexander B, Goldstein R., Dual hemostatic defect in pseudohemophilia. J Clin Invest 32 (1953), 551.

Allen S, Abuzenadah AM, Hinks J, Blagg JL, Gursel T, Ingerslev J, Goodeve AC, Peake IR, Daly ME, A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion, Blood, Vol 96, N 2 (2000a), 560-568.

Allen S, Abuzenadah AM, Blagg JL, Hinks J, Nesbitt IM, Goodeve AC, Gursel T, Ingerslev J, Peake IR, Daly ME, Two novel type 2N von Willebrand diseasecausing mutations that result in defective factor VIII binding, multimerization, and secretion of von Willebrand factor. Blood Vol 95 No 6 (2000b) 2000-7.

Bahnak BR, Lavergne JM, Rothschild C, Meyer D, A stop codon in a patient with severe type III von Willebrand disease, Blood 78 (1991), 1148-1149.

Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannucci PM, Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease, Thromb Haemost. 84 (2000) 536-540.

Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannuci PM, Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients, Blood Cells Mol Dis 30 (2003), 264-270.

Berber E, James PD, Hough C, Lillicrap D, An assessment of the pathogenic significance of the R924Q von Willebrand factor substitution, J Thromb Haemost 7 (2009), 1672-9

Bernard P, Couturier M, Cell Killing by the F Plasmid CccdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. J. Mol. Biol. 226 (1992), 735-745.

Bernard P, Gabant P, Bahassi EM and Couturier M, Positive Selection Vectors Using the F Plasmid ccdB Killer Gene. Gene 148 (1994), 71-74.

Berntorp E, Prophylaxis and Treatment of Bleeding Complications in von Willebrand Disease Type 3, Semin Thromb Hemost Vol.32 No 6 (2006) 621-5.

Berntorp E, Erik von Willebrand, Thrombosis Research 120 (2007), 3-4.

Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, Silva M, James P, A Prospective Evaluation of the Prevalence of Symptomatic von Willebrand Disease (VWD) in a Pediatric Primary Care Population, Pediatr Blood Cancer 55 (2010), 171-173.

Brunak S, Engelbrecht J, and Knudsen S: Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence, *J. of Molecular Biology*, 220 (1991), 49-65.

Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R, Laboratory Diagnosis of Congenital von Willebrand Disease, Sem in Thromb and Hemost, Vol 28 No 2 (2002), 173-89.

Budde U, Drewke E, Will K, Schneppenheim R, Standardisierte Diagnostik des von-Willebrand-Syndroms, Hämostaseologie 1 (2004) 12-26.

Budde U, Schneppenheim S, Abd-Müller HE, Dittmer R, Das erworbene von Willebrand-Syndrom. Medtropole 22 (2010) 826-829.

Casais P, Carballo GA, Woods AI, Kempfer AC, Farias CE, Grosso SH, Lazzari MA, R924Q substitution encoded within exon 21 of the von Willebrand Factor gene related to mild bleeding phenotype, Thromb Haemost 96 (2006), 228-30.

Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM, von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment, Haematologica, Vol. 88 (2003) 94-108.

Corrales I, Ramirex L, Altisent C, Parra R, Vidal F, Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene, Thromb Haemost, 101 (2009), 570-576.

Cumming A, Grundy P, Keeney S, An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. Thromb Haemost 96 (2006), 630-641.

Dalgleish R, *et al.*: Locus Reference Genomic sequences: an improved basis for describing human DNA variants. *Genome Medicine* (2010), 2:24.

den Dunnen JT, Antonarakis SE, Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion, Hum. Mutat. 15 (2000), 7-12.

Eikenboom JC, Castaman G, Vos HL, Bertina RM, Rodeghiero F. Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. Thromb Haemost. 79 (1998) 709-17.

Eikenboom JCJ, Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology, Best Pract Res Clin Haematol. 4(2) (2001) 365-79.

Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudmand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, Hilbert L, Mannucci PM. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. Blood 103 (2004) 127-34.

Frischmeyer PA, Dietz HC, Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease, Hum Mol Genet 8 (1999) 1893-900.

Gilbert W, Why genes in pieces? Nature 271 (1978) 501.

Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DR, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH, Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. Science 228 (1985), 1401-1406.

Ginsburg D, Sadler JE, von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions, and deletions. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms, and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost 69 (1993) 177-84.

Goodeve A, Peake I, A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms, Best Pr. & Res. Cl. Haematology, Vol. 14, No.2 (2001), 235-240.

Goodeve A, Genetics of type 1 von Willebrand disease, Curr Opin Hematol 14, (2007a), 444-449.

Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Redeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi Soteh M, Baronciani L, Hallden C, Guilliatt A, Lester W, Peake I, Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD), Blood 109, (2007b), 112-21.

Gupta PK, Saxena R, Adamtziki E, Budde U, Oyen F, Obser T, Schneppenheim R, Genetic defects in von Willebrand disease type 3 in Indian and Greek patients, Blood Cells Mol. Diseases (2008), 1-4.

Harbeck-Seu A, Molekulargenetik des schweren von Willebrand Syndroms Typ 3. Med Dissertation, Universität Hamburg (2010).

Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S, Splice site prediction in Arabidopsis thaliana DNA by combining local and global sequence information, *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No. 17 (1996), 3439-3452.

Hickson N, Hampshire D, Winship P, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, James P, Peake I, Eikenboom J,

Goodeve A, on behalf of the MCMDM-1VWD and ZPMCB-VWD Study Groups. von Willebrand factor variant p.Arg924Gln marks an allele associated with reduced von Willebrand factor and factor VIII levels. J Thromb Haemost 8 (2010), 1986-93

Hilbert L, Jenkins PV, Gaucher C, Meriane E, Collins PW, Pasi KJ, Mazurier C, Type 2M vWD Resulting from a Lysine Deletion within a Four Lysine Residue Repeat in the A1 Loop of von Willebrand Factor, Thromb Haemost 84 (2000), 188-94.

Hilbert L, Jorieux S, Proulle V, Favier R, Goudemand J, Parquet A, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C, Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity. Br J Haematol. 120 (4) (2003), 627-32.

James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D, The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study, Blood Vol 109 No.1 (2007), 145-154.

Kroner PA, Foster PA, Fahs SA, Montgomery RR, 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 Vol 87 No 3 (1996), 1013-1021.

Lester W, Guilliatt A, Grundy P, Enayat S, Millar C, Hill F, Cumming T, Collins P, Is VWF R924Q a benign polymorphism, a marker of a null allele or a factor-VIII-binding defect? The debate continues with results from the UKHCDOVWD study, Thromb Haemost 100 (2008), 716-718

Löffler G, Petrides PE, Gentechnik in: Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1998), 224-227, 249 – 251.

Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, Brown M, Morin MJ, Ling EH, Livingston DM, Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. Cell 41 (1985), 49-56.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG and Sadler JE, Structure of the Gene for Human von Willebrand Factor, J. Biol. Chem. 264 (1989), 19514-19527.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE, Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction, Biochemistry 30 (1991), 253-269.

Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio A, 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. Lancet (1977) 869-72.

Mannucci PM, Bloom AL, Larrieu MJ, Nilsson IM, West RR, Atherosclerosis and von Willebrand factor. I. Prevalence of severe von Willebrand's disease in western Europe and Israel. British Journal of Haematology 57 (1984), 163-169.

Mayadas TN, Wagner DD, Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992) 3531-5.

Mazurier C, Ribba AS, Gaucher C, Meyer D, Molecular genetics of von Willebrand disease, Ann Genet.41 (1998) 34-43.

Mertes G, Ludwig M, Finkelnburg B, Krawczak M, Schwaab R, Brackmann HH, Olek K. A G+3-to-T donor splice site mutation leads to skipping of exon 50 in von Willebrand factor mRNA. Genomics 24 (1994) 190-1.

Meyer D, Fressinaud E, Hilbert L, Ribba AS, Lavergne JM, Mazurier C, Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. Best Pract Res Clin Haematol 14 (2001) 349-64.

Michiels JJ, Budde U, van der Planken M, van Vliet HH, Schroyens W, Berneman Z., Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. Best Pract Res Clin Haematol. 14 (2001) 401-36.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, Nucl. Acids Res. Vol. 16 (1988), 1215.

Mohl A, Boda Z, Jager R, Losonczy H, Marosi A, Masszi T, Nagy E, Nemes L, Obser T, Oyen F, Radványi G, Schlammadinger Á, Szélessy ZS, Várkonyi A,Vezendy K, Vilimi B, Schneppenheim R, Bodó I. Common large partial VWF gene deletion does not cause alloantibody formation in the Hungarian type 3 von Willebrand disease population. J Thromb Haemost. Vol 9 Iss 5 (2011) 945-52.

Montgomery RR, Jozwiak MA, Hutter JJ, Endres JL, Foster PA, Friedman D, A homozygous variant of von Willebrand Factor (VWF) that fails to C terminal dimerize resulting in loss of VWF multimers larger than dimer. Blood 94 (1999) 443a.

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 (1986) Pt 1:263-73.

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Taschenlehrbuch Humangenetik, Thieme Verlag 2006, 49-50.

Ngo KY, Glotz VT, Koziol JA, Lynch DC, Gitschier J, Ranieri P, Ciavarella N, Ruggeri ZM, Zimmerman TS, Homozygous and heterozygous deletions of the

von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. Proc Natl Acad Sci U S A 85 (1988) 2753-7.

Nilsson IM, Blombäck M, von Francken I, On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemofiliglobulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. Acta Med Scand 159 (1957), 35-57.

Nilsson IM, The history of von Willebrand disease, Haemophilia 5 (1999), 7-11.

Nyman D, Eriksson AW, Blombäck M, Frants RR, Wahlberg P, Recent investigations of the first bleeder family in Aland (Finland) described by von Willebrand. Thromb Haemost 45 (1981) 73-76.

Peake IR, Liddell MB, Moodie P, Standen G, Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Sorace JM, Sadler JE, Verweij CL Severe type III von Willebrand's disease caused by deletion of exon 42 of the von Willebrand factor gene: family studies that identify carriers of the condition and a compound heterozygous individual. Blood 75 (1990) 654-61.

Piao YC, Lavergne JM, Girma JP, Rothchild C, Sie P, Vahnak BR, Meyer D, Study of the factor VIII-binding domain of von Willebrand factor in 55 patients with various types of von Willebrand disease. Thromb Haemost 69 (1993) 559.

Rhodeghiero F, Castaman G, Dini E, Epidemiological Investigation of the Prevalence of von Willebrand's Disease, Blood Vol. 69 No.2 (1987), 454-459.

Rick ME and Krizek DM, Identification of a His54GIn Substitution in von Willebrand Factor from a Patient With Defective Binding of Factor VIII, Am J Hematol. 51 (1996) 302-206.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS, Characterization of two Subtypes by Analysis of multimeric composition of Factor VIII/von Willebrand Factor in plasma and platelets, J.Clin Invest. Vol 65 (1980), 1318-25.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS, von Willebrand Factor and von Willebrand Disease, Blood Vol.70 No.4 (1987) 895-904.

Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW, Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci 82 (1985), 6394-6398.

Sadler JE, 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. Thromb Haemost. 71 (4) (1994) 520-5.

Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB, the Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J Thromb Haemost 4 (2006) 2103-14.

Saiki RK, Scharf S, Falcoona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N, Enzymatic Amplification of ß-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, Science 230 (1985), 1350-1354.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Biochemistry Vol. 74, No.12 (1977), 5463-5467.

Schneppenheim R, Krey S, Bergmann F, Bock D, Budde U, Lange M, Linde R, Mittler U, Meili E, Mertes G, Olek K, Plendl H, Simeoni E, Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population, Hum Genet 94 (1994), 640-652.

Schneppenheim R, Budde U, Krey S, Drewke E, Bergmann F, Lechler E, Oldenburg J, Schwaab R, Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1, Thromb Haemost 74 (1996), 598-602.

Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U, Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM, Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys-> Arg mutation in type IID von Willebrand disease, Proc Natl Acad Sci U S A. 93(8) (1996b) 3581-6.

Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Mainusch K, Ruggeri ZM, Schneppenheim S, Schwaab R, Oldenburg J, Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease, Blood Vol 97 No 7 (2001) 2059-66

Schneppenheim R, Molekulare Genetik des von-Willebrand-Syndroms, Hämostaseologie 1 (2004a) 37-43.

Schneppenheim R, Budde U, Klassifikation des von-Willebrand-Syndroms, Hämostaseologie 24 (2004b), 27-36.

Schneppenheim R, Lenk H, Obser T, Oldenburg J, Oyen F, Schneppenheim S,Schwaab R, Will K, Budde U. Recombinant expression of mutations causing von Willebrand disease type Normandy: characterization of a combined defect of factor VIII binding and multimerization. Thromb Haemost. (2004c) Jul;92(1):36-41

Schneppenheim R, Castaman G, Federici AB, Kreuz W, Marschalek R, Oldenburg J, Oyen F, Budde U, A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3. J. Thromb. Haemost. 5 (2007), 722-8.

