

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

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

Klinikdirektor
Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schneppenheim

Molekulargenetik des schweren von Willebrand Syndroms Typ 3

Dissertation

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

vorgelegt von:

Anja Harbeck-Seu
Duisburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.06.2010**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. U. Budde

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. A. Gal

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	5
I.1	Zur Historie des von Willebrand Syndroms	5
I.2	Pathophysiologie des von Willebrand Syndroms	6
I.3	Biosynthese und Funktion des von Willebrand Faktors	6
I.4	Klassifikation des von Willebrand Syndroms	8
I.4.1	Von Willebrand Syndrom Typ 3	9
I.5	Epidemiologie	9
I.6	Fragestellung	10
II.	Methoden	11
II.1	Patienten	11
II.2	Studiendesign	11
II.3	Material	12
II.4	DNA-Extraktion	12
II.5	Polymerase-Ketten-Reaktion	13
II.6	Gelelektrophorese	14
II.6.1	Polyacrylamidgelelektrophorese mit Silbernitratfärbung	15
II.6.2	Agarosegelelektrophorese	16
II.7	Sequenzierung	16
II.8	Restriktionsenzymverdau	18
II.9	Heteroduplexanalyse	18
II.10	DHPLC-Analyse	18
II.11	Klonierung	19
III.	Ergebnisse	21

III.1	Nomenklatur	23
III.2	Ergebnisse der Indexpatienten und ihrer Verwandten	26
IV.	Diskussion	54
IV.1	Kausalität der Mutationen	56
IV.2.1	Deletionen	55
IV.2.2	Insertionen	57
IV.2.3	Duplikation	57
IV.2.4	Nonsense-Mutationen	58
IV.2.5	Splice-Site-Mutationen	60
IV.3	Missensemutationen	63
IV.4	Familienanalyse	69
IV.5	Schlussfolgerung	76
V.	Zusammenfassung	80
VI.	Literaturverzeichnis	81
VII.	Anhang	91
VII.1	Abbildungsverzeichnis	91
VII.2	Abkürzungsverzeichnis	92
VII.3	Material-und Geräteliste	93
VII.4	Rezepte	94
VII.5	PCR- und Sequenzierprogramm	96
VII.6	Oligonukleotide	96
VII.7	Elektronische Hilfsmittel	98
VII.8	Patientendaten	99
VII.9	Danksagung	100
VII.10	Lebenslauf	101
VII.11	Eidesstattliche Versicherung	102

I. Einleitung

I.1. Zur Historie des von Willebrand Syndroms

Das von Willebrand Syndrom (VWS) wurde zum ersten Mal durch Erik Adolf von Willebrand im Jahre 1926 beschrieben. Er beobachtete mehrere Mitglieder einer Familie vom Åland Archipel vor der Küste Schwedens, die an einer kongenitalen Blutungskrankheit litten (*von Willebrand. 1926*). Er stellte fest, dass ein autosomaler Vererbungsmodus vorlag, da Frauen ebenfalls von dieser Erkrankung betroffen waren. Er bezeichnete diese Blutungsneigung als „hereditäre Pseudohämophilie“ (*von Willebrand. 1926*), als Abgrenzung zur X-chromosomal vererbten klassischen Hämophilie und im Hinblick auf die gemeinsam verstärkte Blutungsneigung. Im Rahmen der Ursachenforschung wies eine Arbeitsgruppe aus Schweden im Jahr 1957 nach, dass die Symptome rückläufig waren, nachdem die Patienten mit normalem Blutplasma substituiert wurden. Daraus wurde geschlossen, dass den Patienten ein Plasmafaktor fehlen müsste (*Nilsson et al. 1957*). Desweiteren wurde in den 50iger Jahren beobachtet, dass Patienten mit einem VWS eine erniedrigte Konzentration des Gerinnungsfaktors VIII (FVIII) im Plasma aufwiesen (*Alexander und Goldstein 1953, Larrieu und Soulier 1953, Quick und Hussey 1953*). Die erhöhte Blutungsneigung als auch die geringe FVIII-Konzentration konnte durch die Applikation von partiell gereinigten FVIII -Präparaten korrigiert werden (*Nilsson et al, Nilsson et al beide 1957*). Die Abweichungen konnten sogar durch Gabe von aufgereinigtem Plasma von Hämophiliepatienten, behoben werden (*Nilsson et al, Nilsson et al beide 1957*). Diese Beobachtungen unterstützten die Vermutung, dass ein eigenständiges Protein im Blut unabhängig vom FVIII fehlen müsste (*Cornu et al. 1963*).

Dieses Protein wurde im Jahr 1971 immunologisch erkannt und wegen seiner Bindung an den FVIII damals als „Faktor VIII-assoziiertes Antigen“ bezeichnet (*Zimmerman et al. 1971*). Die Aufklärung der Gensequenz (*Sadler et al., Lynch et al., Ginsburg et al., Verweij et al. alle 1985*) und der Aminosäuresequenz (*Titani et al. 1986*) führten zu neuen Erkenntnissen bezüglich des Aufbaus dieses Proteins, das „von Willebrand Faktor“ (VWF) genannt wurde. Die anfangs unterschiedlichen Bezeichnungen der Erkrankung wie zum Beispiel

Pseudohämophilie, konstitutionelle Thrombozytopathie oder vaskuläre Hämophilie demonstrieren nicht nur das wachsende Verständnis für das VWS, sondern auch die verschiedenen klinischen Phänotypen (*Budde und Schneppenheim 2001*).

I.2 Pathophysiologie des von Willebrand Syndroms

Das VWS (McKusick MIM # *193400), mit autosomalem Erbgang, ist die am häufigsten vererbte Erkrankung im hämorrhagischen Formenkreis (*Rodeghiero et al. 2001*). Es ist charakterisiert durch eine große Heterogenität, die darauf basiert, dass der VWF mehrere Aufgaben besitzt, komplexen posttranslationalen Prozessierungsschritten unterliegt und auf verschiedenen Wegen freigesetzt wird (*Schneppenheim et al. 2001b*). Aus diesem Grund setzt sich diese Heterogenität hinsichtlich der klinischen Symptome und ihrer Laborparameter fort (*Budde and Schneppenheim 2001*). Das VWS zeichnet sich durch eine verlängerte Blutungszeit aus, wobei sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase, abhängig vom Defekt des VWF, gestört sein können. Die Blutungen betreffen zum großen Teil Schleimhäute (*Castaman et al. 2003*), sodass es u.a. im Rahmen von Zahnextraktionen, Tonsillektomien, Geburten und Menstruationen zu klinisch relevanten Blutungen kommen kann.

I.3 Biosynthese und Funktion des von Willebrand Faktors

Dieser wird in Endothelzellen und in Megakaryozyten synthetisiert (*Jaffe et al. 1974 und Nachman et al. 1977*). Das VWF-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 (12 p13.3) (*Shelton-Inloes et al. 1987, Mancuso et al. 1989*) und umfasst 179 kb mit 52 Exons (*de Wit et al. 2001*). Es kodiert für ein Vorläuferprotein, Prä-Pro-VWF, mit 2813 Aminosäuren (*Titani et al. 1986*). Der Prä-Pro-VWF besteht aus einer Signalsequenz (22 Aminosäuren), aus einem VWF-Propeptid (741 Aminosäuren) und aus dem reifen VWF (2050 Aminosäuren). Dies deutet an, dass der Prä-Pro-VWF zwei proteolytischen Schritten unterzogen wird (*de Wit et al. 2001*). Der Pro-VWF (VWF-Propeptid + reifer VWF) setzt sich aus vier repetitiven Domänen, die jeweils in zwei bis fünf Kopien vorliegen, zusammen –D1-D2-D´-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-,

die jeweils homolog zueinander sind (*de Wit et al. 2001*). Hinzu kommt die cysteinreiche CK-Domäne am Carboxyterminus. Der VWF unterliegt einer umfangreichen posttranslationalen Modifikation, sodass zum Schluss ein multifunktionales hochmolekulares Glykoprotein vorliegt. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Abspaltung des Signalpeptides des Prä-Pro-vWF durch eine Signalpeptidase (*de Wit et al. 2001*), woraus der Pro-VWF hervorgeht. Es folgen 12 N-Glykosylierungen und 10 O-Glykosylierungen der Pro-VWF-Monomere (*Titani et al. 1986*) und Dimerisierungen jeweils an den C-terminalen Enden durch Disulfidbrückenbildungen (*Sadler. 1998*). Anschließend werden bis zu 50 Pro-VWF-Dimere im Golgiapparat durch Disulfidbrückenbildung im N-terminalen-Ende der D3-Domäne polymerisiert, woraus 500-20000 kD große VWF-Multimere hervorgehen (*Ruggeri et al. 1992*). Während der Wanderung durch das Trans-Golgi-Netzwerk des Golgi-Apparates werden die Pro-VWF-Multimere durch eine Furinprotease in reife VWF-Multimere und VWF-Propeptide gespalten (*de Wit et al. 2001*) und verbleiben zumindest intrazellulär nicht-kovalent assoziiert (*Denis. 2001*).

Die größten VWF-Multimere als auch VWF-Propeptide werden in Endothelzellen in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen gespeichert (*Wagner et al 1991*). Der endotheliale VWF kann über den konstitutiven oder über den regulatorischen Sekretionsweg freigesetzt werden. Der Letztere funktioniert über einen Stimulus-induzierten Mechanismus, z. B. durch Thrombin, Histamin, Vasopressin (*Sadler. 1998*). Der VWF in Thrombozyten wird in α -Granula gespeichert und nach Aktivierung freigesetzt (*Zucker et al. 1979*).

Die zwei wesentlichen Funktionen des VWF bestehen zum einen in der Thrombozytenadhäsion/-aggregation und zum anderen in der Interaktion mit FVIII.

➤ Thrombozytenadhäsion/ -aggregation:

Thrombozyten werden durch Mediatoren, die durch verletztes Endothel freigesetzt werden, u.a. durch VWF, aktiviert. Die initiale transiente Plättchenadhäsion wird durch Bindung von immobilisiertem VWF und dem

Plättchenrezeptor GpIb vermittelt. Dies ist der wichtigste Schritt für die Entstehung eines Thrombus unter Einfluss hoher Scherkräfte.

Die irreversible Fixierung erfolgt über Thrombozyten-Thrombozyten-Bindungen durch $Gp\alpha_{Ib}\beta_{IIIa}$ -Rezeptoren (*Ruggeri. 2001*). Die Thrombozytenaggregation findet durch Bindungen zwischen den Plättchenrezeptoren $Gp\alpha_{Ib}\beta_{IIIa}$ und VWF/Fibrinogen statt (*Budde et al., Ruggeri. beide 2001*). Der VWF ist das einzige adhäsive Protein, das die Thrombozytenadhäsion/-aggregation unter hohen Scherkräften mediiert, sodass er speziell im arteriellen Gefäßbett für die primäre Hämostase von Bedeutung ist (*Weiss et al. 1989*).

➤ Interaktion mit FVIII:

Der VWF bildet mit FVIII einen nicht-kovalenten Komplex (*de Wit et al. 2001*). Der VWF spielt eine Schlüsselrolle bezüglich der Funktionen, Produktion und Stabilisierung des FVIII sowie der Konformation und Immunogenität. Er schützt ihn vor vorzeitigem Abbau z.B. durch Erhöhung der Empfindlichkeit bezüglich der Thrombinaktivierung, bzw. durch Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber Inaktivierung durch aktiviertes Protein C. Fehlt der VWF so werden ebenfalls die Funktionen des FVIII in Mitleidenschaft gezogen, sodass eine gestörte sekundäre Hämostase daraus resultiert. Zusätzlich verfügt der VWF noch über Bindestellen für Kollagen und Heparin (*de Wit et al. 2001*).

I.4 Klassifikation des von Willebrand Syndroms

Es werden ausschließlich Blutungsstörungen als „von Willebrand Syndrom“ bezeichnet, die durch einen molekularen Defekt des VWF-Gens verursacht werden (*Sadler. 1994*) Das VWS wird in drei primäre Hauptklassen unterteilt. Es basiert auf zwei quantitativen Klassen, nämlich einer partiellen Reduktion des VWF beim VWS Typ 1, einem absoluten Fehlen des VWF beim VWS Typ 3 und einer Klasse mit qualitativen Defekten beim VWS Typ 2. Das VWS Typ 2 wird weiterhin in vier Subtypen (2A, 2B, 2M und 2N), die auf Defekten der verschiedenen Genotypen basieren, eingeteilt. Diese sechs Klassen (VWS Typ 1,3 und 2A, 2B, 2M und 2N) korrespondieren mit bestimmten pathophysiologischen Mechanismen und sollen mit den jeweiligen

klinischen Symptomen und therapeutischen Konsequenzen korrelieren (*Sadler, 1998*).

I.4.1 Von Willebrand Syndrom Typ 3

Das VWS Typ 3 stellt die schwerste Form des VWS dar. Es wird autosomal rezessiv vererbt, sodass entweder eine compound Heterozygotie bzw. eine Homozygotie für eine spezifische Mutation vorliegt. Beim VWS Typ 3 sind entweder nur Spuren oder praktisch kein VWF nachweisbar.

Entsprechend entfallen sämtliche Funktionen, die der VWF innehat. Dies führt somit zu Störungen sowohl der primären als auch der sekundären Hämostase. Daraus resultieren typische Laborbefunde wie eine verlängerte Blutungszeit, prolongierte aPTT und stark erniedrigte Konzentrationen im Plasma für VWF:Ag unter der Nachweisgrenze und FVIII:C mit einem Median von 3%

(*Schneppenheim et al. 1994*). Aus diesem Grund kann es nicht nur in den oberflächlichen Schleimhäuten zu gefährlichen Blutungen kommen, sondern auch in den tieferen Geweben sowie Einblutungen in Gelenke und Muskeln. Phänotypisch ist das VWS Typ 3 folglich aufgrund des homogenen Bildes relativ leicht zu diagnostizieren, im Gegensatz zur genotypischen Diagnosesicherung, weil die molekularen Defekte im gesamten VWF-Gen vorkommen können.

I.5 Epidemiologie

Das VWS ist die häufigste hereditäre Hämostasestörung mit einer Prävalenz von ungefähr 1-2%, wie in mehreren epidemiologischen Studien festgestellt wurde (*Budde et al. 2001*). Die Prävalenz der klinisch-relevanten Fälle des VWS in der Population wurde hingegen nur auf ungefähr 1 Fall auf 10 000 Einwohner geschätzt (*Castaman et al. 2003*). Das VWS Typ 3 kommt im Vergleich zum VWS Typ 1 und VWS Typ 2 am seltensten vor. Es wird für den Typ 3 eine Prävalenz von 0,1 bis 5,3 pro 1 Million Einwohner berichtet (*Eikenboom et al. 2001*); in Deutschland wurde eine Prävalenz von $2/10^6$ Einwohner festgestellt (*Lenk et al. 1988*). Die Prävalenz des VWS Typ 3 variiert beträchtlich zwischen den verschiedenen Ländern. Der höchste Anteil

wird in den arabischen Ländern festgestellt und der niedrigste in Südeuropa (*Eikenboom et al. 2001*).

Das VWS Typ 3 weist, entsprechend dem autosomalen Vererbungsmodus eine gleichmäßige Verteilung zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht auf (*Eikenboom et al. 2001*).

I.6 Fragestellung

Diese Studie wurde zur Identifikation des Spektrums der VWS Typ 3 Mutationen in Deutschland, zum Erfassen einer eventuellen Clusterbildung spezifischer VWS Typ 3 Mutationen und der Lokalisierung typischer VWS Typ 3 Mutationen auf dem VWF-Gen durchgeführt.

Die hohe Relevanz einer genaueren Kenntnis des von Syndroms Typ 3 ergibt sich aus der Schwere des Erkrankungsbildes. Auf Basis der Gendiagnostik werden, neben Bestätigung der Diagnose, v.a. asymptotische heterozygote Anlageträger identifiziert, wodurch eine genetische Beratung im Rahmen der Familienplanung überhaupt erst ermöglicht wird.

Abschliessend stellte sich die Frage, ob sich eine Screening Strategie ableiten ließe.

II. Methoden

II.1 Patienten

Es wurden 23 Indexpatienten mit einem VWS Typ 3 untersucht.

Die DNA der Indexpatienten und der Verwandten stammt aus der Diagnostik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie sowie aus dem Gerinnungslabor von Herrn Prof. Dr. med. U. Budde (Hamburg) als auch aus weiteren Einsendekliniken aus Deutschland und Belgien.

Die Patienten bzw. ihre Eltern gaben ihr Einverständnis, dass die Rest-DNA nach Abschluß der Routineuntersuchungen zur Gendiagnostik genutzt werden dürfe.

Für weitere Daten zu den Patienten siehe im Anhang (VII.8 Patientendaten s.S. 99).