Schneppenheim R, Michiels JJ, Obser T, Oyen F, Pieconka A, Schneppenheim S, Will K, Zieger B, Budde U. A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease: type 2A/IIE. Blood Vol 115 No 23 (2010), 4894-901. **Schouten JP,** McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligationdependent probe amplification, Nucl. Acids Res., Vol. 30 No.12 e57 (2002).

Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. J Clin Invest 79 (1987) 1459-64.

Shuman S, Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in Escherichia coli is Sequence Specific. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10104-10108.

Shuman S, Novel Approach to Melocular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase J.Biol. Chem. 269 (1994), 32678-32684.

Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F, Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score, Blood Reviews 21 (2007), 89-97.

Verweij CL, Vries CJ de, Distel B, Zonnenveld AJ van, Kessel AG van, Mourik JA van, Pannekoek H, Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. Nucleic Acids Res 13 (1985), 4699-4717.

Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD, Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation, The EMBO Journal 20 (2001), 2587-2595.

von Willebrand EA, Hereditär pseudohemofili, Finska Läkarsällskapets Handl 67 (1926), 7-112.

von Willebrand EA, Jürgens R, Über ein neues vererbbares Blutungsübel: Die konstitutionelle Thrombopathie. Deutsches Archiv Klin Med (Leipzig) 175: (1933) 453-483.

Voorberg J, Fontijn R, Calafat J, Janssen H, van Mourik JA, Pannekoek H, Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids.J Cell Biol. 113 (1991) 195-205.

Wagner DD, Cell biology of von Willebrand factor. Annu Rev Cell Biol 6 (1990), 217-246.

Wang M, Marin A, Characterization and Prediction of Alternative Splice Sites Gene 366 (2006) 219-227.

Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T, Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. J Clin Invest. 83 (1989), 288-97. **Werner EJ,** Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS; Shults J, Abshire TC, Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. J Pediatr 123 (1993), 893-8.

Zhang ZP, Falk G, Blombäck M, Egberg N, Anvret M, A single cytosine deletion in Exon 18 of the von Willebrand factor gen eis the most common mutation in Swedish vWD type III patients, Hum Mol Gen Vol.1, No.9 (1992), 767-768.

Zhang ZP, Blombäck M, Nyman D, Anvret M, Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Aland Islands. Proc Natl Acad Sci USA 90 (1993) 7937-7940.

Zhang ZP, Blombäck M, Egberg N, Falk G, Anvret M, Characterization of the von Willebrand Factor Gene (VWF) in von Willebrand Disease Type III Patients from 24 Families of Swedish and Finnish Origin, Genomics 21 (1994) 188-193.

Zhang ZP, Blombäck M, Anvret M, Understanding von Willebrand's disease from gene defects to the patients, J Intern Med Suppl. 740 (1997) 115-9.

Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE, Immunologic Differentiation of Classic Hemophilia (Factor VIII Deficiency) and von Willebrand's Disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. Journ of Clin Invest. Vol.50, (1971), 244-254.

Websites:

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi [zuletzt gesichtet am 2.3.2011, 9:30]

NetGene2 Server, Splice Site Prediction Service, Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark DTU http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/ [zuletzt gesichtet am 22.2.2012, 15:00]

Alternative Splice Site Predictor (ASSP) der Universität Sevilla, http://www.es.embnet.org/~mwang/assp.html [zuletzt gesichtet am 17.5.2011, 12:30]

Splice Site Prediction by Neural Network, Berkeley Drosophila Genome Project http://fruitfly.org/seq_tools/splice.html [zuletzt gesichtet am 17.5.2011, 12:00]

PolyPhen-2: Prediction of functional effect of human nsSNPs, Harvard University

http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml [zuletzt gesichtet am 25.5.2011, 17:15]

Glossar des National Human Genome Research Institute, National Institute of Health

http://www.genome.gov/glossary/ [zuletzt gesichtet am 23.5.2011 16:00]

Guidelines for mutation nomenclature der Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/mutnomen/standards.html [zuletzt gesichtet am 24.11.2014, 17:30]

Glossar des Instituts für Humangenetik München http://ihg.gsf.de/ihg/patinfo/glossar_f.html [zuletzt gesichtet am 10.1.2012,14:45]

Map Viewer des National Center for Biotechnology Information (NCBI) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/ [zuletzt gesichtet am 16.5.2011, 22:30]

VWF Online Datenbank der University of Sheffield http://www.vwf.group.shef.ac.uk [zuletzt gesichtet am 13.9.2012, 11:45]

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des VWF mit strukturellen und funktionellen Domänen.	8
Abbildung 2: Verteilung klinischer Symptome bei Patienten mit VWS Typ 3	. 20
Abbildung 3: Photodokumentation der Gelelektrophorese Exon 18	. 25
Abbildung 4: Ausschnitt Chromatogramm Pat.F4/II/1 Exon 43	. 26
Abbildung 5: Schematische Darstellung des VWF Gens und 253-kb Deletion	. 28
Abbildung 6: Photodokumentation der 253-kb Deletion Analyse	. 28
Abbildung 7: Verteilung der Mutationen	. 34
Abbildung 8: Sequenzierung Pat F1/II/1 Exon 7	. 35
Abbildung 9: Sequenzierung Exon 28 des Indexpatienten F2/II/1	. 36
Abbildung 10: Sequenzierung Exon 28 des Indexpatienten F2/II/1	. 37
Abbildung 11: Sequenzierung Exon 42 des Indexpatienten F3/II/1	. 37
Abbildung 12: Sequenzierung Pat. F4/II/1 Mutation c.8155+6T>A	. 38
Abbildung 13: Nachweis c.8155+6T>A bei F4/I/1 und F4/I/2	. 39
Abbildung 14: Nachweis c.8155+6T>A bei F4/II/2	. 39
Abbildung 15: Stammbaum der Familie F4	. 40
Abbildung 16: Sequenzierung Pat 5/II/1 Exon 14 mit Deletion c.1636delG	. 40
Abbildung 17: Sequenzierung Pat F6/II/1 Exon 8 und Exon 31	. 41
Abbildung 18: Sequenzierung F6/II/2 Exon 8 und Exon 31	. 42
Abbildung 19: Sequenzierung F6/I/1 Exon 8 und Exon 31	. 42
Abbildung 20: Sequenzierung F6/I/2 Exon 8 und Exon 31	. 42
Abbildung 21: Stammbaum der Familie F6	. 43
Abbildung 22: Sequenzierung Pat F7/II/1 Exon 26	. 43
Abbildung 23: Sequenzierung Pat F7/II/1 Exon 44 mit Deletion c.7483delC	. 44
Abbildung 24: Sequenzierung Pat F8/II/1 Exon 18	. 44
Abbildung 25: Sequenzierung Pat F8/II/1 Exon 21	. 45
Abbildung 26: Sequenzierung Pat F10/II/1 Exon 18	. 46
Abbildung 27: Sequenzierung Pat F11/II/1 Exon 18	. 47
Abbildung 28: Sequenzierung Pat F12/II/1 Exon 44	. 48
Abbildung 29: Sequenzierung Pat F13/II/1 Exon 17	. 49
Abbildung 30: Auszug aus dem MLPA Report des Indexpatienten F13/II/1	. 50