Die Bestimmung der VWF:Ag-Konzentration erfolgte im hämatologischen Labor von Prof. Dr. Schneppenheim und im Labor von Prof. Dr. Budde.

Nicht in allen Fällen lagen anamnestische Daten bezüglich einer erhöhten Blutungsneigung vor.

Die Patienten stammen aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands bis auf vier Ausnahmen. Es kamen jeweils zwei Indexpatientinnen aus Belgien, eine aus Polen und eine ursprünglich aus Marokko.

Die DNA der Patienten wurde im Zeitraum von 1993 bis 2002 gesammelt.

II.2 Studiendesign

Im ersten Schritt wurde ein Screening des Exon 18 durchgeführt, weil in diesem Bereich eine häufige Mutation c.2435delC beschrieben wurde (*Zhang et al. 1992, Schneppenheim et al. 1994*).

Da ein besonderes Verteilungsmuster der molekularen Defekte beim VWS Typ 3 nicht bekannt ist, wurden im weiteren Verlauf bei allen Patienten, die die Mutation im Exon 18 nicht aufwiesen bzw. heterozygot dafür waren, die Exons 2 bis 52 mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Bei heterozygoten numerischen Sequenzabweichungen wurde ausserdem eine Klonierung durchgeführt, um die Sequenzvariante eindeutig charakterisieren zu können. Eine Klonierung musste ausgeführt werden, weil das Sequenzierergebnis sequenzspezifisch ist und nicht allelspezifisch, d.h. es werden bei der Visualisierung der Basensequenz sowohl das Allel des Vaters als auch der Mutter direkt übereinanderliegend abgebildet, so dass es bei heterozygoten numerischen Abweichungen zu einer Verschiebung der allelspezifischen Chromatogramme zueinander kommt. Folglich kann das Ergebnis nicht mehr eindeutig interpretiert werden.

Die identifizierten Mutationen wurden anschließend mit einer 2. unabhängigen Methode bestätigt.

Diese bestand entweder aus einer Darstellung mittels eines Restriktionsenzymverdaus (REV) oder einer Heteroduplexanalyse visualisiert über die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), oder mittels der denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC , **nicht** Bestandteil der Arbeit) mit dem WAVE-System (s.u.).

Nach Identifikation von Sequenzvarianten wurden auch verwandte Personen untersucht, sofern ihre DNA vorhanden war.

II.3 Material

Nähere Angaben zu Gerät- bzw. Gerätetypbezeichnungen, Herstellername und Medien, die im Methodenteil erwähnt werden, werden im Anhang aufgelistet (VII.3 Material- und Geräteliste, s.S.93)

Die Rezepturen (Konzentration und Menge) und die Programme der Thermocycler für die PCR- bzw. Sequenzierreaktionen werden ebenfalls dort aufgeführt

(VII.4 Rezepte, s.S. 95, VII.5 PCR-und Sequenzierprogramm, s.S.96).

II.4 DNA-Extraktion

Die genomische DNA wurde aus kernhaltigen Leukozyten extrahiert.

Maßgeblich waren, mit Ausnahme leichter Änderungen, die

Protokollbedingungen des Wizard Genomic DNA Purification Kits (s.VII.3 Material- und Geräteliste, s.S.93).

Die Isolierung der DNA erfolgt aus EDTA-Blut und besteht im Wesentlichen aus vier Schritten (*Miller et al. 1988*).

Zunächst erfolgen zwei Lyseschritte, erstens Lyse der Erythrozyten durch Cell Lysis Solution und zweitens Lyse der Leukozyten und ihrer Zellkerne durch die Nuclei Lysis Solution. Für den 1. Schritt wird bis zu 3 ml EDTA-Blut mit der Cell Lysis Solution gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wird ein Zentrifugationsschritt ausgeführt, um die Leukozyten zu isolieren.

Der Überstand wird verworfen, wobei das sichtbare Pellet (sedimentierte Leukozyten) resuspendiert wird, um anschließend im 2. Schritt mit der Nuclei Lysis Solution versetzt zu werden.

Im 3. Schritt werden zelluläre Proteine durch die Protein Precipitation Solution gefällt. Dabei werden die Protein Precipitation Solution und das nukleäre Lysat zusammengegeben, gevortext und zentrifugiert. Zum Schluß wird der Überstand zur Fällung der DNA mit Isopropanol gemischt und wieder zentrifugiert.

Nach der Zentrifugierung wird der Überstand verworfen und das Pellet (genomische DNA) mit 70% Ethanol gewaschen. Es folgt ein letzter Zentrifugierschritt, wonach das Ethanol vorsichtig entfernt wird. Das Pellet wird nun getrocknet und dann mit der DNA Rehydration Solution rehydriert.

Dieser letzte Schritt dient der Befreiung der DNA von Salzen und gleichzeitig ihrer Konzentrierung.

II.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Technik, die es erlaubt, eine große Anzahl an Kopien eines spezifischen DNA-Abschnittes auf einfache Art und Weise zu amplifizieren (*Saiki et al. 1985*).

Das Prinzip der PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Primerannealing und aus einer Synthesephase.

Diese Schritte werden zyklisch durchlaufen. Die in den ersten Zyklen gewonnenen PCR-Produkte dienen ebenfalls als Matrize, sodaß es zu einer exponentiellen Zunahme der Anzahl der Vervielfältigungen kommt.

Um eine PCR durchzuführen, müssen die Sequenzanteile bekannt sein, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich am 5´- bzw am 3´-Ende flankieren, damit die Primer (Oligonukleotide) generiert werden können.

Die Primersequenzen für die Exons 2 bis Exon 52 wurden der Literatur entnommen (*Mancuso et al. 1989*) bzw. aus der genomischen Sequenz ausgewählt (Genbank No. NT_009759) .

Die Annealingtemperatur der Primer bewegte sich im Rahmen von 52°C bis 68°C.

Im menschlichen Erbgut ist auf Chromosom 22 ein VWF-Pseudogen vorhanden, das zum einen keine Funktion innehat bzw. aus dem kein funktionelles Transkript hervorgehen kann (*Mazurier et al. 1998*) und zum anderen den Exons 23 bis 34 des VWF-Gens zu 96,9% homolog ist (*Mancuso et al. 1991*).

Es wurden Oligonukleotide ausgewählt, deren komplementäre Sequenzen im VWF-Gen in Bereichen lagen, die sich hinsichtlich der Sequenz des Pseudogens unterschieden, um eine versehentliche Vervielfältigung des Pseudogens zu verhindern (*Mancuso et al. 1991*). Die Selektivität der Primer wurde durch PCR der DNA eines Patienten mit einer homozygoten Deletion des VWF-Gens überprüft.

II.6 Gelelektrophorese

Aufgrund der Eigenschaft, dass DNA eine negative Ladung hat, lassen sich DNA-Abschnitte in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe auftrennen. Die Laufeigenschaften sind abhängig von folgenden Parametern: Molekulares Gewicht der DNA, Lade- und Laufpuffer, Konzentration der jeweiligen Gelart und der eingestellten Spannung. Die Materialien Polyacrylamid und Agarose bilden eine netzartige Gitterstruktur, durch die die DNA-Moleküle größenabhängig wandern.

Für kleinere Fragmente von bis zu 1000 Basenpaaren nutzt man die Polyacrylamidgele, während für längere Abschnitte die weitmaschigeren Agarosegele verwendet werden (*Stryer. 1996*).

II.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Silbernitratfärbung

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) dient der Erfolgskontrolle der PCR (*Budowle et al. 1991*).

In dieser Arbeit wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel gegossen (VII.4 Rezepte, s.S.94). Das Gel wurde in eine Glasapparatur gegossen, die folgenden Aufbau hatte. Eine Trägerfolie wurde an den zwei kürzeren Seiten und an einer längeren Seite randständig mit jeweils 6 mm breiten Platzhaltern bestückt, die anschließend zwischen zwei Glasplatten gespannt wurde. Auf einer Glasplatte waren Kunststoffplatzhalter (2 Tesastreifen übereinander geklebt, ca. 0,2mm x 0,3mm), die die Slots für die PCR-Produkte im Gel bildeten. Durch die Platzhalter ist ein 0,4 mm hoher Raum entstanden, in den das Gel gegossen wurde, um zu polymerisieren.

Nach der Polymerisierung, die ca. 30 min benötigte, konnte die Trägerfolie mit dem Gel aus der Glasapparatur entnommen werden. Es wurde nun auf die gekühlte (8°C) Elektrophoresegrundplatte gelegt. Im Weiteren wurden jeweils 1,6 µl der PCR-Produkte auf der kathodennahen Seite aufgetragen.

Anschließend wurden Filterpapierstreifen in 1x Tris-Borsäure-Puffer (Elektrodenpuffer) getränkt und an den längeren Seiten des Geles randständig aufgelegt, um ein insgesamt elektrisch-leitfähiges Feld (Kathode→ PAA-Gel→Anode) aufzubauen.

Die PCR-Produkte wurden bei ca. 15 W über einen Zeitraum von ca. 20 min aufgetrennt.

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte durch die anschließende Silbernitratfärbung (*Budowle et al. 1991*).

Zuerst wurden nach der Elektrophorese die PCR-Produkte mittels einer vergällten Ethanollösung für ca. 5-10 min fixiert, dann wurden sie mit einer HNO₃-Lösung oxidiert. Für ca. 30 min wurden die Produkte anschließend mit einer Silbernitratlösung inkubiert. Der folgende Schritt bestand aus einer Reduktionsphase durch eine Natriumbikarbonat- und Formaldehydlösung bis die PCR-Banden sichtbar waren. Die Reduktion wurde durch Essigsäure gestoppt.

II.6.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Aufreinigung der PCR-Produkte, d.h. der Trennung von unspezifischen Produkten und überschüssigen Oligonukleotiden für die anschließende Sequenzierung. Durch das elektrische Feld werden die PCR-Produkte aufgetrennt.

Im Folgenden wird die Herstellung eines Agarosegels erklärt.

Es wurde ein 1,2%iges Agarosegel angefertigt, das aus Agarose, 1x TAE-Puffer und Ethidiumbromid bestand.

Das Gel wurde auf eine Trägerplatte, das mit Kämmen bestückt war, gegossen.

Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen Gel-Loading-Puffer versetzt.

Der Träger mit dem Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt, in der sich 1x TAE-Laufpuffer befand. Die Auftrennung lief bei 200 V mit einer Laufzeit von ca. 20-25 min.

Als Größenorientierung wurde eine 100 Basenpaarleiter aufgetragen.

Durch die Bindung des Ethidiumbromids an die DNA fluoreszieren die PCR-Produkte unter UV-Licht orange.

Nach der Elektrophorese wurden die Proben auf einem UV-Lichttisch ausgeschnitten und über eine Millipore Ultrafree Zentrifugationseinheit gereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde im Tube aufgefangen, wohingegen die Agarose in der Filtermembran hängen blieb.

II.7 Sequenzierung

Die Funktion der Sequenzierung liegt in der exakten Analyse der Basenabfolge, in dem DNA-Abschnitt, der zu analysieren ist (*Sanger et al. 1977*).

Es wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (*Sanger et al. 1977*) in einer modifizierten Weise eine Cycle-Sequenzierung durchgeführt.

Die Veränderung bestand u.a. darin, hitzestabile DNA-Polymerase zu benutzen, wodurch doppelsträngige DNA, generiert durch die PCR, eingesetzt werden konnte und nur eine geringe Probenmenge vorhanden sein musste.

Der Sequenzieransatz erfolgte unter Verwendung des ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zunächst denaturiert, sodaß einzelsträngige DNA-Abschnitte vorlagen.

Diese DNA-Abschnitte dienten als komplementäre Matrize und wurden mit dem Primer hybridisiert. Als Primer dienten die PCR-Primer sowohl in 5'- als auch in die 3'-Richtung (Annealingtemperatur: 52°C- 63°C).

Für die Synthese des komplementären Stranges durch die DNA-Polymerase mussten sich im Sequenzieransatz die vier Basen als 2'-

Desoxyribonucleosidtriphosphate befinden sowie eine geringe Menge von 2'3'-Dideoxyribonucleosidtriphosphaten, den vier Basen entsprechend.

Der Einbau eines 2'3'-Dideoxynalogons (Terminator) durch die DNA-Polymerase, das für die Matrize komplementär war, führte zum sequenzspezifischen Kettenabbruch, weil keine freie 3'-OH-Gruppe für die weitere Verknüpfung mit 2'-Desoxynukleotiden vorhanden war. Auf diesem Weg entstanden unterschiedlich lange DNA-Stränge, die je nach sequenzierter Richtung jeweils am 5'-Ende oder am 3'-Ende identisch waren, jedoch hinsichtlich ihrer Basenlänge variierten.

Aufgrund der Verwendung hitzestabiler Polymerase konnte die doppelsträngige DNA-Matrize mehrmals denaturiert werden, so dass zum einen eine geringe Probenmenge ausreichend war und zum anderen das Annealing der Primer und die DNA-Synthese bei so hohen Temperaturen stattfinden konnte, die eine Renaturierung verhinderten.

Die Sequenzierreaktionen wurden, vor der Auswertung am Sequencer, mit dem Dye Ex 96 Kit entsprechend der Protokollbedingungen aufgereinigt

In dieser Arbeit wurde die automatisierte DNA-Sequenzierung an einem Kapillarsequenziergerät angewendet, bei der die vier Terminatoren mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Die Proben liefen über eine Gelmatrix in einer Kapillare, in deren Verlauf ein Laser eingeschaltet war, der die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe differenzieren und somit die Basen detektieren konnte. Mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, entsprechend ihrer Größe, wanderten die DNA-Stränge durch die Kapillare am Laser vorbei, der einen der vier Fluoreszenzfarbstoffe erkannte und diese als Basensequenz im angeschlossenen PC-System registrierte.

II.8 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme können spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang erkennen und beide Stränge schneiden. Diese Enzyme wurden in den 60iger Jahren von W. Arber, H. Smith und D. Nathans entdeckt (*Stryer. 1996*).

Durch Sequenzvarianten im VWF-Gen können Schnittstellen von Restriktionsenzymen neu hinzukommen bzw. wegfallen.

Nachdem ein PCR-Produkt mit einem Enzym verdaut bzw. inkubiert wurde, können die Restriktionsfragmente durch eine elektrophoretische Auftrennung visualisiert werden.

Durch die veränderte Anzahl an Schnittstellen zwischen Wildtyp und Sequenzvariante können unterschiedlich viele und unterschiedlich große Restriktionsfragmente entstehen.

II. 9 Heteroduplexanalyse

Numerische Sequenzabweichungen konnten durch eine Heteroduplexanalyse bestätigt werden.

Dazu wurden die PCR-Produkte mit Sequenzvariante und die PCR-Produkte eines Wildtyps gemischt, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und langsam abgekühlt.

Durch den Mismatch zwischen der Probe mit Sequenzvariante und des Wildtyps kommt es zur Heteroduplexformation (*Nagamine et al. 1989*), die mittels einer Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt werden kann.

II.10 DHPLC-Analyse

Die „denaturing high performance liquid chromatography“ wurde bei drei Patienten als 2. unabhängige Methode zur Bestätigung der lokalisierten Mutationen eingesetzt (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit).

Die DHPLC-Analyse wurde auf einem WAVE-System mit einem Universalgradienten bei unterschiedlichen Temperaturen nach Standardbedingungen durchgeführt (*zur Stadt et al. 2003*).

Es wurden jeweils drei Mutationen (genauere Daten siehe Ergebniskapitel) und die jeweils entsprechenden Wildtypen analysiert.

Durch den Vergleich der unterschiedlich verlaufenden Elutionsprofile der Probe mit Sequenzvariante sowie der Probe des Wildtypen, konnten die Sequenzvarianten durch diese Methode ebenfalls bestätigt werden.

II.11 Klonierung

Unter dem Begriff Klonieren versteht man das Herstellen von identischen Kopien (*Lehninger et al. 1994*).

In dieser Arbeit wurde die Klonierung eingesetzt, um heterozygote numerische Sequenzabweichungen eindeutig charakterisieren zu können, da sie im Gegensatz zur sequenzspezifischen PCR zusätzlich allelspezifisch ist.

Dies bedeutet, dass bei der PCR sowohl das Allel der Mutter als auch das des Vaters vervielfältigt werden und folglich bei der Sequenzierung direkt übereinanderliegend abgebildet werden.

Aus diesem Grund sind heterozygote numerische Sequenzabweichungen nicht eindeutig zu beschreiben.

Die Sequenzierung einer Klonierung bildet hingegen nur ein Allel ab.

Numerische Sequenzabweichungen sind z. B. Deletion: Basenverlust; Insertion: Einfügen von Basen, Duplikation: Verdoppelung eines bestimmten DNA-Abschnittes.