Abbildung 31: Sequenzierung Pat F14/II/1 Exon 17	50
Abbildung 32: Sequenzierung F14/I/1 mit Mutation c.2269_2270delCT	51
Abbildung 33: Stammbaum der Familie F14	51
Abbildung 34: Sequenzierung Pat F15/II/1 Exon 28 mit Mutation c.4636delG	52
Abbildung 35: Sequenzierung Pat F16/II/1 Exon 26 mit Mutation c.3518C>T	53
Abbildung 36: Sequenzierung Pat F17/II/1 Exon 18 mit Mutation c.2435deIC	54
Abbildung 37: Sequenzierung Pat F18/II/1 Exon 25 mit Mutation c.3360G>A	55
Abbildung 38: Sequenzierung Pat F18/II/1 Exon 43 mit Mutation c.7300C>T	56
Abbildung 39: Sequenzierung Pat F19/II/1 mit Mutation c.3771_3772deIGT	56
Abbildung 40: Sequenzierung Pat F19/II/1 Exon 52 mit Mutation c.8255G>A	57
Abbildung 41: Sequenzierung Pat F20/II/1 Exon 18 mit Mutation c.2435delC	58
Abbildung 42: Sequenzierung Pat F21/II/1 Exon 9 mit Mutation c.1093C>T	58
Abbildung 43: Sequenzierung Pat F20/II/1 Exon 28 mit Mutation c.4570delG	59
Abbildung 44: Auszug aus dem MLPA Report des Indexpatienten F22/II/1	60
Abbildung 45: Sequenzierung Pat F23/II/1 Exon 19 mit Mutation c.2451T>A	61
Abbildung 46: Sequenzierung Pat F24/II/1 Exon 45 mit Mutation c.7651C>T	62
Abbildung 47: Sequenzierung Pat F25/II/1 Exon 9 mit Mutation c.1051delG	63
Abbildung 48: Sequenzierung Pat F25/II/1 Exon 50	64
Abbildung 49: Sequenzierung Pat F26/II/1 Exon 25	65
Abbildung 50: Sequenzierung Pat F26/II/1 Exon 36	66
Abbildung 51: Sequenzierung Pat F27/II/1 Exon 52	67
Abbildung 52: Sequenzierung Pat F28/II/1 Exon 44	68
Abbildung 53: Sequenzierung Pat F28/II/1 Exon 51 mit Mutation c.8216G>A	69
Abbildung 54: Sequenzierung Pat F29/II/1 Exon 44 mit Mutation c.7483delC	69
Abbildung 55: Sequenzierung Pat F31/II/1 Exon 36	70
Abbildung 56: Auszug aus dem MLPA Report des Indexpatienten F31/II/1	71
Abbildung 57: Sequenzierung Pat F32/II/1 Exon 22	72
Abbildung 58: Sequenzierung Pat 32/II/1 Exon 28 mit Mutation c.4251delG	73
Abbildung 59: Mutationsspektrum	75

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der Indexpatienten	. 21
Tabelle 2: Übersicht der Mutationen aller Indexpatienten	. 34
Tabelle 3: Übersicht kleiner Deletionen	. 77
Tabelle 4: Übersicht Duplikationen	. 78
Tabelle 5: Übersicht Insertionen	. 79
Tabelle 6: Übersicht Nonsense Mutationen	. 80
Tabelle 7: Übersicht Missense Mutationen	. 82
Tabelle 8: Übersicht große Deletionen	. 88
Tabelle 9: Übersicht Splice Site Mutationen	. 90
7.3. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff				
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit				
CK	Cysteine knot				
dATP	Desoxyadenosintriphosphat				
dCTP	Desoxycytidintriphosphat				
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin				
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat				
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatograp				
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat				
DNA	Deoxyribonucleic acid				
dTTP	Desoxythymidintriphosphat				
ER	Endoplasmatisches Retikulum				
FVIII:C	Faktor VIII Aktivität				
Gp	Glykoprotein				
kb	Kilo Basen				
kDa	Kilo Dalton				
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification				
mRNA	Messengerribonucleic acid				
PCR	Polymerase Chain Reaction				
RIPA	Ristocetin-induced platelet aggregation				
VWD	von Willebrand Disease				
VWF	von Willebrand Faktor				
VWF:Ag	von Willebrand Faktor Antigen				
VWF:CB	von Willebrand Faktor Collagen Bindungskapazität				
VWF:FVIIIB	Faktor VIII Bindungsaktivität des VWF				
VWF:RCo	Ristocetin-Cofaktoraktivität				
VWS	von Willebrand Syndrom				
WT	Wildtyp				

7.4. Material- und Geräteliste

Arbeitsschritt/Funktion	Name	Hersteller	Ort
DNA-Extraktion	Wizard genomic DNA Purification Kit	Promega	Madison, USA
OD-Messung	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
PCR	0,2 ml Tube Plate (96 Platte)	Peqlab	Erlangen
PCR	8er Domed Cap Strips	Peqlab	Erlangen
Pipetten		Eppendorf	Hamburg
Filter Tips	Biosphere Pipettenspitze mit Filter	Sarstedt	
Destilliertes Wasser	Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen
DNA-Synthetase	Taq DNA-Polymerase	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Synthetase	Advantage GC2-Polymerase	Clontech	
PCR	dNTPs	Peqlab	Erlangen
Thermocycler	T-Gradient	Biometra	Göttingen
Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra	Göttingen
Thermocycler	T1-Thermocycler	Biometra	Göttingen
Schüttler	Mini-shaker	Adolf Kühner AG	Basel, CH
Elektrophoresekammer	Gel Electrophoresis Apparatus GNA	Pharmacia Fine Ch.	Schweden
DNA-Leiter	Gene Ruler 100bp DNA-ladder	MBI Fermentas	Litauen
Aufreinigungssäulen	Ultrafree-DA	Millipore	
Stromquelle	Powerpack P25	Biometra	Göttingen
UV-Lichttisch	Transilluminator TR 302 nm UV	Spectroline	
Kamerarechner	The Imager	Appligene	
Fotokammer	Universal UV/WL Cabinet	Appligene oncor	
Zentrifuge	EBA 12R	Hettich-Zentrifugen	Tuttlingen
Sequenzierung			
Cycler	Trio Thermoblock	Biometra	Göttingen
SEQ Kit	ABI Prism Big Dye Terminator Cycle	Applied Biosystems	Foster City, USA
SEQ Master Mix	GOTaq Green	Promega	Madison, USA
SEQ -Puffer	Sequencing Buffer	Applied Biosystems	Foster City, USA
Aufreinigung der SEQ-Pr.	DyeEx 96 Kit	Qiagen	
Sequencer	ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Foster City, USA
Sequencer	ABI-Prism 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Foster City, USA
Klonierung			
Cloning Kit	TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen	Karlsruhe
Brutschrank		Heraeus Instruments	
Wasserbad		Wilke Med Technik	Hamburg
Nährmedium	S.O.C. Medium	Invitrogen	Karlsruhe
LB-Agar		Invitrogen	Karlsruhe
MLPA	SALSA MLPA Kit P011-B1 VWF	MRC-Holland	Amsterdam, NL
MLPA	SALSA MLPA Kit P012-B1 VWF	MRC-Holland	Amsterdam, NL

	Primer für das VWF-Gen		PCR	SEQ		
Exon	Sense (5'3')	Antisense (5'3')	TA (°C)	TA (°C)	bp	no.
2	GTCCATGTTCAAAGGGGGAAA	GGCAGGAATGAGAAATGGAG	60,9	52	~240	Ex2sn_new/Ex2asn_new
ß	CTAATTTCTACGAGGCCAGAGAGG	CAGCCCTCCTGAAGTCC	59	52	295	Ex3sn2/Ex3asn2
4+5	CTGCTGAGAAAGGTTACG	CCAAGGATAAGGTTGGC	53,4	52	~850	130/131
4 ASN		TTTGCTTCCATTCTCGGGC	10 0	52	n/a	
9	AACACACAAAACCACCAGC	GATCCAGAAATCACACCC	55,2	52	~250	214/215
7	AGGGAGACACTAACGGAGCA	TGTGGTAAAGCCGCACATAC	53	52	~390	Ex7sn_new/Ex7asn_new
8	CATGGCTGGTGAGATGATGC	TGATCTGTAAATAAGTGGG	55,2	52	~200	168/Ex8asn_new
6	GAAGAAACCCAACCATTGTCCC	AGTCCCCAGGCAGGTCTCC	62,8	52	~260	62/63
10	TTTGGGGACTGTGATAACTACC	GGAAGGAAGAAGAATGAGCG	57,1	52	~170	138/139
11	GTCCATGCAGTTTTGGGGGAAGG	AGCAGCCGGGCTGGCAAAGC	62,8	52	~270	209/806
12	TITICTCTGATTAAGAGGGTCCTGGG	TTGAGAAGGAGGGTGCTAAGGG	62,8	52	~290	807/210
13	CCAAATACATCTGCCTGCCACC	TCTTCTCCCACCACACAAGCC	66,5	52	300	158/159
14	CCAGAGTGGCCTGGTCTCC	TGGAGACCTCGAGATTCTGCG	62,8	52	~265	254/Ex14asn1
15	CTCCTCCCCACCACATCCCAGG	CAGGAAACAACGCAGAGAAAGG	55	52	~350	160/161
16	TCCTTGCTGTCCAACATTCCCG	Getetettittagageteec	66,5	52	~325	166/167
17	GTGGAGGCAGCGAGTATAGACG	GTGAGGAATCTGGGCAGGATGG	67,6	52	~200	174/175
18	AAAGGACAGTGTGGAAGGTAGG	тептавесеттептеттетете	64,7	52	~325	136/Ex18asn2
19	AGGGCTTTAGATCAGTCACTGTGGCCCT	TGGCCGCGTGCACCCTCACTCCACC	89	52	~235	42/43
20	TETETETTCETTCATTGECTEC	ACCCTCCTAGAAGAACAGC	62,8	52	~265	182/183
21	AATCTTCTGGTCTGGTGAGAGC	CATCCTCTTTAATGGCTGTGCG	57,1	52	~320	198/199
22	GTAGAGTGGAGGGAGGATCTGG	AGCAAGTCCTTAGAGACCTACG	66,5	52	~310	201/202
23	TETTCCCCTTCCCCTGAGCCG	AGAGGGACATTCCAGGAAGCAAGCTCTA	64,7	52	~270	694/695
24	TAACCCCAGTTTGACCAGCTG	ACTCTGTGTCCATACCACCA	55,2	52	~225	776/290
25	CAGAGTCTAGGCCCTATTCTC	CCATCCAGTCCCTACTAACACT	57,1	52	~790	Ex25sn new/Ex25asn new
26	GTCCTGGAGGCTTTGCCTG	TGACTCTGATGAAGGAACCCAC	53,4	52	~360	561/562
27	TAGTTAAAAATGAGGCTTCCT	CAATAAGATTCATCACTTCAAACAAC	55,2	52	~250	563/564
28	TCACTTGGATGTGGAATGGTCC	GTATCTTGGCAGATGCATGTAGC	65,4	60	~1600	24/133
Ex28 544	AGGCCTGGTGGTGCCTCCC			60	n/a	
Ex28 583	ATCGACCGCCTGAAGCCTC			60	n/a	
Ex28 132	ATGGTTCTGGATGTGGCGTTC	GTATCTTGGCAGATGCATGTAGC	65,4	60	653	132/133
Ex28 seq24	CAACCTGGTCTACATGGTCAC			52	n/a	