Die Klonierung besteht im Wesentlichen aus vier Schritten:

- Isolierung des DNA-Abschnittes, den es zu untersuchen gilt;
- Rekombination bzw. Ligation des DNA-Abschnittes mit dem Vektor, in diesem Fall einem Plasmid;
- Transformation in eine Wirtszelle;
- Selektion der Kolonien, die den rekombinanten Vektor enthalten;

Es wurde der TOPO TA cloning kit verwandt und nach den Protokollbedingungen gearbeitet.

Der DNA-Abschnitt, der analysiert werden sollte, wurde durch eine PCR mit der TAQ-Polymerase amplifiziert.

Anschließend folgte die Ligation. Der Ligationsansatz bestand aus dem PCR-Produkt, Wasser, einer Salzlösung und dem Vektor, pCR-4Topo, die essentielle Eigenschaft eines Vektors besteht darin, dass er sich eigenständig in einer passenden Wirtszelle replizieren kann (*Stryer. 1996*).

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

Eine hohe Effizienz der Ligation wurde durch drei Umstände erreicht:

1) Der Vektor enthielt einen T-Überhang am 3'-Ende und war kovalent mit einer Topoisomerase I aus einem Vacciniavirus gebunden, weshalb er sich in einem aktivierten Zustand befand.

2) Die TAQ-Polymerase besaß eine terminale Transferaseaktivität, wodurch ein A an das 3'-Ende der PCR-Produkte angehängt wurde.

Durch die Topoisomerase war der Vektor sozusagen geöffnet, sodaß der T-Überhang am 3'-Ende frei zugänglich war.

3) Es wurden durch den T- bzw den A-Überhang kohäsive Enden geschaffen, da sie komplementär zueinander waren.

Der nächste Schritt bestand in einer Transformation in chemisch kompetente E.coli-Zellen. Dazu wurde ein Teil der Ligationsreaktion zu den E.coli –Zellen hinzugegeben und auf Eis für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend folgte der Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42°C für 30 Sekunden.

Im nächsten Schritt wurde die Reaktion für zwei Minuten auf Eis gelegt und schließlich mit einem Nährmedium versehen.

Die Klonierung wurde auf LB-Agarplatten, die mit Ampicillin versetzt waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4) Die positive Selektion, d.h. die Auswahl der rekombinanten Vektoren erfolgte, indem durch die Ligation die Expression des letalen Genes lacZ α - ccdB- Genes gestört wurde und somit die Zellen durch die Transformation wachsen konnten (*Bernard u. Couturier. 1992, Bernard et al. 1993, Bernard et al. 1994*).

In einer Kolonie wurde entweder ein Wildtypallel oder ein mutiertes Allel vermehrt.

Nach der Klonierung wurde von ca. 20 Kolonien eine colony PCR mit plasmidspezifischen Primern durchgeführt als auch eine Erfolgskontrolle durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese sowie anschließend einer Sequenzierung.

III. Ergebnisse

Es wurden bei 17 von 23 untersuchten Indexpatienten entweder homozygote oder compound-heterozygote Mutationen identifiziert.

Es wurden acht Nonsensemutationen, acht Missensemutationen, vier Insertionen, 15 Deletionen und vier Splicing-Site-Mutationen gefunden. Auf sieben Allelen konnte keine Mutation nachgewiesen werden (s. Tab. III.1). Die prozentuale Verteilung ist aus Abbildung III.1 ersichtlich.

Diese Befunde stimmen mit dem autosomal-rezessiven Erbgang des VWS Typ 3 überein.

Bei fünf von den 23 untersuchten Indexpatienten konnte jeweils nur eine heterozygote Mutation lokalisiert werden und bei einer Indexpatientin F13/II/1 nicht eine Mutation. In diesen Fällen konnten größere heterozygote Deletionen, Mutationen in Introns oder eine Genkonversion mit dem Pseudogen auf Chromosom 22 nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren müßte eventuell die klinische Diagnosestellung reevaluiert werden, da die Proben zum Teil aus Einsendelaboren stammen und auch nicht alle klinischen Daten vorlagen.

Zur Kennzeichnung der Patienten wird ein „F“ für Familie vorangestellt, anschließend werden die Familien mit arabischen Ziffern durchnummeriert, die folgende römische Zahl bezeichnet die Generation innerhalb einer Familie und die arabische Zahl an letzter Position bezeichnet das Familienmitglied.

Beispiel: F2/II/1 bezeichnet Patient 1 aus der II. Generation von Familie 2.

F2/I/1 bezeichnet den Vater des Indexpatienten und F2/I/2 die Mutter. Bei Familie 3 und 22 konnte jeweils, neben den Eltern auch der Bruder untersucht werden. Der Bruder des Indexpatienten konnte in F3 und F22 untersucht werden und wird wie folgt bezeichnet: F3/II/2 und F22/II/2.

Der Patient Nummer 1 aus der II. Generation entspricht immer dem Indexpatienten.

Molekulargenetik des schweren von Willebrand Syndroms Typ 3

Familie	1.Ex / In	1. nt	1. Do m.	1. aa	Ref.	2. Ex/In	2. nt	2. Do m.	2. aa	Re f.	3. Ex /In	3. nt	Ref.
F1/II/1	28	c.3931C>T	A1	p.Q1311X	1,2	28	c.3931C>T	A1	p.Q1311X	1,2			
F2/II/1	14	c.1596_1597delCG	D2	p.D533RfsX648	?		n		n				
F3/II/1	5	c.386T>G	D1	p.L129R	?	14	c.1574G>A	D2	p.G525E	?		c.6799T>A	?
F4/II/1	45	c.7597T>C	C2	p.C2533R	?	IVS25	c.3379+1g>a	D3	§	1	20	c.2561G>A	7,8,9,10,11,12
F5/II/1	43	c.7357_7373dup17	C1	p.V2460PfsX2462	?	43	c.7357_7373dup17	C1	p.V2460PfsX2462	?			
F6/II/1	11	c.1239insG	D2	p.L414AfsX428	?	28	c.4954C>T	A2	p.Q1652X	?			
F7/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4	IVS28	c.5053+3a>g	A3	§	?			
F8/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4	IVS36	c.6256+2_6256+inst	D4	§	?			
F9/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4		n		n				
F10/II/1	42	c.7176T>G	B3 - C1	p.Y2392X	?	42	c.7176T>G	B3 - C1	p.Y2392X	?			
F11/II/1	15	c.1795delG	D2	p.V599SfsX650	?	25	c.3359G>C	D3	p.W1120S	?			
F12/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4	51	c.8215T>C	CK	p.C2739R	?			
F13/II/1		n		n			n		n				
F14/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4			
F15/II/1	21	c.2753C>G	D3	p.S918X	?		n		n				
F16/II/1	45	c.7650_7651delCC	C2	p.Q2551AfsX2565	?	45	c.7650_7651delCC	C2	p.Q2551AfsX2565	?			
F17/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4		n		n				
F18/II/1	36	c.6222_6223insAACC	D4	p.K2075NfsX2090	?	40	c.6911G>A	B1	p.C2304Y	?			
F19/II/1	32	c.5557C>T	A3	p.R1853X	5	32	c.5557C>T	A3	p.R1853X	5			
F20/II/1	51	c.8215T>C	C K	p.C2739R	?	IVS28	c.5053+3a>g	A3	§	?			
F21/II/1	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4	18	c.2435delC	D'	p.P812RfsX842	3,4			
F22/II/1	5	c.374_387del14	D1	p.G125VfsX127	?	17	c.2269_2270delCT	D2	p.L757VfsX778	1			
F23/II/1	52	c.8262T>G	C K	p.C2754W	6		n		n				

Tab. III.1: Mutationen beim von Willebrand Syndrom Typ 3 : 1: Baronciani et al. 2003, 2: Casana et al. 2000, 3: Schneppenheim et al. 1994, 4: Zhang et al. 1992, 5: Zhang et al. 1992b, 6: Schneppenheim et al. 2001a, 7: Cacheris et al, 1991, 8: Gaucher et al, 1991; 9: Kroner et al, 1991, 10: Peerlinck et al, 1992, 11: Mazurier, 1992 und 12: Schneppenheim et al. 1996, (Ex steht für Exon, In für Intron, nt für Nukleotid, Dom. für Domäne, aa für Aminosäure, fs für frameshift, n/N für nicht identifiziert, IVS intervening sequence, „?“: bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht identifiziert und/oder publiziert, „§“: unklare Konsequenz auf Proteinebene)

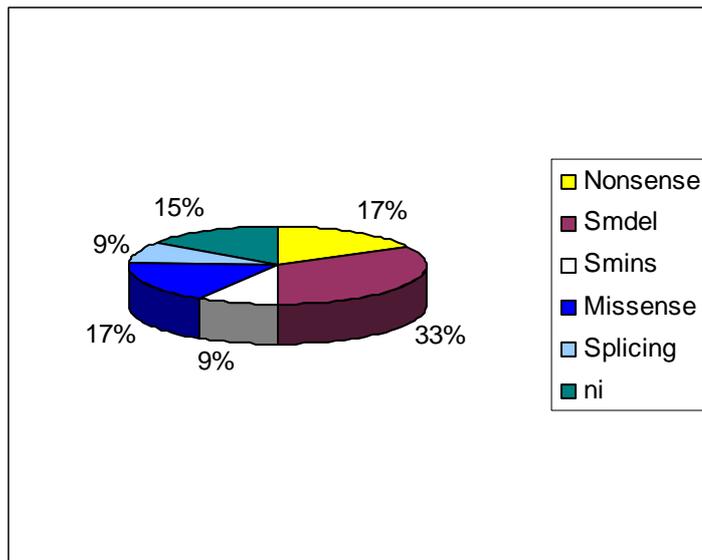


Abb.III.1: Prozentuale Verteilung der VWS Typ 3 Sequenzvarianten
n= 46 Allele, Nonsense: 8, Splicedeleletion: 15, Spliceinsertion: 4, Missense: 8, Splicing: 4, nicht identifiziert: 7 (ni steht für nicht identifiziert, Smdel für Splicedeleletion und Smins für Spliceinsertion)

III.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur der Sequenzvarianten muss eindeutig und präzise sein (*den Dunnen und Antonarakis 2000*). Die aktuellen Empfehlungen sind der website der Human Genome Variation Society

(<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html>) zu entnehmen, die zuletzt im Februar 2008 modifiziert wurden. In dieser Studie richtet sich die Bezeichnung der Sequenzvarianten nach den Empfehlungen von den Dunnen und Antonarakis und den aktuellen Modifikationen.

Den Sequenzvarianten auf der Ebene kodierender DNA, wird ein „c.“ vorangestellt und die Nukleotidveränderungen werden in Großbuchstaben angegeben. Bei Nukleotidveränderungen in Bereichen nicht kodierender DNA werden Kleinbuchstaben zur Bezeichnung verwandt; zur Bezifferung wird die Position des letzten Nukleotids im vorangegangenen Exon vorangestellt und die Position mit einem „+“ gekennzeichnet angegeben (Bsp. c.77+3g).

Die Nummerierung der Nukleotide der komplementären DNA (cDNA) des VWF beginnt mit dem Adenin (+1) des Startkodons ATG (*Goodeve et al. 2001*), das die Aminosäure Methionin kodiert.

Bei mehr als zwei involvierten Nukleotiden wurden statt Angabe der Basen, nur deren Anzahl angegeben.

Als Referenzsequenz für die cDNA wird die Arbeit von Mancuso et al. 1989 genutzt.

Auf der Proteinebene des VWF ist die erste Aminosäure des Prä-Pro-Peptids (Aminosäure Methionin bis Aminosäure 2813) die Startaminosäure Methionin Nummer 1 (Goodeve *et al.* 2001). Die Referenzaminosäuresequenz entspricht dem primären Translationsprodukt.

Die Veränderung der Aminosäuresequenz wurde theoretisch hergeleitet und nicht experimentell bestimmt. Die theoretischen Aminosäuresubstitutionen werden in folgender Form angezeigt:

p.R1120S, i.e. die Aminosäure Arginin an Position p.1120 wechselt nach Serin. Das „p“ kennzeichnet die Proteinebene.

Bei Leserastermutationen wird die Position des vorzeitigen Stopkodons aufgeführt.

Im Ergebniskapitel werden die einzelnen Familien mit ihren Sequenzvarianten vorgestellt. Dabei werden die Sequenzvarianten pro Allel in eckigen Klammern angezeigt. Anschließend folgt die theoretisch zu erwartende Konsequenz auf Proteinebene. Die erstgenannte Veränderung auf DNA-Ebene entspricht immer der erstgenannten Veränderung auf Proteinebene. Das Zeichen „[=]“ bedeutet, dass auf einem untersuchten Allel keine Sequenzvariante nachgewiesen werden konnte. Die Bezeichnung „p.?“ bedeutet, dass die Konsequenz einer Nukleotidveränderung auf Proteinebene unklar, aber zu erwarten ist. Im Kapitel Diskussion werden die lokalisierten Sequenzabweichungen nach ihrer Mutationsform (Deletion, Insertion, Nonsensemutation, Missensemutation, Splice-Site-Mutation) eingeteilt und dementsprechend vorgestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Gendiagnostik der Patienten und wenn verfügbar deren Familie vorgestellt und in Form von Stammbäumen dargestellt.

Die Segregation der Mutationen innerhalb einer Familie wird durch die zugehörigen Stammbäume illustriert.

Die Angabe der Nukleotidabweichungen der kodierenden DNA-Sequenz wird nach folgendem Muster angegeben:

- **Substitution:**

c.5C>T, i.e. an Position 5 auf dem Wildtypallel liegt ein C vor, das auf dem sequenzvariantem Allel nach T wechselte (Bsp. TGCC**C**TGG> TGC**C**TTGG).

- **Deletion:**

c.5_6delCT, i.e. an Position 5 und 6 auf dem Wildtypallel liegt das Nukleotid C und T; diese Nukleotide sind deletiert (Bsp. TGCC**CT**GG > TGCCGG).

- **Insertion:**

c.5_6 insC, i.e. zwischen Position 5 und 6 wurde das Nukleotid C inseriert (Bsp. TGCCCTGG > TGCCC**C**TGG).

- **Duplikation:**

c.5_6dupCT, i.e. die Nukleotide an Position 5 und 6 CT sind dupliziert (Bsp. TGCCCTGG > TGCCCT**CT**GG).

III. 2 Ergebnisse der Indexpatienten und ihrer Verwandten

F1/II/1

c.[3931C>T]+c.[3931C>T]
p.[Q1311X]+ p.[Q1311X]

Die Indexpatientin F1/II/1 ist homozygot für die Sequenzvariante c.3931C>T in Exon 28 (s.Abb.III.2.1.1), die mit der Nonsensemutation p.Q1311X in der A1 Domäne korreliert.

Die sehr niedrige VWF:Ag-Konzentration von <1% (Normwert: 50-160%) wird sehr wahrscheinlich dadurch erklärt, daß dieser Defekt homozygot auftritt.

Die Sequenzvariante c.3931C>T ist in der Literatur schon beschrieben worden (*Baronciani et al. 2003, Casana et al. 2000*).

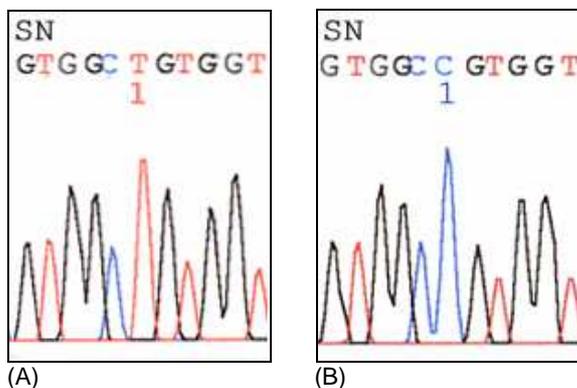


Abb. III.2.1.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.Q1311X. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.3931C>T im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.3931, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

F2/II/1

c.[1596_1597delCG]+c.[=]
p. [D533RfsX648]+p.[=]

Die Indexpatientin F2/II/1 ist heterozygot für die Deletion c.1596_1597delCG in Exon 14 (s.Abb.III.2.2.1). Auf Proteinebene befindet sich theoretisch die erste veränderte Aminosäure an Position p.533; dies geht mit einem neuen Leseraster, 116 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.648, korrelierend mit der D2 Domäne des VWF, einher. Eine weitere Sequenzvariante konnte nicht nachgewiesen werden. Die Deletion c.1596_1597delCG wurde durch eine Heteroduplexanalyse (s.Abb.III.2.2.2) bestätigt, indem sie sich durch zusätzliche Bandenbildung vom Wildtyp unterschied. Diese Deletion ist bislang in der Literatur nicht beschrieben worden.

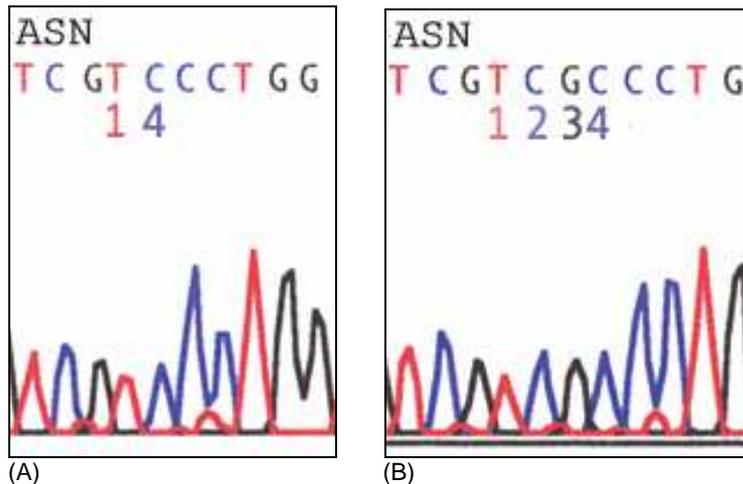


Abb.III.2.2.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Deletion c.1596_1597delCG nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 2-Basendeletion an Position c.1596_1597delCG im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.1598, 2 Position c.1597, 3 Position c.1596, 4 Position c.1595, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

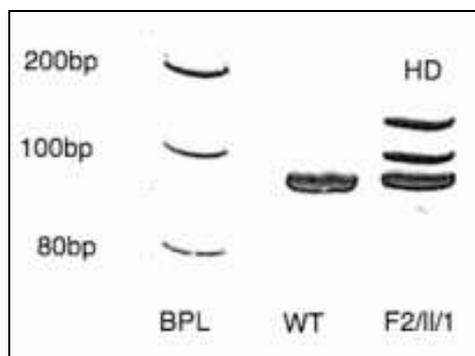


Abb.III.2.2.2: Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.1596_1597delCG. Der Wildtyp präsentiert eine Homoduplex, die in ihrer Größe mit dem Wildtypallel der Patientin F2/II/1 übereinstimmt, sowie 2 zusätzliche Banden. (BPL steht für Basenpaarleiter, HD für Heteroduplex und WT für Wildtyp)

F3/II/1

c.[386T>G]+c.[1574G>A; 6799T>A]
p.[L129R]+p.[G525E;F2267I]

Die Indexpatientin F3/II/1 ist compound-heterozygot für die Sequenzvarianten c.386T>G in Exon 5 (s.Abb.III.2.3.1), c.1574G>A in Exon 14 (s.Abb.III.2.3.3) und c.6799T>A in Exon 39, die je (in der genannten Reihenfolge) theoretisch auf Proteinebene mit den Missensemutationen p.L129R, p.G525E und p.F2267I in der D1 Domäne, D2 Domäne und D4 Domäne korrelieren. Durch die Missensemutation p.L129R ist eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Alu I verloren gegangen (s.Abb.III.2.3.2) bzw. durch die Missensemutation p.F2267I für das Restriktionsenzym DpN II hinzugekommen, sodaß diese Veränderungen auf diesem Wege bestätigt werden konnten. Die Missensemutation p.G525E bestätigte sich durch ein unterschiedliches Elutionsprofil im Vergleich mit dem Wildtyp im Rahmen der DHPLC (s.Abb.III.2.3.4, **nicht** Bestandteil dieser Arbeit). Durch Analyse der Eltern konnte festgestellt werden, daß die Missensemutation p.G525E vom Vater F3/II/1 und die Missensemutation

p.L129R von der Mutter F3/I/2 stammt. Die Veränderung p.F2267I muß demnach eine de-novo Spontanmutation sein, da sie sowohl bei den Eltern als auch beim Bruder nicht lokalisiert werden konnte (s. Stammbaum Abb.III.2.3.5). Als ursächlich für das klinische Erscheinungsbild der Patientin F3/II/1 sind vermutlich die Missensemutationen p.L129R und p.G525E anzusehen, da sie bei den Eltern lokalisiert werden konnten, deren Multimere im Vergleich mit dem Pool leicht vermindert angefärbt waren und die VWF:Antigen-Konzentration (VWF:Ag) bei der Mutter F3/I/2 mit 8% relativ stark vermindert und bei dem Vater F3/I/1 mit 40% grenzwertig reduziert war. Außerdem zeigte die Mutation p.F2267I bei in-vitro-Expressionsstudien (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit) keinen funktionellen Defekt s.a. Kapitel IV.4. Familie Nr.3. Die VWF:Ag-Konzentration ist aus Tabelle III.2.3.1 ersichtlich.

Untersuchter Patient	VWF:Ag (%)
F3/I/1	40
F3/I/2	8
F3/II/1	<1
F3/II/2	66

Tab.III.2.3.1: VWF:Ag-Konzentrationen bei Familie 3

Die Sequenzvarianten c.386T>G, c.1574G>A und c.6799T>A sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Die Sequenzvarianten sind bei allen anderen untersuchten Patienten nicht aufgetreten.

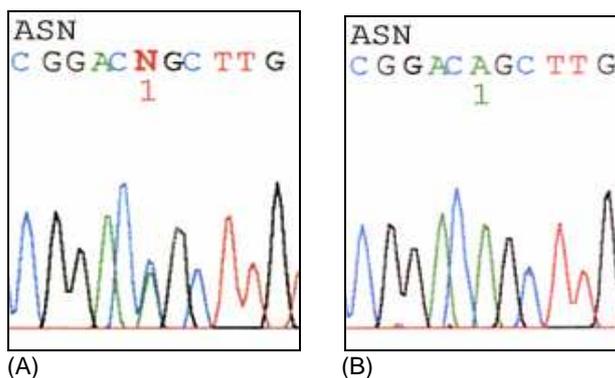


Abb.III.2.3.1: Sequenzierung des VWF-Genes bei der Missensemutation p.L129R. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.386T>G im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.386, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

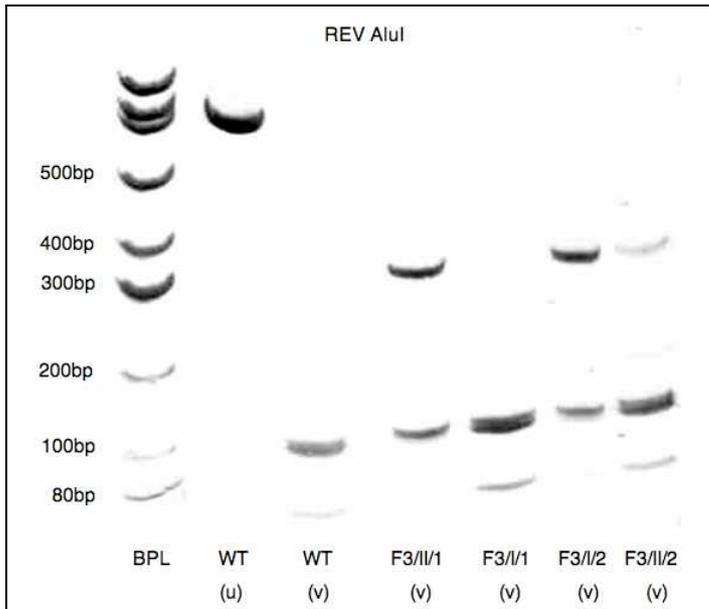


Abb.III.2.3.2: Der REV zeigt den Verlust einer Schnittstelle durch die Missensemutation p.L129R für das Enzym AluI durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei den Patienten F3/II/1 und F3/II/2 im Gegensatz zu den Patienten F3/II/1 und F3/II/2. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, U für unverdaut, V für verdaut und WT für Wildtyp)

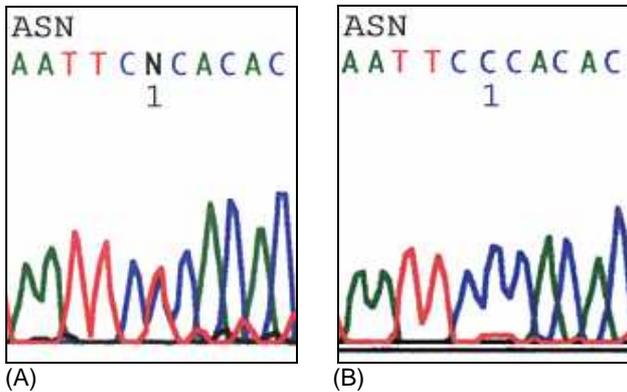


Abb.III.2.3.3: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Sequenzvariante p.G525E. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.1574G>A im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.1574, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

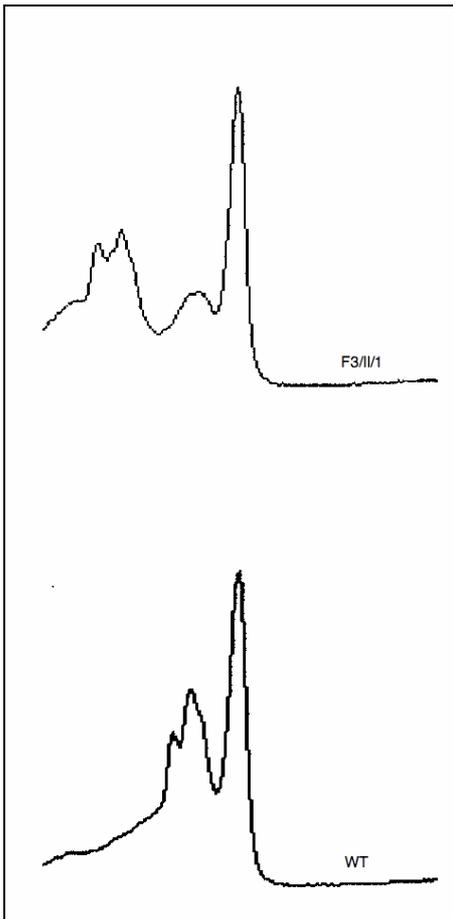


Abb.III.2.3.4: Die DHPLC zeigt bei Indexpatientin F3/II/1 durch die Missensemutation p.G525E ein verändertes Elutionsprofil im Vergleich mit dem Wildtyp. (WT steht für Wildtyp)

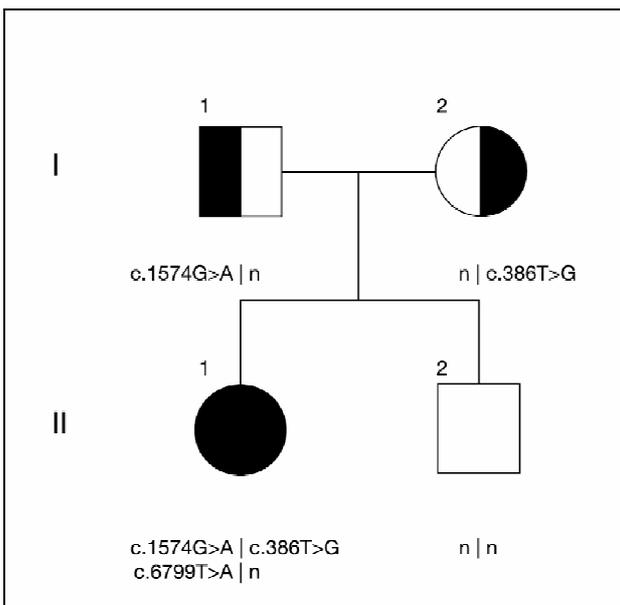


Abb.III.2.3.5: Stammbaum der Familie 3: I.1: Vater heterozygot für p.G525E, I.2: Mutter heterozygot für p.L129R, II.1: Indexpatientin compound heterozygot für p.G525E und für p.L129R II.2: Bruder n: keine festgestellten Mutationen

F4/II/1

c.[2561G>A;7597T>C]+c.[3379+1g>a]
p.[R854Q;C2533R]+p.?

Die Indexpatientin F4/II/1 ist compound-heterozygot für die Sequenzvariante c.2561G>A in Exon 20 (s.Abb.III.2.4.1), die mit der Sequenzvariante p.R854Q in der D'-D3 Domäne korreliert, für die Sequenzvariante c.7597T>C in Exon 45 (s.Abb.III.2.4.4), die mit der Missensemutation p.C2533R in der C2 Domäne korreliert und für die candidate Splice-Site-Mutation c.3379+1g>a am Ende des Exons 25 (s.Abb.III.2.4.3). Die Kennzeichnung „p.“ bedeutet, dass diese Veränderung auf Proteinebene nicht analysiert ist, aber ein Effekt zu erwarten ist (*den Dunnen und Antonarakis 2000*). Laut Splice-Site-Prediction-Programm entfällt die Donor-Splice-Site des Exon 25 mit der Sequenzvariante c.3379+1g>a. Unter der theoretischen Annahme, dass das Exon 25 nicht translatiert wird, würde diese Sequenzvariante eine Verschiebung des Leserasters bedingen, einhergehend mit 87 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon auf Proteinebene an Position p.1162. Die Sequenzvariante p.R854Q konnte mit Hilfe des Restriktionsenzymverdau Hpa II bestätigt werden; durch die Veränderung kam es zu einem Verlust und zu einer neuen Schnittstelle für das Enzym Hpa II (s.Abb.III.2.4.2). Die candidate Splice-Site-Mutation c.3379+1g>a konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Nla III dargestellt werden. Es ist eine neue zusätzliche Schnittstelle entstanden, sodass insgesamt drei Schnittstellen vorlagen. Die neu entstandenen Fragmente waren so klein, dass die Banden mit einem 10%igen PAGE makroskopisch ganz schwach sichtbar waren, und folglich mit dem Kamerasystem nicht visualisiert werden konnten.

Die Missensemutation p.C2533R wurde mit der DHPLC anhand unterschiedlicher Elutionsprofile im Vergleich mit dem Wildtyp bestätigt (s.Abb.III.2.4.5, **nicht** Bestandteil dieser Arbeit).

Die Analyse der Eltern der Indexpatientin ergab, daß die zwei Missensemutationen vom Vater F4/I/1 stammen und die candidate Splice-Site-Mutation von der Mutter F4/I/2 (s. Stammbaum Abb.III.2.4.6).

Die Missensemutation p.R854Q ist in der Literatur vielfach beschrieben worden (*Cacheris et al, 1991, Gaucher et al, 1991; Kroner et al, 1991b, Peerlinck et al, 1992, Mazurier, 1992 und Schneppenheim et al, 1996*).

Initial ist die Missensemutation von Cacheris et al. 1991 identifiziert worden und ist die häufigste Sequenzvariante bei VWS Typ 2N-Patienten (*Mazurier et al. 2001*). Sie geht mit einer defekten FVIII -Bindung des VWF einher und entspricht einem Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von 1% (*Schneppenheim, unpubl.*).

Die Sequenzvariante c.7597T>C ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Die candidate Splice-site-Mutation c.3379+1g>a ist bereits von Baronciani et al. 2003 beschrieben worden. Die VWF:Ag-Konzentration ist aus Tabelle III.2.4.1 ersichtlich.