7.5. Primerliste

			Concession of the local division of the loca			
	Primer für das VVVF-Gen		PCR	SEQ		
Exon	Sense (5'3')	Antisense (5'3')	TA (°C)	TA (°C)	рр	no.
29	TGTGCTCACCTTCCTGGTTG	TTTTGAATCAAGTAGAGCCA	55,2	52	~200	150/151
30	AAATAATCCGCATTITCTC	TAGCCCCTCACTTTCCAGGA	52	52	305	234/235
31	ACCGTTAAGACAGGGTGTC	ACCAGGACAGAGGTTGGTAT	59	52	~335	Ex31sn new/149
32	сстиситетстивста	CCATGAACAGAAACTTAAAG	53,4	52	~355	146/147
33	CCACCTCAGCCTCATGTCCCTAT	GCCCCAACACATCTCTAAC	59	52	262	565/566
						Ex34sn_new/Ex34asn_ne
34	GGTCTTAGTCCAGTGCTTCGTT	CCACTGCTATACCCTGAATAGAC	57,1	52	~555	W
35	CATGGGGGTTTGGATAACGTCG	ACTAAAGCAACTGCCACCAGG	60,9	52	354	207/208
36	ATTGCTAGGACTACGGATGAGC	AAGAGCCTCAGAGTAGAGC	57,1	52	~310	205/275
37	CAATGTITITGTACCCAGGG	TGGTCTCCAGGATTTTCAGAGG	57,1	52	~440	276/206
38	AGCTGTGCCCATTTCACTCTGG	AGCCCCATGGGAAGTGAAAGGC	60'9	52	~295	203/204
39	TCGTACCTAGAATGTCCTGTG	AGTGTITGAGTCTGCTCTGCCA	60,9	52	~210	124/125
40	CAAATCCCTCTGAGGCTGTC	AGARACETTTCAGRACETTCA	59	59	~750	Ex40sn_new/Ex40asn_ne
41	GAGTAACCTTTCTGAACTCTGC	ATCTTGGAAGAGGTCCCTGAGG	62,8	52	~200	120/121
9			C L	Ę	0	Ex42sn_new/Ex42asn_ne
42	AGIGCICAGIGIGGCCIIGI	CIGATAGTTAATAGCCAAGCAGTCC	59	7.9	~26U	W
43	GCGGCTTCTGTGTAGTAGGTGC	TACCCTTCCTAAGATGCCCTCC	66,5	52	307	74/75
44	GTAAGAGCCCTGTGTCTTTGC	AAACCAAGGTCAACGCTGGTCC	60,9	52	~240	313/314
45	ACCACCTTCCTGAGAGAAGAGC	AGCCAAAAGTGGAAAGAGAGGC	64,7	52	~335	Ex45sn2/65
2000			30 54 00 COS	1000	0.00000	Ex46sn_new/Ex46asn_ne
46	GGT CTC ACC AGG GTG TGT TT	GGG TCT CTC TGG TTT CCT TC	57,1	52	~200	W
47	TGAGTGGGGGGTTGGGGGGATGCT	GTCCAGTCCATGCCCTCGGTCC	64,7	52	~210	555/558
48	ACTGGATAAGAGAGATGAGAGG	AGATGGTGATATGTGAGGGGGGC	59	52	$^{-240}$	114/115
48 INT SN	GCCAGCAAAATCAGCCTACTTAC			52	n/a	Ex 48 INT sn
49	ACACTGTCTCGACTITACC	GAGACAGTAAAGAGGAAAGC	53,4	52	~200	110/279
50	GAGTTCGGAGCTAAAAATTGGC	TTGCTAATGGGTTTCAAGGAG	55,2	52	~230	280/111
50 INT SN	GGAGTGACCTGAAAGCTGTCTAC			52	n/a	
51	ACCTATTTCCAGCCCAGTGAGG	CACCCAGCCCTTATTGAAGC	57,1	52	~220	108/281
52	GACTTCCCACCATTGTGAGGC	GTGCTTCCTTCGGAACCGG	59	52	~450	282/Ex52 asn2

7.6. Rezepte

]	Bestandteil	Menge	Hersteller
	H20 Aqua dest.	39,8 µl	Braun
atz 1	10x CETUS Puffer	5 μl	
Ansa	dNTP's	<u>1 μ</u> Ι	PeqLab
0 µl	MgCl2	1 µl	Merck
CR 5	Primer SN (1:10 verd)	1.μl	
ΥE Đ	Primer ASN (1:10 verd)	1 µl	
8	Taq-Polymerase	0,2 μl (1 Unit)	Invitrogen
	DNA	1 µl (ca100 ng)	
l l	H20 Aquadest.	21 µl	Braun
Ξ	GoTaq GREEN	25 µl	Promega
R 50	MgCl2	1 µl	Merck
F P C Ansa	Primer SN (1:10 verd)	1 µl	
M I	primer ASN (1:10 verd)	1 µl	
	DNA	1 μl (ca100 ng)	
	HESM*	45 ul	Invitrogen
n 28	Primer SN (1:10 verd)	1 ul	
R48 rExo L+2	Primer ASN (1:10 verd)	1 ul	
F PC z für Teil 1			
WW Insat	DNA	1 µl (ca 100 ng/µl)	
٩.,	°HFSM: High Fidelity SuperMix		
	H20 Aqua dest.	 18 µl	Braun
10	GC Melt Solution	15 µl	Clontech
hd n 15	10x CETUS Puffer		s.o.
R 45 r Exo	dNTP's	1 µl	PeqLab
tr P(PrimerSN (1:10 verd)	1 µl	
WW	Primer ASN (1:10 verd)	1 µl	
ৰ	GC2 Polymerase Mix	1 µl	Clontech
	DNA	2 µl (ca 100 ng)	
4	H2O AquaDest	11 µl	Braun
ung:	Big Dye (BD)	1 µl	Applied Biosystems
F 20 nzier satz	HT-Buffer	3 ul	Applied Biosystems
VW an	Primer (1:10 verd)	1 µl	
ŝ	PCR Produkt	4 ul	

	Bestandteil	Menge	Hersteller
	H2O Aqua Dest	13 ul	Braun
ungs 2	Big Dye (BD)	0.5 ul	Applied Biosystems
F 20 nzier satz	HT-Buffer	3.5 ul	Applied Biosystems
VWI ane an:	Primer (1:10 verd)	1 ul	
Se	PCR Produkt	2 μl	
	H20 Aqua dest.	35 ul	Braun
	PCR Puffer	5 ul	
2.5	MgCl2	2,5 µl	Merck
etio	dNTPs	1μl	PeqLab
o Del Se Al	Primer reverse 1	1 µl	
53.kt naly	Primer reverse 2	1 µl	
25 A	Primer forward	2 µl	
	Taq-Polymerase	0,2 µl	Invitrogen
	DNA	1 µl	-
	Denaturation & Hybridisation	-	
	DNA Arbeitslösung	5 µl (50-100 ng)	
	MLPA buffer	1,5 µl	MRC-Holland
	Probemix	1,5 µl	MRC-Holland
	Ligation reaction		
	Ligase-65 buffer A	ЗµI	MRC-Holland
ion	Ligase-65 buffer B	<u></u> ЗµI	MRC-Holland
eald	H20 Aqua dest.	25 µl	Braun
ILPAR	Ligase-65	1.µl	MRC-Holland
zept	PCR reaction		37 77.7577777777777777777777777777777777
Re	SALSA PCR buffer	4.μl	MRC-Holland
	H20 Aqua dest.	26 µl	Braun
	Ligation product	10 µl	
	SALSA PCR-primers	2.µl	MRC-Holland
	SALSA Enzyme dilution buffer	2.µl	MRC-Holland
	H20 Aqua dest.	5,5 µl	Braun
	SALSA Polymerase	0,5 µl	MRC-Holland