Untersuchter Patient	VWF:Ag (%)
F4/I/1	47
F4/I/2	38
F4/II/1	4

Tab.III.2.4.1: VWF:Ag-Konzentrationen bei Familie 4

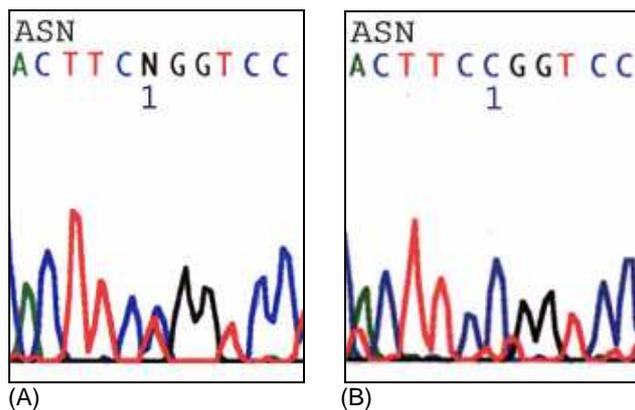


Abb.III.2.4.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Sequenzvariante p.R854Q. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.2561G>A im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.2561, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

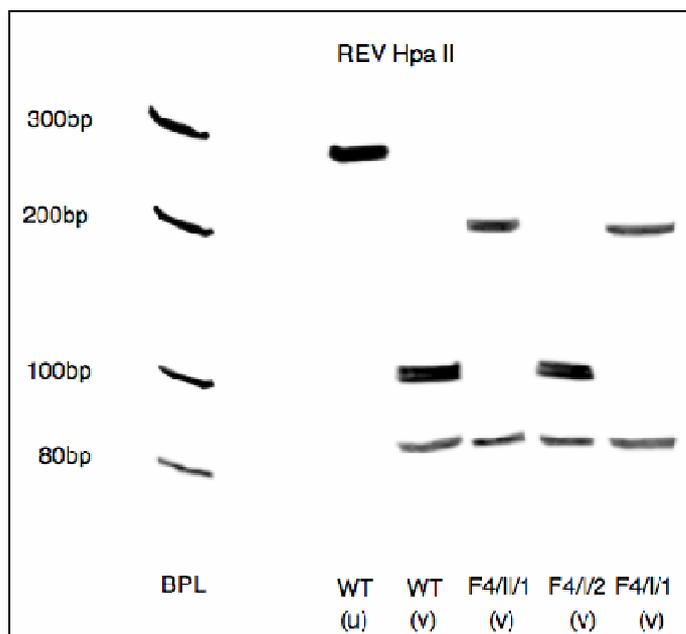


Abb.III.2.4.2: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Sequenzvariante p.R854Q. Der REV zeigt den Verlust und eine neue andere Schnittstelle durch die Sequenzvariante p.R854Q für das Enzym Hpa II bei den Patienten F4/II/1 und F4/I/1 im Gegensatz zu Patient F4/I/2. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut, und WT für Wildtyp)

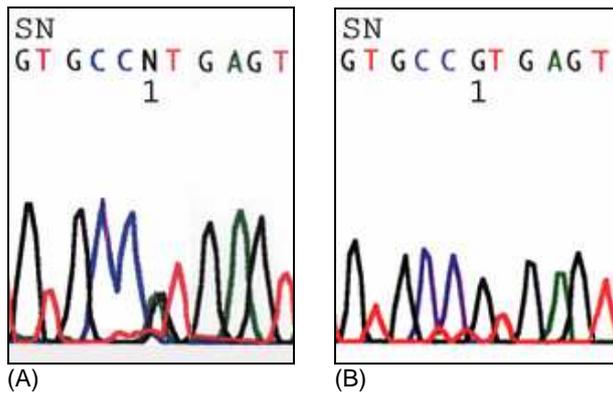


Abb.III.2.4.3.: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.3379+1g>a. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.3379+1g>a im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.3379+1, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

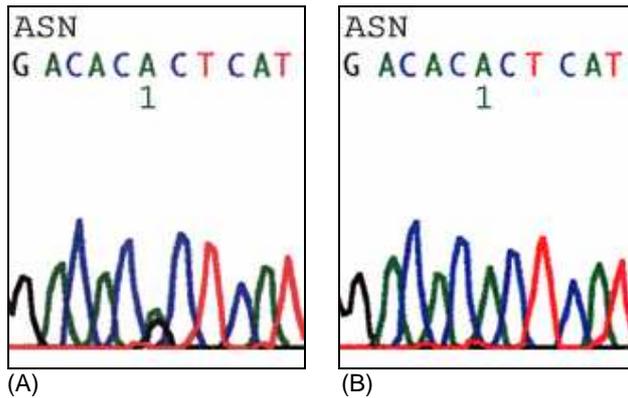


Abb.III.2.4.4: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2533R. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.7597T>C im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.7597, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

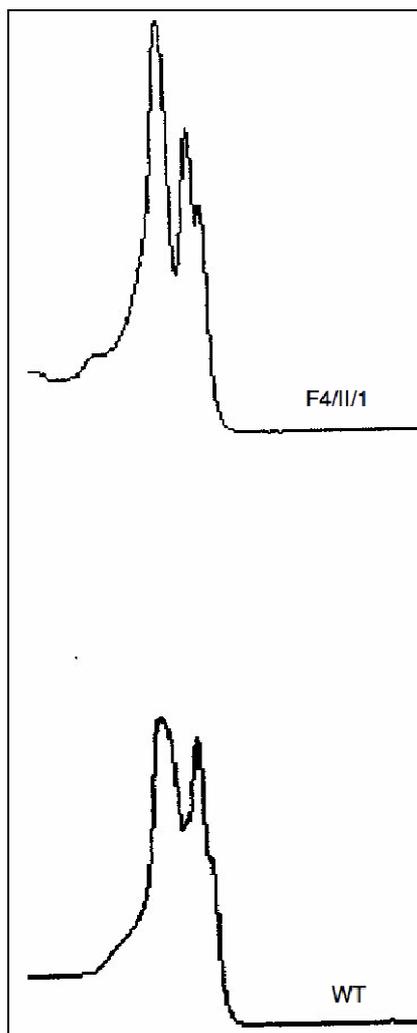


Abb.III.2.4.5: DHPLC des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2533R. Die DHPLC zeigt bei Patientin F4/II/1 ein verändertes Elutionsprofil im Vergleich mit dem Wildtyp. (WT steht für Wildtyp)

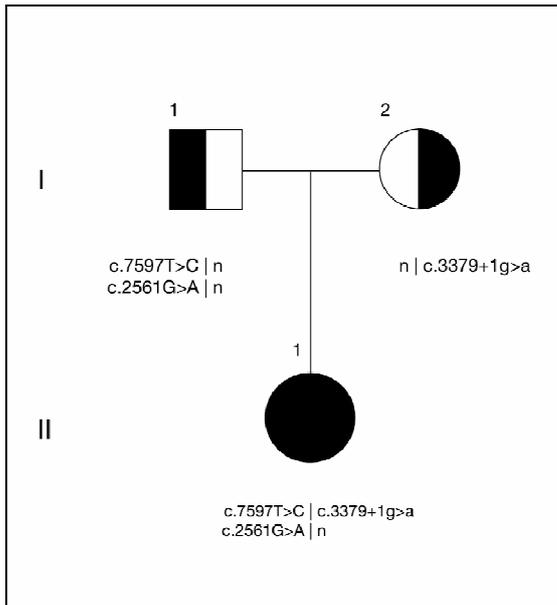


Abb.III.2.4.6: Stammbaum der Familie 4: I.1: Vater heterozygot für p.R854Q und für p.C2533R, I.2: Mutter heterozygot für c.3379+1g>a
 II.1: Indexpatientin compound heterozygot für p.R854Q, für p.C2533R und für c.3379+1g>a

F5/II/1

c.[7357_7373dup17]+ c.[7357_7373dup17]
 p.[V2460PfsX2462]+ p.[V2460PfsX2462]

Die Indexpatientin F5/II/1 ist homozygot für die Duplikation c.7357_7373dup17 in Exon 43 (s.Abb.III.2.5.1, Abb.III.2.5.2). Auf Proteinebene führt diese Nukleotidveränderung theoretisch zu einer Verschiebung des Leserasters, 2 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.2462 und korreliert mit der C1 Domäne. Diese Duplikation wurde durch eine Heteroduplexanalyse bestätigt, indem sie sich durch zusätzliche Bandenbildungen vom Wildtyp unterschied (s.Abb.III.2.5.3). Die VWF:Ag-Konzentration beträgt <1%.

Die Duplikation c.7357_7373dup17 ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

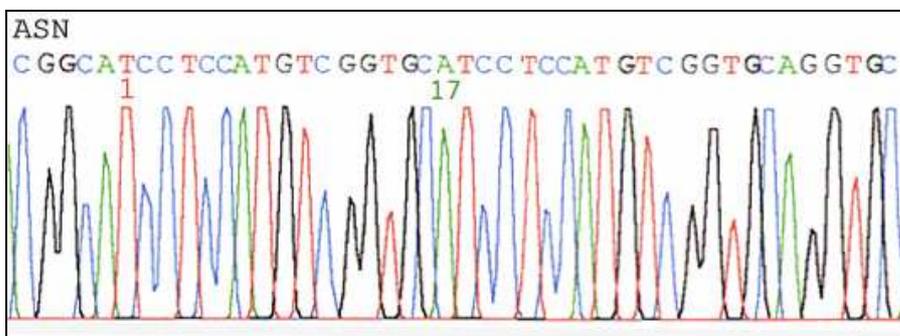


Abb.III.2.5.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Duplikation c.7357_7373dup17. Die Sequenzierung zeigt folgende 17-Basen-Duplikation an Position c.7357_7373dup17 im VWF-Gen. (1 kennzeichnet Position c.7373 und 17 Position c.7357, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-Richtung)

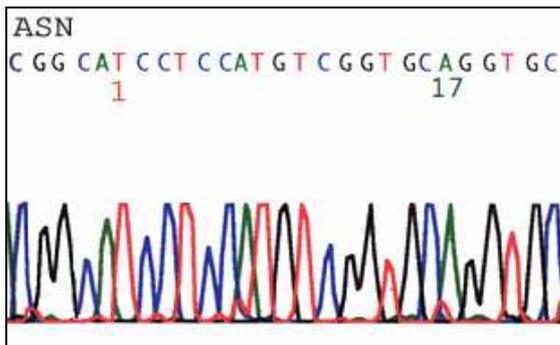


Abb.III.2.5.2: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Mutation c.7357_7373dup17. Die Sequenzierung zeigt den Wildtyp. (1 kennzeichnet Position c.7373, 17 Position c.7357, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

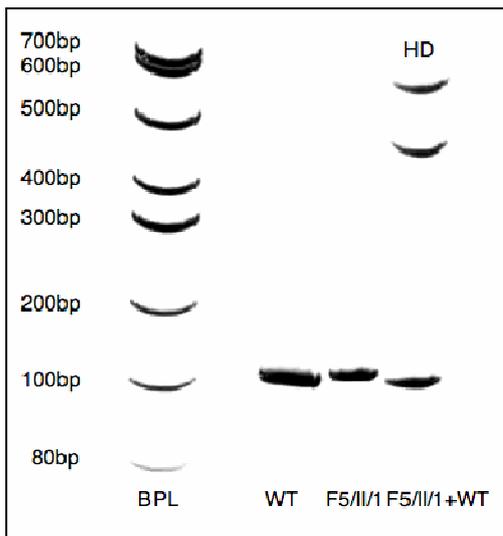


Abb.III.2.5.3: Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Mutation c.7357_7373dup17. Durch Mischen einer Wildtypprobe mit der Probe der Patientin F5/II/1 zeigen sich zwei aberrierende Banden bzw. zwei Heteroduplices. (BPL für Basenpaarleiter, HD für Heteroduplex und WT Wildtyp)

F6/II/1

c.[1239_1240insG]+ c.[4954C>T]
p.[L414AfsX428]+ p.[Q1652X]

Die Indexpatientin F6/II/1 ist compound-heterozygot für die Insertion c.1239_1240insG in Exon 11 (s.Abb.III.2.6.1), die theoretisch mit einer Verschiebung des Leserasters, 15 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.428 in der D2 Domäne korreliert und für die Sequenzvariante c.4954C>T in Exon 28 (s.Abb.III.2.6.3.), die mit der Nonsensemutation p.Q1652X in der A2 Domäne korreliert. Die Insertion konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Bst NI bestätigt werden, da eine neue Schnittstelle hinzugekommen war (s.Abb.III.2.6.2). Die VWF:Ag-Konzentration war mit <1% sehr niedrig. Die Sequenzvarianten c.1239_1240insG und c.4954C>T sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

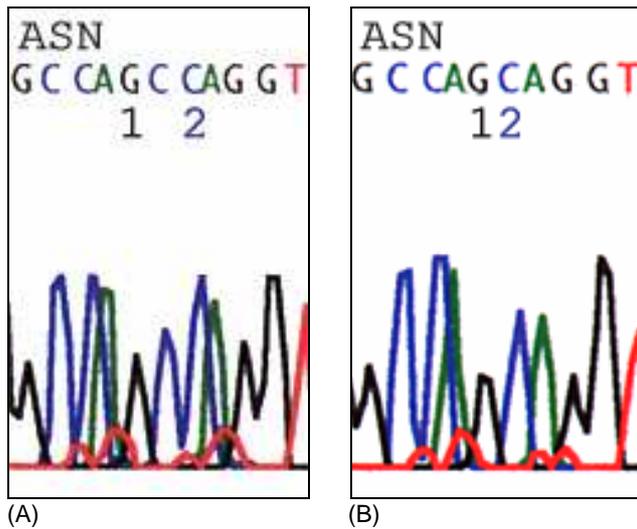


Abb.III.2.6.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Insertion c.1239_1240insG nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 1-Basen-Insertion an Position c.1239_1240insG (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.1240, 2 Position c.1239, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

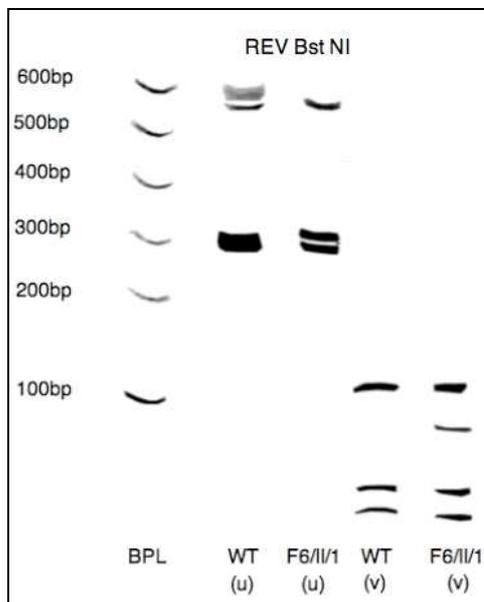


Abb.III.2.6.2: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Insertion c.1239_1240insG nach Klonierung. Der REV zeigt eine neue zusätzliche Schnittstelle durch die Insertion c.1239_1240insG für das Enzym Bst NI durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei Patientin F6/II/1 im Gegensatz zum Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

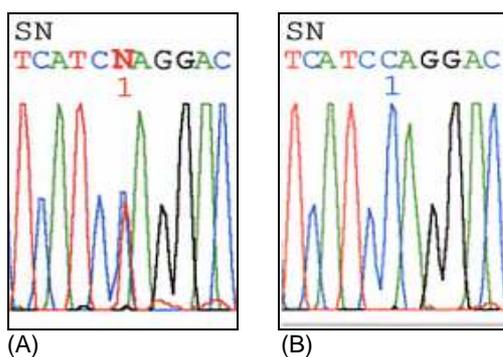


Abb.III.2.6.3: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.Q1652X. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.4954C>T im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.4954, SN steht für Sequenzierung in Sense-richtung)

F7/II/1

c.[2435delC]+ c.[5053+3a>g]
 p.[P812RfsX842]+p.?

Der Indexpatient F7/II/1 ist compound-heterozygot für die Deletion c.2435delC in Exon 18 (s.Abb.III.2.7.1) und für die Sequenzvariante c.5053+3a>g am Ende des Exons 28 in der A3 Domäne (s.Abb.III.2.7.3). Auf Proteinebene führt die Deletion theoretisch zu einer Verschiebung des Leserasters, 31 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.842 und korreliert mit der D' Domäne. Die Deletion konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Bgl I bestätigt werden, da diese Veränderung zu einem Verlust der Schnittstelle führt (s.Abb.III.2.7.2) (*Schneppenheim et al. 1994*). Laut Splice-Site-Prediction-Programm entfällt die Donor-Splice-Site des Exon 28 mit der Mutation c.5053+3a>g. Unter der theoretischen Annahme, dass das Exon 28 nicht translatiert wird, entsteht aus dem Cystein an Position p.1225 direkt ein vorzeitiges Terminationskodon. Weitere veränderte Aminosäuren kommen nicht vor. Die candidate-Splice-Site-Mutation c.5053+3a>g wurde mit der DHPLC (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit) anhand unterschiedlicher Elutionsprofile im Vergleich mit dem Wildtyp bestätigt (s.Abb.III.2.7.4).

Die gemessene VWF:Ag-Konzentration ergab 2,8%. Die Deletion c.2435delC wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben (*Schneppenheim et al. 1994, Zhang et al. 1992*).

Die Sequenzvariante c.5053+3a>g stellt eine candidate Splice-Site-Mutation dar, die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

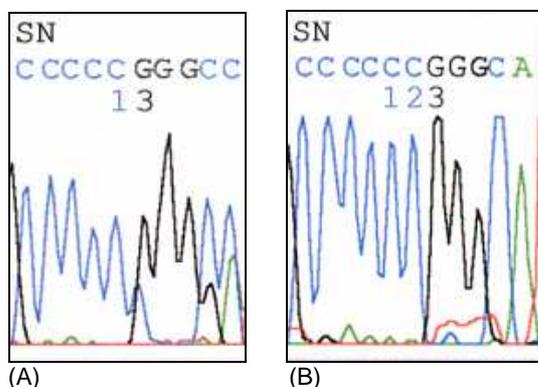


Abb.III.2.7.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Deletion c.2435delC. Die Sequenzierung zeigt folgende 1-Basendeletion an Position c.2435delC im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.2434, 2 Position c.2435, 3 Position c.2436, SN steht für Sequenzierung in Sensesrichtung)

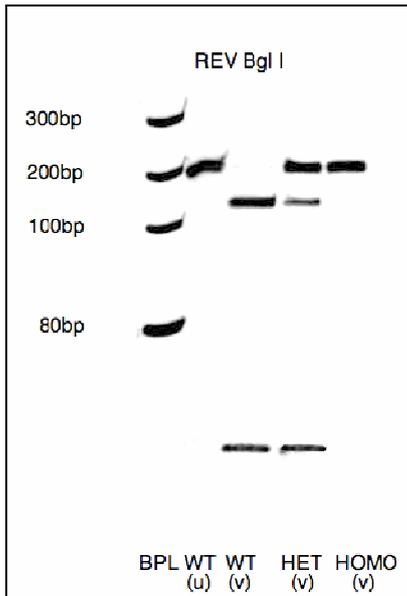


Abb.III.2.7.2: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Mutation c.2435delC. Der REV zeigt den Verlust einer Schnittstelle durch die Deletion c.2435delC für das Enzym Bgl I durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei der Probe HET (v) im Vergleich zum WT (v). Im Falle des Vorliegens einer homozygoten c.2435delC-Mutation kommt es bei Probe HOMO (v) zum Auftreten eines Größenunterschiedes von ungefähr 80 bp im Vergleich zum WT (v). (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, HET für heterozygot, HOMO für homozygot, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

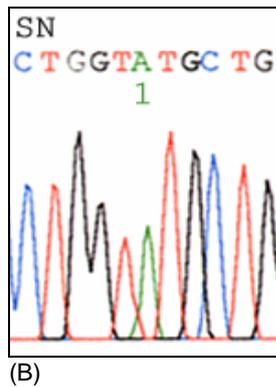
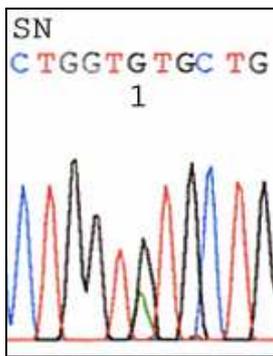


Abb.III.2.7.3: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Mutation c.5053+3a>g. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.5053+3a>g im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.5053+3a>g, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

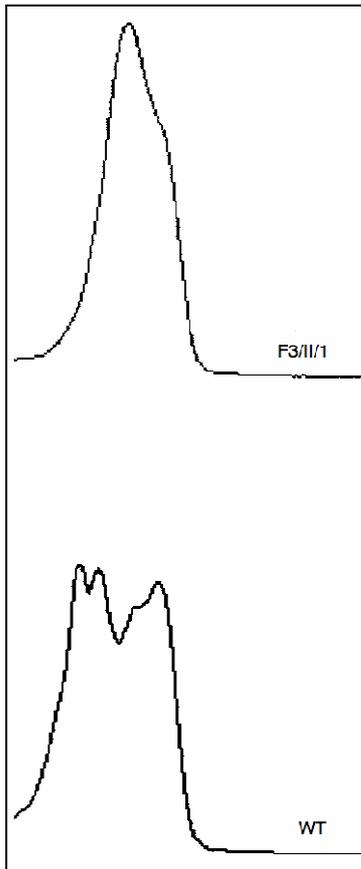


Abb.III.2.7.4: DHPLC des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.5053+3a>g. Die DHPLC zeigt bei Patient F7/II/1 ein verändertes Elutionsprofil im Vergleich mit dem Wildtyp. (WT steht für Wildtyp)

F8/II/1

c.[2435delC]+c.[6256+2_6256+3inst]
p.[P812RfsX842]+p.?

Der Indexpatient F8/II/1 ist compound-heterozygot für die Deletion c.2435delC in Exon 18 und für die Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst am Ende des Exon 36 (s.Abb.III.2.8.1). Die Deletion c.2435delC wurde bereits bei Patient F7/II/1 vorgestellt (s.S.37).

Die Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst stellt, aufgrund ihrer Nähe zur Donor-Splice-Site des Exon 36, gleichzeitig eine candidate Splice-Site-Mutation und eine Insertion dar.

Laut Splice-Site-Prediction-Programm entfällt die Donor-Splice-Site des Exon 36 mit der Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst. Unter der theoretischen Vorstellung, dass das Exon 36 nicht translatiert wird, verursacht diese Sequenzvariante eine Verschiebung des Leserasters, einhergehend mit 12 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.2034. Die Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Tru 1I bestätigt werden, da diese Veränderung zu

einer neuen Schnittstelle für das Enzym geführt hat (s.Abb.III.2.8.2). Die gemessene VWF:Ag-Konzentration ergab <10%.

Die Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

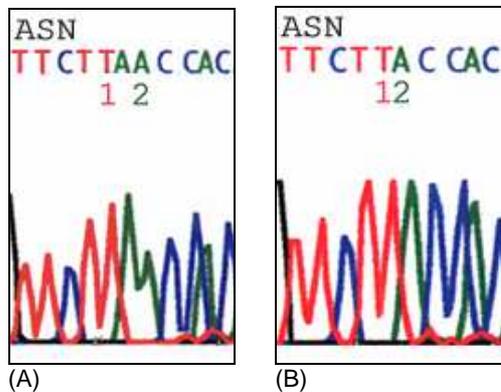


Abb.III.2.8.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 1-Baseninsertion an Position c.6256+2_6256+3inst im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.6256+3, 2 Position c.6256+2, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

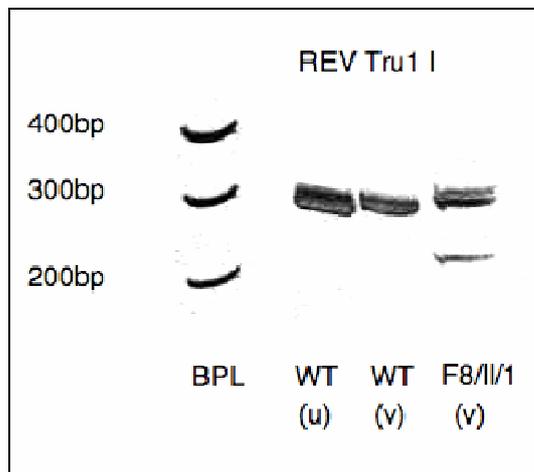


Abb.III.2.8.2: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst nach Klonierung. Der REV zeigt eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym Tru1 I durch die Sequenzvariante c.6256+2_6256+3inst durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei Patient F8/II/1 im Vergleich mit dem Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

F9/II/1

c.[2435delC]+ c.[=]
p.[P812RfsX842]+p.[=]

Der Indexpatient F9/II/1 ist heterozygot für die Deletion c.2435delC in Exon 18.

Die Deletion c.2435delC wurde bereits bei Patient F7/II/1 vorgestellt (s.S.37).

Eine weitere Sequenzvariante konnte nicht nachgewiesen werden. Eine größere Deletion konnte nicht ausgeschlossen werden. Die Messung der VWF:Ag-Konzentration lag bei <1%.

F10/II/1

c.[7176T>G]+c.[7176T>G]
p.[Y2392X]+p.[Y2392X]

Die Indexpatientin F10/II/1 ist homozygot für die Sequenzvariante c.7176T>G in Exon 42 (s.Abb.III.2.10.1), die mit der Nonsensemutation p.Y2392X in der B3-C1 Domäne korreliert.

Die VWF:Ag- Konzentration beträgt <1%.

Die Sequenzvariante c.7176T>G ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

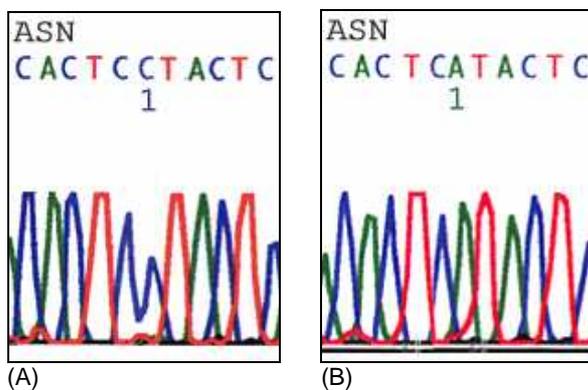


Abb.III.2.10.1: Sequenzierung des VWF-Gen bei der Nonsensemutation p.Y2392X. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.7176T>G im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.7176, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung).

F11/II/1

c.[1795delG]+c.[3359G>C]
p.[V599SfsX650]+p.[W1120S]

Die Indexpatientin F11/II/1 ist compound-heterozygot für die Deletion c.1795delG in Exon 15 (s.Abb.III.2.11.1) und korreliert mit der D2 Domäne und für die Sequenzvariante c.3359G>C in Exon 25 (s.Abb.III.2.11.3), die mit der Missensemutation W1120S in der D3 Domäne korreliert. Auf Proteinebene führt die Nukleotidveränderung c.1795delG theoretisch zu einer Verschiebung des Leserasters, 52 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.650. Die Deletion konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Dde I bestätigt werden, da diese Veränderung zu einer neuen Schnittstelle für das Enzym geführt hat (s.Abb.III.2.11.2). Die Missensemutation konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Taq I bestätigt werden, da diese Veränderung zu einer neuen Schnittstelle für das Enzym geführt hat (s.Abb.III.2.11.4). Die VWF:Ag-Konzentration beträgt bei Patientin F11/II/1 <1%.

Die Sequenzvarianten c.1795delG und c.3359G>C sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

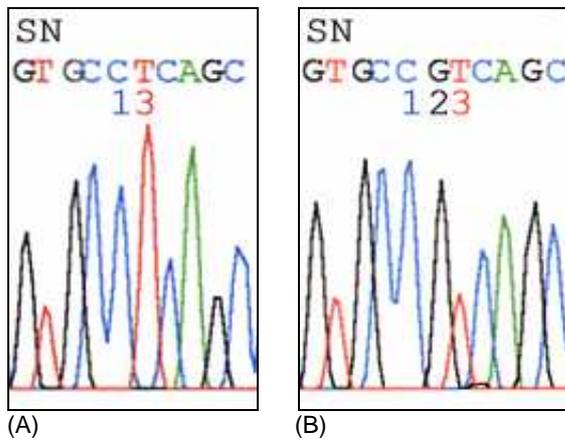


Abb.III.2.11.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Mutation c.1795delG nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 1-Basendeletion an Position c.1795delG im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.1794, 2 Position c.1795, 3 Position c.1796, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

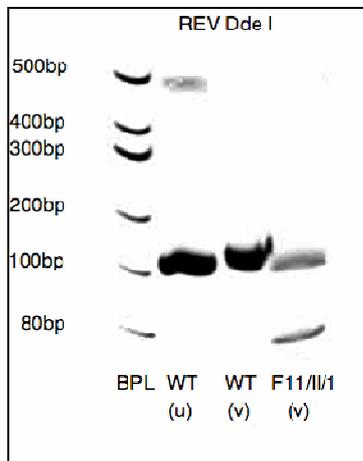


Abb.III.2.11.2: Restriktionsenzymverdaug des VWF-Gens bei der Deletion c.1795delG nach Klonierung. Der REV zeigt eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym Dde I durch die Mutation c.1795delG durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei Patientin F11/II/1 im Vergleich mit dem Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdaug, (u) für unverdaug, (v) für verdaug und WT für Wildtyp)

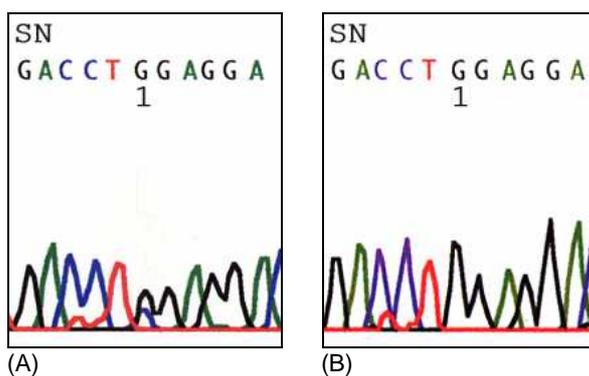


Abb.III.2.11.3: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.W1120S. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.3359G>C im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.3359, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

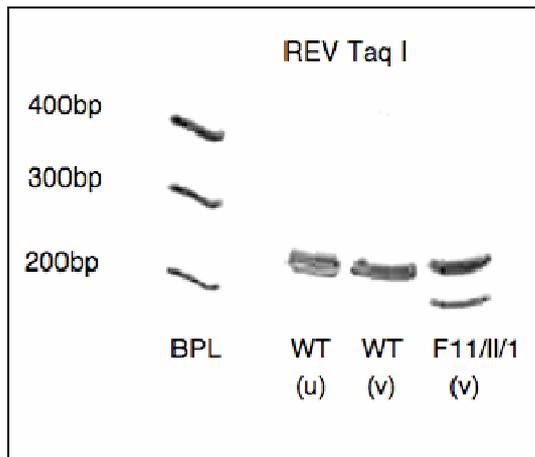


Abb.III.2.11.4: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.W1120S. Der REV zeigt eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym Taq I durch die Missensemutation p.W1120S durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei Patientin F11/II/1 im Vergleich mit dem Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

F12/II/1

c.[2435delC]+c.[8215T>C]
p.[P812RfsX842]+p.[C2739R]

Die Indexpatientin F12/II/1 ist compound-heterozygot für die Deletion c.2435delC in Exon 18 und für die Sequenzvariante c.8215T>C in Exon 51 (s.Abb.III.2.12.1), die mit der CK Domäne korreliert. Auf Proteinebene wird theoretisch bei der Nukleotidveränderung c.8215T>C eine Aminosäureveränderung von Cystein an Position p.2739 nach Arginin erwartet. Die Deletion c.2435delC wurde bereits bei Patient F7/II/1 vorgestellt (s.S.37). Die Missensemutation p.C2739R konnte mit dem Restriktionsenzym Alu I bestätigt werden, da es zu einem Verlust und einer neuen anderen Schnittstelle für dieses Enzym kam (s.Abb.III.2.12.2).

Die VWF:Ag-Konzentration, die bei dieser Patientin gemessen wurde, lag bei 229,5%, hierbei handelte es sich um einen Substitutionseffekt.

Die Missensemutation p.C2739R ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden; jedoch berichtete Zhang et al. 1994 von einer Aminosäuresubstitution an derselben Position p.2739 von Cystein nach Tyrosin anstatt nach Arginin, wie in dieser Studie.

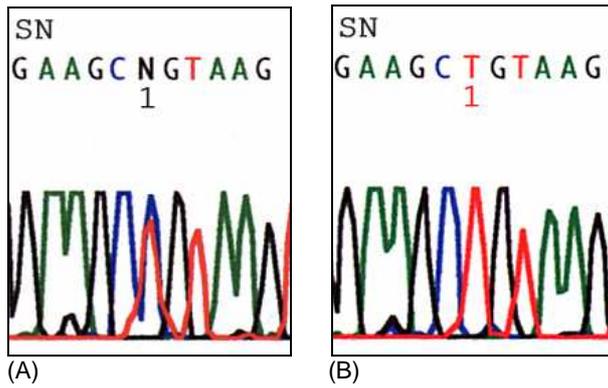


Abb.III.2.12.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2739R. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.8215T>C im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.8215, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

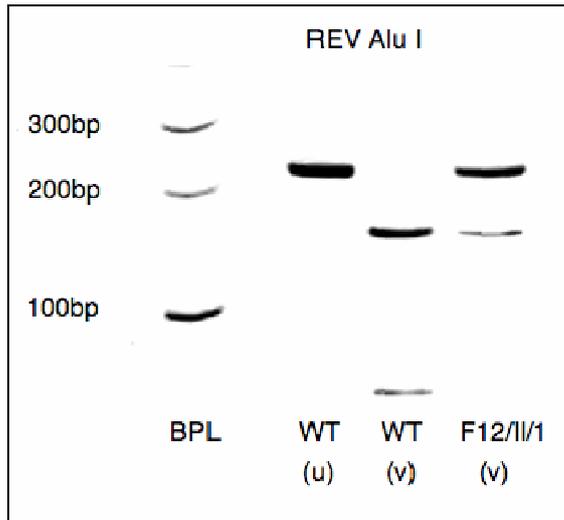


Abb.III.2.12.2: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2739R. Der REV zeigt den Verlust sowie eine andere Schnittstelle durch die Missensemutation p.C2739R für das Enzym Alu I durch das Auftreten einer zusätzlichen größeren Bande bei Patientin F12/II/1 im Gegensatz zum Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

F13/II/1

c. [=]+c.[=]

p. [=]+p.[=]

Bei Indexpatientin F13/II/1 konnten keine Sequenzvarianten nachgewiesen werden. Größere heterozygote Deletionen konnten nicht ausgeschlossen werden. Eine VWF:Ag-Messung lag nicht vor. Eventuell sollte eine Re-Evaluierung der Diagnose erfolgen.

F14/II/1

c.[2435delC]+c.[2435delC]
p.[P812RfsX842]+p.[P812RfsX842]

Die Indexpatientin F14/II/1 ist homozygot für die Deletion c.2435delC in Exon 18. Die Deletion c.2435delC wurde bereits bei Patient F7/II/1 vorgestellt (s.S.37). Die VWF:Ag-Konzentration lag bei < 1%.