7.7. PCR- und Sequenzierprogramme

	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
	Ĩ.	95 °C	Pause
oxon (8)	2	95 °C	5 min
ofür E 5 & 2)		95 °C	40 s
Tamir Ex 1	35 Zyklen	TA*	30 s
Prog		72 °C	1 min
PCR- 52 (a	4	72 °C	5 min
VWF 2-	5	4 °C	Pause
	°T∆:Annealing Temperatur 52 bis 68 ℃		
	1	96 °C	Pause
Ę	2	96 °C	3 min
ogran 15		96 °C	30 s
R-Pro Exon	35 Zyklen	60 °C	30 s
VEPC		68 °C	3 min
Ş	4	68 °C	7 min
	5	4°C	Pause
	1	95 °C	Pause
u u	2	95 °C	5 min
rogra		95 °C	40 s
CR-P Ir Exo	50 Zyklen	65,4 °C	30 s
WFP		68 °C	1 min 20 s
>	4	68 °C	7 min
	5	4 °C	Pause
	2	95 °C	5 min
amm		95 °C	30 s
Progr b Delk lyse	35 Zyklen	61 °C	30 s
PCR- 53-kl Ana		72 °C	30 s
VWF für 2	4	72 °C	5 min
	5	4 °C	Pause

	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
	1	95 °C	Pause
-sâu	2	95 °C	5 min
dieru m 1		95 °C	30 s
uen: jram	50 Zyklen	TA*	30 s
Seq		60 °C	4 min
WF	4	4 °C	Pause
	° TA: Annealing Temperatur 52 bis 63 °C		
	Ĩ	95 %	Pausa
- 55		95°C	Fause
2 2	۷۲	95 C	20 ¢
enzie mm	35 Zyklen	55 C	20.5
ogra		1A 60 °C	30 S
MF Si Pi		00°C	41000 Pausa
5	7		Fause
	* TA: Annealing Temperatur 52 bis 63 °C	1	122
	DNA Denaturierung	98°C	5 min
		25 ° C	Pause
	Hybridisierung	95 °C	1 min
tion		60 °C	Pause (16-20 h)
Reak	Ligation	54 °C	Pause
PAF		54 °C	15 min
IMn		98 °C	5 min
ramı		15 °C	Pause
prog	PCR Reaktion	60 °C	Pause
		95 °C	30 s
	35×	60 °C	30 s
		72 °C	60 s
		72 °C	20 min
		15 °C	Pause

7.8. Elektronische Hilfsmittel

Adobe Reader 9, Adobe Systems Incorporated, USA

Microsoft Office Excel, Powerpoint und Word, Version 2007, Microsoft Corporation, USA

PED4-Stammbaumprogramm, erstellt von Dr.med Hansjörg Plendl (1999), lizensiert für die Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Windows Fotogalerie, Microsoft Corporation, USA

7.9. MLPA Report für die Indexpatienten F13/II/1, F22/II/1 und F31/II/1

F13/II/1

	r. 5																			乱	1			- Code
D-77971 k	Cippe	nhei	m																100.00				1	-
www.jsi-m	iedisy	/s.de	3																			I.	1	-
							Μ	LP	A	F	RE	P	0	RI	2									
Patient: P.	000	5									Pa	atI	D: (0005				Fa	amil	y IE) :			
Order No:	1101	1700	14 (DNA	No	o: 00	005)				Sa	ampl	e Sr	C:				Pr	ojec	t:				
Assigned by	: Oye	n, Fic	rian								Da	ate o	of as	signm	ent: (01/17	7/201	1						
Results: P011-81 P012-81	(000) delet delet delet (000) delet delet	5_P01 ion ion 5_P01 ion ion	I-81_U 2-81_U	I_P).fi I_P).f	sa sa					01/ VW VW 01/ VW	17/20 IF IF IF 17/20 IF	11 11	Ger E50 E53 Ger E51 E42	ne vs c) } he vs c }	641 641				178 232 418 202 355					
Resultfile:	(000)	5_P01	1-81_1	J_P).fr	58		3	P011-8	1	01/	17/20	11 00	:42:0	0	1	total p	eak a	rea:	3	0170	31		_	
Control: Control: Control:	(K00) (K00) (K00)	3_P01 4_P01 5_P01	1-81_0 1-81_0 1-81_0	J_C).f J_C).f J_C).f	58 58			P011-8 P011-8 P011-8	1 1	01/ 01/ 01/	17/201 17/201 16/201	11 01 11 00 11 23	:53:0 :06:0 :30:0	0		compl compl compl	TV TV TV	oyer oyer	(01/ (01/ (01/	17/20 17/20 17/20	011 1 011 1 011 1	10:58 10:59 10:59	1:23] 9:01] 9:29]	
Analysis Mod	le: Gen	e vs c	tri			4																		
3.00 2.25 1.50		= 0.4	Ē			I	Ť.	- Î		m	Ē.	-			-	En.	dan (1	-		F	T.		ф.
0.75	337	8	10 9	355	214	202	100	98	18	153	247	352	10	283	208	3	319	58	146	274	168	232	178	418
0.75	337	128	424 240	355	214	202	168	9%	228	153	247	362	181	283	208	a.	319	266	146	274	391	232	178	418
0.75 150 % 125 % 100 % 	337	138	20 F	355	1 214	202	8	**	1 236	153	247	362	2	1 160	1 208	2	319	266	146	274	168	222	178	418
0.75 150 % 125 % 100 % 75 % 50 %	E02 0 337	E05	83 S.	E09	E09 II 214	E13 E1 202	E14 E1 168	E18 346	E23	E24 1 153	E28 🔳 247	E28 1 362	E33 10 184	E34 E 285	E38 1 208	E30 134	E42 319	E43 E 266	E45 148	E46 E 274	Edit II 391	E49 232	E50 178	418 418
0.75 150 % 125 % 100 % 75 % 50 % Resultfile:	ED2 E02	Sca 2, P01:	89 59 98 80 2-81_L	↓ ¥	E E09 II 214	E13 202	E14 E 168	98 98 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 1	E23 E 236	\$	829	873 11 03	25 E 23 241:0	C E34 E 285 E34 E 10 400	E38 1 208	at a state of the	E42	543 E43	E45 146	*//Z B*2 6260	1 13	E49 232	E50 178	E52 418
0.75 150 % 125 % 100 % 75 % 50 % So % Resultfile: Control: Control: Control:	(x00) (x00) (x00) (x00) (x00) (x00)	5_P01: 5_P01: 5_P01:	80 50 2-81_U 2-81_U 2-81_U 2-81_U	I	E 88 E 514	E13 E1 202	E14 0 100	P012-8 P012-8 P012-8 P012-8	E23 E 236	123 E34 01/ 01/ 01/	17/201 17/201 17/201	873 111 03 111 04 111 02	2 52:0 ::41:0 ::52:0 ::16:0 ::29:0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	E38 1 208	total ;	616 Peeak a TV TV	997 In rea: cyter cyter	87 101/ 101/ 101/	17/24 17/24	13 111 10111	10:54 10:56 10:57	82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83	E52 418
0.75 150 % 125 %	(0000 (K00) (K00) (K00)	8 8 8 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	88 5 2-81_L 2-81_L 2-81_L 2-81_L 1 1 1 1	I_P).ft	E 214 E E E E E E E E E E E E E E E E E E E	E13 E1 202	Ela Ela	P012-8 P012-8 P012-8 P012-8	E23	87 87 01/ 01/ 01/ 01/ 01/	17/201 17/201 17/201	472 472 111 03 111 04 111 02	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	E38 1 208	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	645 TV TV	997 In 1997 Coyer Coyer	왕 (01/ (01/ (01/	17/24 17/24	58 10 11 10 11 11 10 11 11	10:54 10:56 10:57	82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83	E52 418
0.75 150 % 125 % 100 % 75 % 50 % Resultfile: Control: Control: Control: Control: Analysis Mod	(K00) (K00) (K00) (K00)	8 8 8 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	\$\$ \$ 80 8 2481_L 2481_L 2481_L 2481_L 141	1	21 2 214 E09 II 214	E13 E1 202	14 E	P0128 P0128 P0128	1 1 1 238	123 123 123 123 123 123 123 123 123 123	17/201 17/201 17/201	873 111 03 111 04 11 02	2 2 2 2 2 2 2 2 9 0		E38 1 208	interest of the second	615 TV TV TV	Citeration	2 (01/ (01/	17/24 17/24		10:54 10:54 10:57	8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	E52 418