F15/II/1

c.[2753C>G]+c.[=]
p.[S918X]+p.[=]

Die Indexpatientin F15/II/1 ist heterozygot für die Sequenzvariante c.2753C>G in Exon 21 (s.Abb.III.2.15.1), die mit der Nonsensemutation p.S918X in der D3 Domäne korreliert. Eine 2. Sequenzvariante konnte nicht nachgewiesen werden. Größere Deletionen konnten nicht ausgeschlossen werden. Die Sequenzvariante c.2753C>G ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Die VWF:Ag-Konzentration liegt bei 1,5%.

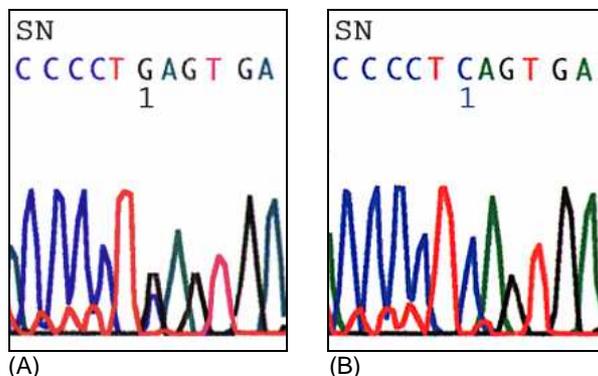


Abb.III.2.15.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.S918X. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.2753C>G im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.2753, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

F16/II/1

c.[7650_7651delCC]+c.[7650_7651delCC]
 p.[Q2551AfsX2565]+p.[Q2551AfsX2565]

Die Indexpatientin F16/II/1 ist homozygot für die Deletion c.7650_7651delCC in Exon 45 (s.Abb.III.2.16.1). Auf Proteinebene wird theoretisch bei der Nukleotidveränderung c.7650_7651delCC eine Verschiebung des Leserasters, 15 veränderte Aminosäuren mit einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.2565 erwartet und korreliert mit der C2 Domäne. Die Deletion wurde durch eine Heteroduplexanalyse bestätigt, indem sie sich durch zusätzliche Bandenbildungen vom Wildtyp unterschied (s.Abb.III.2.16.2). Die Deletion c.7650_7652delCC ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Die Messung der VWF:Ag-Konzentration ergab <1%.

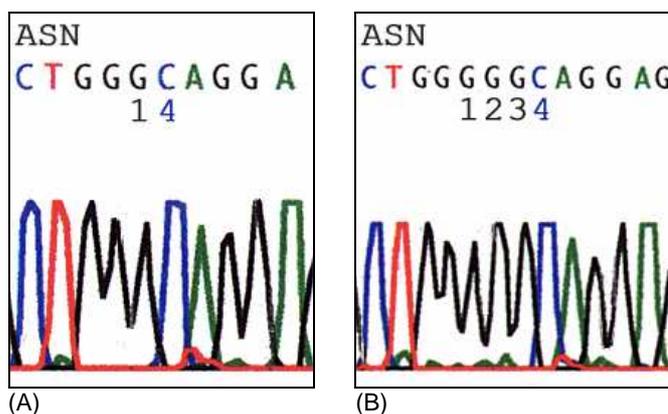


Abb.III.2.16.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Mutation c.7650_7651delCC. Die Sequenzierung zeigt folgende 2-Basendeletion an Position c.7650_7651delCC im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.7652, 2 Position c.7651, 3 Position c.7650, 4 Position c.7649, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

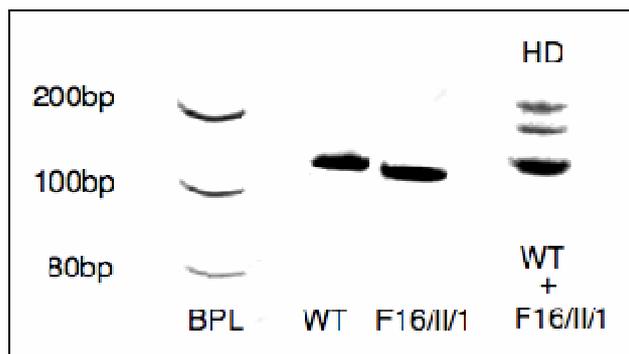


Abb.III.2.16.2: Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Mutation c.7650_7651delCC. Die Heteroduplexanalyse des VWF-Gens präsentiert nach Mischen der Proben des Wildtyps und der Patientin F16/II/1 aberrierende Banden. Zusätzlich ist, aufgrund des Vorliegens einer homozygoten Mutation, ein dezenter Größenunterschied der Banden zwischen dem Wildtyp und der Patientin F16/II/1 zu erkennen. (BPL steht für Basenpaarleiter, HD für Heteroduplex und WT für Wildtyp)

F17/II/1

c.[2435delC]+c.[=]
 p.[P812RfsX842]+p.[=]

Die Indexpatientin F17/II/1 ist heterozygot für die Deletion c.2435delC. Die Deletion c.2435delC wurde bereits bei Patient F7/II/1 vorgestellt (s.S.37). Eine

2. Sequenzvariante konnte nicht nachgewiesen werden. Größere Deletionen konnten nicht ausgeschlossen werden.

Die VWF:Ag-Konzentration lag bei <1%.

F18/II/1

c.[6222_6223insAACC]+c.[6911G>A]
p. [K2075NfsX2090]+p.[C2304Y]

Die Indexpatientin F18/II/1 ist compound-heterozygot für die Insertion c.6222_6223insAACC in Exon 36 (s.Abb.III.2.18.1), die mit der D4 Domäne korreliert und für die Sequenzvariante c.6911G>A in Exon 40 (s.Abb.III.2.18.3), die mit der Missensemutation p.C2304Y in der B1 Domäne korreliert.

Auf Proteinebene wird theoretisch bei der Nukleotidveränderung c.6222_6223insAACC eine Verschiebung des Leserasters, 16 veränderten Aminosäuren mit einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.2090 erwartet.

Die Insertion wurde durch eine Heteroduplexanalyse bestätigt, indem sie sich durch zusätzliche Bandenbildung vom Wildtyp unterschied (s.Abb.III.2.18.2).

Die Missensemutation p.C2304Y konnte mit dem Restriktionsenzym Eco 72 I bestätigt werden, da es zu zusätzlichen Schnittstellen für dieses Enzym kam (s.Abb.III.2.18.4).

Die Sequenzvarianten c.6222_6223insAACC und c.6911G>A sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Die VWF:Ag-Konzentration lag 3%.

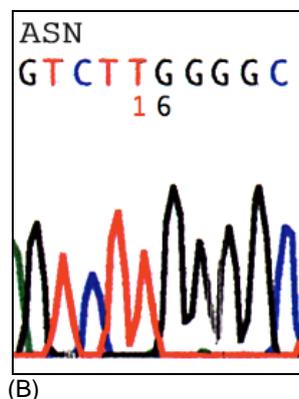
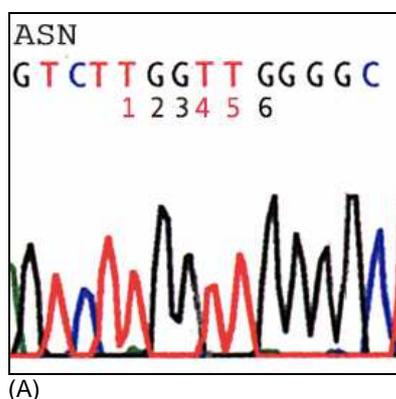


Abb.III.2.18.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Insertion c.6222_6223insAACC nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 4-Baseninsertion an Position c.6222_6223insAACC im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.6223, 6 Position c.6222, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

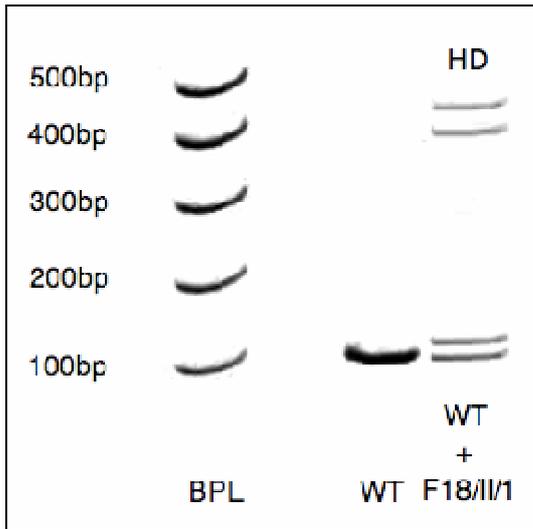


Abb.III.2.18.2: Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Insertion c.6222_6223insAACC nach Klonierung. Die Heteroduplexanalyse des VWF-Gens präsentiert nach Mischen der Proben des Wildtyps und der Patientin F18/II/1 aberrierende Banden. (BPL steht für Basenpaarleiter, HD für Heteroduplex und WT für Wildtyp)

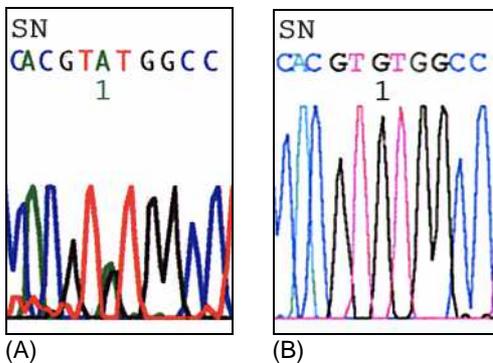


Abb.III.2.18.3: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2304Y. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.6911G>A im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.6911, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

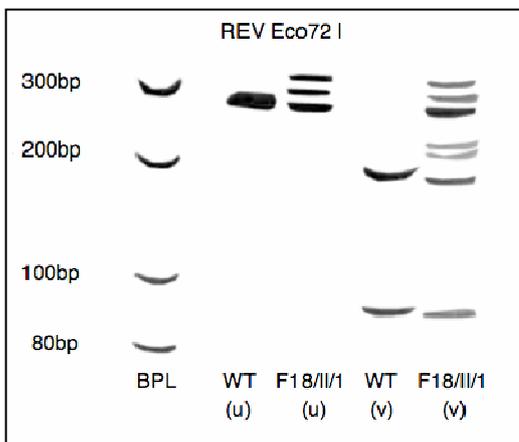


Abb.III.2.18.4: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2304Y. Der REV zeigt zusätzliche Schnittstellen durch die Missensemutation p.C2304Y für das Enzym Eco72 I durch das Auftreten zusätzlicher Banden bei Patientin F18/II/1 im Gegensatz zum Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

F19/II/1

c.[5557C>T]+ c.[5557C>T]
p.[R1853X]+p.[R1853X]

Die Indexpatientin F19/II/1 ist homozygot für die Sequenzvariante c.5557C>T in Exon 32 (s.Abb.III.2.19.1), die mit der Nonsensemutation p.R1853X in der A3 Domäne korreliert.

Die Sequenzvariante c.5557C>T wurde bereits in der Literatur von Zhang et al. 1992b beschrieben. Die VWF:Ag-Konzentration ist mit 3% sehr niedrig.

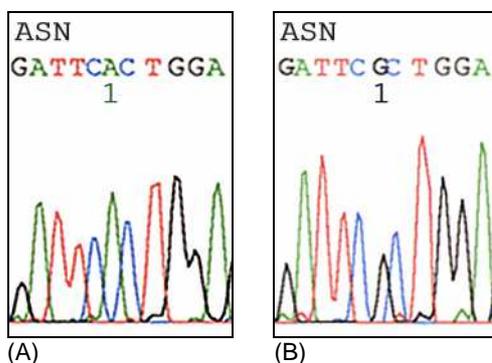


Abb.III.2.19.1: Sequenzierung des VWF-Gen bei der Nonsensemutation p.R1853X. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.5557C>T im VWF-Gen (A) im Vergleich zum Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.5557, ASN steht für Sequenzierung in

F20/II/1

c.[5053+3a>g]+c.[8215T>C]
p.?.+p.[C2739R]

Die Indexpatientin F20/II/1 ist compound-heterozygot für die Sequenzvariante c.5053+3a>g am Ende des Exon 28 und für die Sequenzvariante c.8215T>C in Exon 51. Die Sequenzvariante c.5053+3a>g wurde bereits bei Patient F7/II/1 (s.S.37) und die Sequenzvariante c.8215T>C bei Patient F12/II/1 vorgestellt (s.S.43). Die Messung der VWF:Ag-Konzentration ergab 36%, wobei nicht verifiziert werden konnte, ob es sich um einen Substitutionseffekt handelt.

F21/II/1

c.[2435delC]+c.[2435delC]
p.[P812RfsX842]+p.[P812RfsX842]

Die Indexpatientin F21/II/1 ist homozygot für die Deletion c.2435delC.

Die Deletion c.2435delC wurde bereits bei Patient F7/II/1 vorgestellt (s.S.37).

Die VWF:Ag-Konzentration lag bei < 1%.

F22/II/1

c.[374_387del14]+c.[2269_2270delCT]
 p.[G125VfsX127]+p.[L757VfsX778]

Die Indexpatientin F22/II/1 ist compound-heterozygot für die Sequenzvariante c.374_387del14 in Exon 5 (s.Abb.III.2.22.1) und für die Sequenzvariante c.2269_2270delCT in Exon 17 (s.Abb.III.2.22.2). Auf Proteinebene wird bei der Nukleotidveränderung c.374_387del14 theoretisch eine Aminosäurenveränderung von Glycin an Position p.125 nach Valin erwartet mit einer Verschiebung des Leserasters, 3 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.127. Auf Proteinebene wird bei der Nukleotidveränderung c.2269_2270delCT theoretisch eine Aminosäurenveränderung von Leucin an Position p.757 nach Valin erwartet, eine Verschiebung des Leserasters, 22 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigen Terminationskodon an Position p.778. Beide Deletionen konnten durch eine Heteroduplexanalyse bestätigt werden, indem sie sich jeweils durch zusätzliche Bandenbildung vom Wildtyp unterschieden (s.Abb.III.2.22.1 und Abb.III.2.22.3). Die Deletion c.2269_2270delCT stammt vom Vater F22/I/1 und die Deletion c.374_387del14 von der Mutter F22/I/2 (s.Abb.III.2.22.4). Der Bruder F22/II/2 wies auf Exon 5 und 17 eine Wildtypsequenz auf. Die Deletion c.374_387del14 ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Die Deletion c.2269_2270delCT ist bereits von Baronciani et al. 2003 beschrieben worden. Die VWF:Ag-Konzentration ist aus Tabelle III.2.22.1 ersichtlich.