F22/II/1

Friedhofs	tr. 5			110 -
D-77971	Kippenheim			
www.jsi-n	nedisys.de			~
	MLPA	REP	ORT	
Patient: P	2-K225	Pat	ID: K225	Family ID:
Order No	: 111290012 (DNA No: K225)	Samp	le Src:	Project:
Assigned b	y: Oyen, Florian	Date	of assignment: 05/0	09/2011
Results:				
P011-B1	(K225_P011-B1_U_P).fsa	05/06/2011	Gene vs ctrl	
	deletion	VWF	E05	128
	deletion	VWF	E39	134
	deletion	VWF	E45	146
	deletion	VWF	E24	153
	deletion	VWF	E36	160
	deletion	VWF	E14	168
	deletion	VWF	E50	178
	deletion	VWF	E33	184
	deletion	VWF	E13	202
	deletion	VWF	E38	208
	deletion	VWF	E09	214
	deletion	VWF	E23	226
	deletion	VWF	E49	232
	detetion	VWF	E20	247
	deletion	VWF	E43	200
	deletion	VIVE	EVE	205
	deletion	MALE	E94	283
	deletion	VWF	E06	310
	deletion	VWF	E42	319
	deletion	VWF	E02	337
	deletion	VWF	E18	346
	deletion	VWF	E08	355
	deletion	VWF	E20	365
	deletion	VWF	E28	382
	deletion	VWF	E47	391
	deletion	VWF	E52	418
P012-B1	(K225_P012-B1_U_P).fsa	05/06/2011	Gene vs ctrl	
	deletion	VWF	E12	130
	deletion	VWF	E40	135
	deletion	VWF	E28	146
	deletion	VWF	E29	152
	deletion	VWF	E32	160
	detetion	VWF	EZZ	172
	detetion	VWF	E27	1/8
	deletion	VIVE	ETS EF4	104
	deletion	WWF	EAT	202
	deletion	VWE	E04	214
	deletion	VWF	E37	223
	deletion	VWF	E01	232
	deletion	VWF	E21	247
	deletion	VWF	E17	256



F31/II/1

Friedhofs	str. 5			in the second second		
D-77971	Kippenheim					
www.jsi-r	nedisys.de			**		
	MLP	A REP	ORT			
Patient: F	2-HA8404	Pat	ID: HA8404	Family ID:		
Order No	: 111290011 (DNA No: HA8404)	Samp	le Src:	Project:		
Assigned b	y:	Date	of assignment:	an the second second		
Results:						
P011-B1	(HA8404_P011-B1_U_P).fsa	05/06/2011	Gene vs ctrl			
	deletion	VWF	E39	134		
	deletion	VWF	E45	146		
	deletion	VWF	E36	160		
	deletion	VWF	E14	168		
	deletion	VWF	E50	178		
	deletion	VWF	E33	184		
	deletion	VWF	E13	202		
	deletion	VWF	E38	208		
	deletion	VWF	E09	214		
	deletion	VWF	E23	226		
	detetion	VWF	E49	232		
	deletion	VWF	E26	247		
	detetion	VWF	E43	256		
	deletion	VWF	E02	205		
	deletine	VIE	E40	202		
	delation	VWF	EOG	310		
	deletion	VWF	F42	319		
	duplication	VWF	E02	337		
	deletion	VWF	E18	346		
	deletion	VWF	E08	355		
	deletion	VWF	E20	365		
	deletion	VWF	E28	382		
	deletion	VWF	E47	391		
	deletion	VWF	E52	418		
	multiple copies	VWF	E06	425		
P012-B1	(HA8404_P012-B1_U_P).fsa	05/06/2011	Gene vs ctrl			
	deletion	VWF	E12	130		
	deletion	VWF	E40	135		
	deletion	VWF	E28	146		
	deletion	VWF	E29	152		
	detetion	VWF	E32	160		
	detection	VWF	EZZ	172		
	deletion	VIVE	E2/	104		
	deletion	VIVE	E19 E51	202		
	deletion	VWF	F41	208		
	deletion	VWF	E37	223		
	deletion	VWF	E21	247		
	deletion	VWF	E17	256		
	deletion	VWF	E31	274		
	deletion	VWF	E44	283		
	deletion	WWE	E47	292		

- Page 1 -

software version: SeqPilot 3.3.9

print date 5/13/2011



8. Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie Bereitstellung der Mittel möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim bedanken. Ihre Ratschläge, Geduld und Unterstützung haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Herrn Florian Oyen sowie Tobias Obser und stellvertretend allen Mitarbeitern des gesamten Labors gebührt mein außerordentlicher Dank, ohne deren geduldige Anleitung und Hilfestellung die praktische Labortätigkeit und Interpretation der Ergebnisse nicht möglich gewesen wäre. Meiner Familie und Freunden bin ich für die Liebe und Unterstüzung zu

unvergesslichem Dank verpflichtet.

9. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Matthias Baumeister