Untersuchter Patient	VWF:Ag (%)
F22/I/1	57
F22/I/2	56
F22/II/1	<1
F22/II/2	116

Tab.III.2.22.1: VWF:Ag-Konzentrationen bei Familie 22

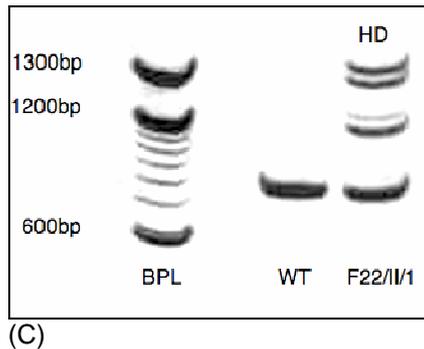
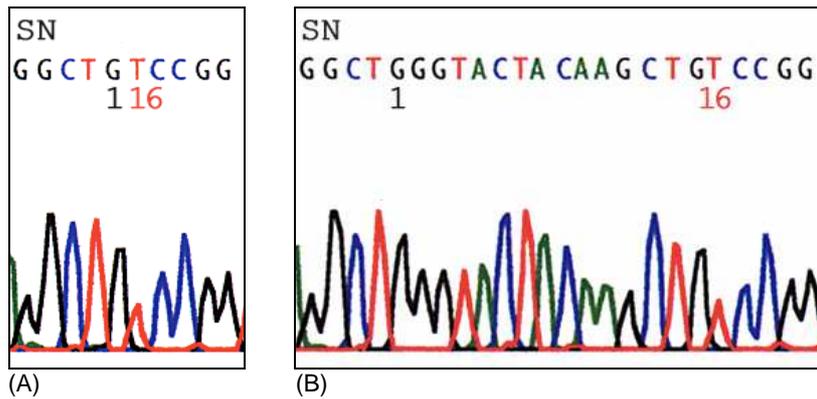


Abb.III.2.22.1: Sequenzierung und Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.374_387del14 nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 14-Basendeletion an Position c.374_387del14 im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). Die Heteroduplexanalyse des VWF-Gens der Patientin F22/II/1 präsentiert abberierende Banden. Der Wildtyp präsentiert eine Homoduplex, die in ihrer Größe mit dem Wildtyp parallel der Patientin F22/II/1 übereinstimmt (C). (1 kennzeichnet Position c.373, 16 Position c.388, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung, BPL für Basenpaarleiter, HD für Heteroduplex und WT für Wildtyp)

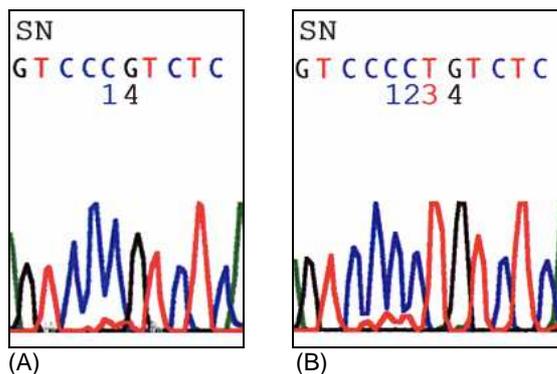


Abb.III.2.22.2: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Deletion c.2269_2270delICT nach Klonierung. Die Sequenzierung zeigt folgende 2-Basendeletion an Position c.2269_2270delICT im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.2268, 2 Position c.2269, 3 Position c.2270, 4 Position c.2271, SN steht für Sequenzierung in Senserichtung)

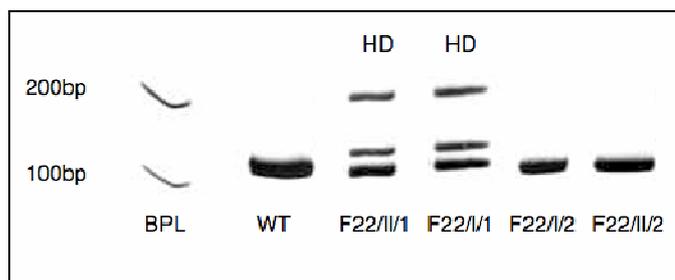


Abb.III.2.22.3: Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.2269_2270delICT nach Klonierung. Die Heteroduplexanalyse des VWF-Gens der Patienten F22/II/1 und F22/II/1 zeigt abberierende Banden. Der Wildtyp und die Patienten F22/II/2, F22/II/2 präsentieren jeweils eine Homoduplex, die in ihrer Größe mit dem Wildtyp parallel der Patienten F22/II/1 und F22/II/1 übereinstimmt. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, HD für Heteroduplex und WT für Wildtyp)

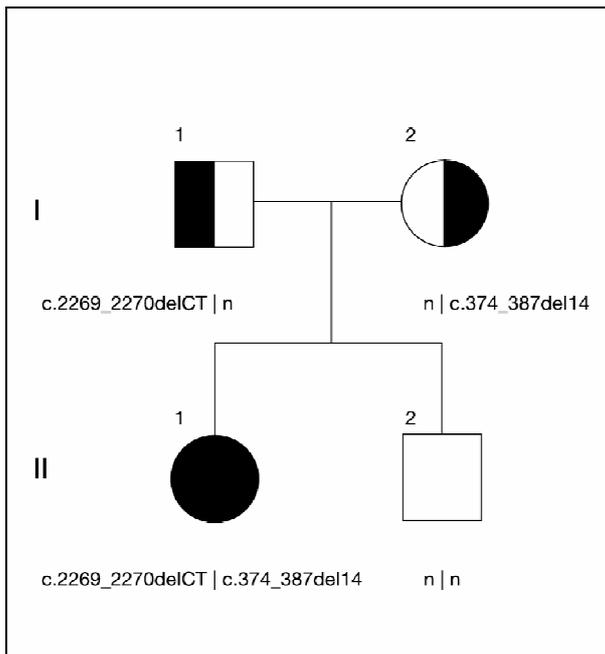


Abb.III.2.22.4:
Stammbaum der Familie
22: I.1: Vater heterozygot
für c.2269_2270delCT, I.2:
Mutter heterozygot für
c.374_387del14, II.1:
Indexpatientin compound
heterozygot für
c.2269_2270delCT und für
c.374_387del14, II.2:
Bruder n: keine
festgestellten Mutationen

F23/II/1

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

p.[C2754W]+p.[=]

Die Indexpatientin F23/II/1 ist heterozygot für die Sequenzvariante c.8262T>G in Exon 52 (s.Abb.III.2.23.1). Diese korreliert mit der Missensemutation p.C2754W in der CK Domäne. Auf Proteinebene wird bei der Nukleotidveränderung c.8262T>G theoretisch eine Aminosäurenveränderung von Cystein an Position p.2754 nach Tryptophan erwartet. Die Missensemutation p.C2754W konnte durch einen Restriktionsenzymverdau mit Hae III bestätigt werden, da diese Veränderung zu einer neuen Schnittstelle für das Enzym geführt hat (s.Abb.III.2.23.2). Eine 2. Sequenzvariante konnte nicht nachgewiesen werden. Größere Deletionen konnten nicht ausgeschlossen werden. Die Missensemutation p.C2754W wurde in der Literatur bereits von Schneppenheim et al. 2001a beschrieben. Eine VWF:Ag-Konzentration lag nicht vor.

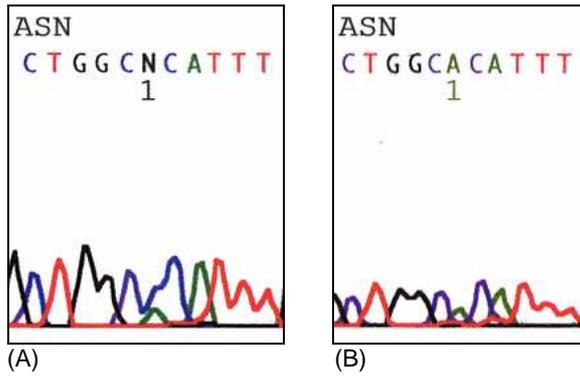


Abb.III.2.23.1: Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2754W. Die Sequenzierung zeigt folgenden Basenaustausch an Position c.8262T>G im VWF-Gen (A) im Vergleich mit dem Wildtyp (B). (1 kennzeichnet Position c.8262, ASN steht für Sequenzierung in Antisense-richtung)

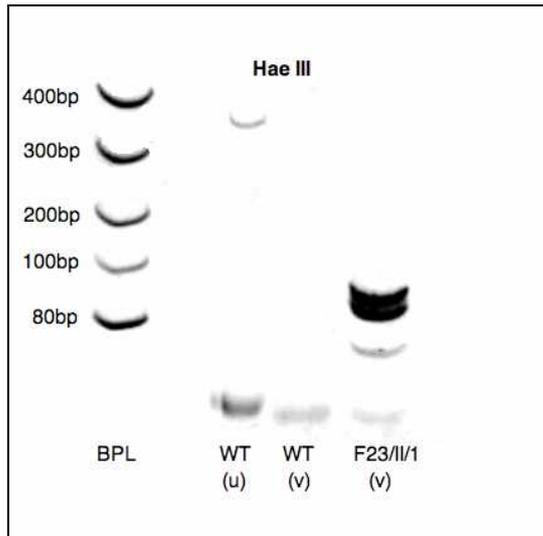


Abb.III.2.23.2: Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2754W. Der REV zeigt eine zusätzliche Schnittstelle durch die Missensemutation p.C2754W für das Enzym Hae III durch das Auftreten zusätzlicher Banden bei Patientin F23/II/1 im Gegensatz zum Wildtyp. (BPL steht für Basenpaarleiter, bp für base pairs, REV für Restriktionsenzymverdau, (u) für unverdaut, (v) für verdaut und WT für Wildtyp)

IV. Diskussion

In dieser Studie wurden 23 nicht miteinander verwandte Indexpatienten mit dem autosomal-rezessiv vererbten VWS Typ 3 auf Sequenzvarianten des VWF-Gens untersucht.

Homozygote oder compound -heterozygote Mutationen konnten bei 17 von 23 Indexpatienten und somit eine Bestätigung der Diagnose festgestellt werden. Unter den sechs Indexpatienten, die in dieser Studie nicht komplett aufgeklärt wurden, konnte bei fünf Patienten eine heterozygote Sequenzvariante und bei einer Patientin keine Sequenzvariante identifiziert werden. Größere heterozygote Deletionen konnten nicht ausgeschlossen werden.

In diesem Kollektiv wurden 26 unterschiedliche Sequenzvarianten nachgewiesen, von denen sieben homozygot und 27 heterozygot vorlagen. Mehr als die Hälfte der identifizierten Mutationen (17/26) führen zu einem Nullallel, wie es für das VWS Typ 3 typisch ist (*Zhang et al. 1997*). Die häufige c.2435delC Deletion in Exon 18 wurde bei sieben Patienten entdeckt; jeweils in 2 Fällen homozygot und in 5 Fällen heterozygot.

Wiederholt fanden sich außerdem die Sequenzvarianten c.5053+3a>g und p.C2739R. Alle anderen Sequenzvarianten waren auf je eine einzige Familie beschränkt, was die bereits bekannte molekulare Heterogenität des schweren VWS Typ 3 bestätigt.

Die in dieser Arbeit identifizierten Missensemutationen wurden weiterhin auf ihre Konsequenz auf Proteinebene durch in-vitro Expressionsstudien im hämatologischen Labor von Prof. Dr. Schneppenheim untersucht und sind **nicht** Bestandteil dieser Arbeit.

IV.1 Kausalität der Mutationen

- a) Die Konstellation compound Heterozygotie oder homozygote Sequenzvariante wurde nur bei erkrankten Indexpatienten festgestellt und nicht bei gesunden Familienmitgliedern.
- b) Die Sequenzvarianten, die als sehr wahrscheinlich kausal betrachtet werden, wurden nur bei den Indexpatienten identifiziert und nicht bei 100 untersuchten Normalpersonen (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit).

- c) Unter den 26 identifizierten Sequenzvarianten führen 17, infolge einer numerischen Sequenzveränderung zu einem Nullallel. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserasters und einem vorzeitigen Terminationskodon. In den meisten Fällen wird ein Nonsense-mediated-decay der RNA als Ursache für das Fehlen eines Translationsproduktes vorliegen.

IV.2.1 Deletionen

Deletionen stellen eine typische Mutationsform hinsichtlich des VWS Typ 3 dar, weil sie zu einem Nullallel führen. Die ersten genetischen Defekte, die bei VWS Typ 3-Patienten entdeckt wurden, bestanden aus großen Gendeletionen.

Darauf basierend, entstand die Vorstellung, dass diese Mutationsform die typische Ursache für das VWS Typ 3 darstellt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Zahl der kleineren Deletionen überwiegt und große komplette oder partielle Gendeletionen eher vereinzelt gefunden wurden (*Baronciani et al. 2003, Eikenboom. 2001, Schneppenheim et al. 1994*).

Dementsprechend wurden in dieser Arbeit sechs verschiedene Deletionen detektiert, von denen, bis auf eine Ausnahme, alle 1bp bis 2bp groß sind. Die größte in dieser Studie gefundene Deletion umfasst 14 Basen s. u. Tabelle IV.2.1.1.

Die häufigste Deletion in dieser Arbeit stellt die Deletion c.2434delC in Exon 18 dar.

Zum ersten Mal wurde sie von Zhang et al. 1992a in Schweden und Schneppenheim et al. 1994 in Deutschland beschrieben.

Sie kam insgesamt mit einer Allelfrequenz von 19,57% (9/46 Allele) vor. Zieht man nur die deutschen Indexpatienten in Betracht, so tritt die c.2435delC-Mutation zu 18,4% auf (7/38 Allele). Damit kommt diese Mutation im deutschen Kollektiv in dieser Studie am häufigsten vor, entsprechend den Ergebnissen von Schneppenheim et al. 1994 ebenfalls in einem deutschen Kollektiv und den Resultaten von Zhang et al. 1992a mit einer schwedischen Untersuchungsgruppe. Eine weitere Studie wies, jedoch eine niedrige Frequenz für c.2435delC nach (1/48 Allele). Es wurden deutsche Patienten untersucht,

sodass folglich diese Deletion zunächst als untypisch für deutsche VWS Typ 3-Patienten klassifiziert wurde (*Mertes et al. 1993*).

Nach Haplotypanalysen ist jedoch anzunehmen, daß es sich hierbei um eine alte baltisch-slawische Mutation handelt, denn sie tritt in den Ostsee-Anrainerstaaten gehäuft auf (s.Abb.IV.5.2, s.S.78) und ist vermutlich auf einen gemeinsamen genetischen Ursprung zurückzuführen (*Schneppenheim et al. 1999 und Schneppenheim. 2004a*).

Somit ist das Auftreten der c.2435delC-Mutation u.a. auch in Deutschland als typisch zu klassifizieren.

Unter den, in dieser Studie identifizierten Deletionen, ist lediglich eine weitere Deletion (c.2269_2270delCT) bereits beschrieben worden (*Baronciani et al. 2003*).

Alle in dieser Studie festgestellten Deletionen führen zu einer Verschiebung des Leserasters während der Translation, so dass es sowohl zur Veränderung von Aminosäuren und zur Entstehung eines prämaturnen Stopkodons kommt.

Die Anzahl der veränderten Aminosäuren sowie die Position des vorzeitigen Stopkodons werden in Tabelle IV.2.1.1 dargestellt.

Daraus folgt, dass theoretisch aus diesen Mutationen ein Nullallel resultieren sollte; ein Umstand, der charakteristisch für ein VWS Typ 3 ist und den klinischen Phänotyp plausibel erscheinen lässt.

Deletion	Ex.	Anzahl der veränderten Aminosäuren	Position des vorzeitigen Stopkodons
c.374_387del14	5	3	p.127
c.1596_1597delCG	14	116	p.648
c.1795delG	15	52	p.650
c.2269_2270delCT	17	22	p.778
c.2435delC	18	31	p.842
c.7650_7651delCC	45	15	p.2565

Tab.IV.2.1.1: Deletionen im VWF-Gen

IV.2.2 Insertionen

Die Insertionen c.1239_1240insG, c.6222_6223insAACC und c.6256+2_6256+3inst wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal identifiziert. Insertionen kommen im Vergleich zu Deletionen viel weniger häufig vor. Der Grund könnte darin liegen, dass Deletionen energetisch weniger aufwändig sind (*Cooper und Krawczak. 1991*). Dies lässt sich entsprechend in der VWF-Datenbank feststellen. Es sind 26 Deletionen und acht Insertionen registriert. Das Verhältnis von Deletionen zu Insertionen in dieser Studie beträgt 2:1. Es traten zwei einbasige und eine vierbasige Insertion auf. Die Insertion c.6256+2_6256+3inst wird in Kapitel IV.2.5 besprochen. Bei den in dieser Studie gefundenen Insertionen kommt es zur Verschiebung des Leserasters während der Translation, weil die Anzahl der inserierten Basen in keinem Fall drei bzw. ein Vielfaches von drei beträgt, wodurch es zu einem vorzeitigen Stopkodon kommt. Folglich führen diese Insertionen zu einem Nullallel. Die Anzahl der veränderten Aminosäuren als auch die Position des vorzeitigen Stopkodons können der Tabelle IV.2.2.1 entnommen werden.

Insertion	Anzahl der veränderten Aminosäuren	Position des vorzeitigen Stopkodons
c.1239_1240insG	15	p.428
c.6222_6223ins AACC	16	p.2090
c.6256+2_6256+3inst	12	p.2034

Tab IV.2.2.1: Insertionen im VWF-Gen

IV.2.3 Duplikation

Bei Indexpatientin F5/II/1 wurde die Duplikation c.7357_7373dup17 identifiziert. Duplikation bedeutet, dass eine bestimmte Basensequenz identisch noch einmal wiederholt wird. Eine Duplikation ist zum einen sehr selten (*Cooper und Krawczak. 1991*) und zum anderen ist sie in diesem Fall relativ groß. Aktuell ist nur eine weitere Duplikation in der VWF-Datenbank registriert. Diese Duplikation verursacht eine Verschiebung des Leserasters, einhergehend mit 2 veränderten Aminosäuren und führt zu einem vorzeitigen Terminationskodon in der cDNA an Position p.2462 und damit zu einem Nullallel.

Da die Mutation zum einen sehr selten ist und zum anderen zusätzlich homozygot vorliegt ist eine Konsanguinität der Eltern als wahrscheinlich anzusehen. Die Eltern sind, nach Kenntnis der Indexpatientin, nicht miteinander verwandt, weil diese aus verschiedenen Regionen Marokkos stammten. Aufgrund der zwei vorliegenden Nullallele ist die niedrige VWF:Ag-Konzentration von <1% plausibel.

IV.2.4 Nonsense-Mutationen

In dieser Studie wurden 26 unterschiedliche Mutationen lokalisiert, von denen fünf in ein Stopkodon münden (p.S918X, p.Q1311X, p.Q1652X, p.R1853X und p.Y2392X). Die Triplets TAA, TAG und TGA stellen im Rahmen der Proteinbiosynthese ein Stopkodon dar.

Aus der VWF-Datenbank (<http://www.sheffield.ac.uk/vwf>) ist ersichtlich, dass bisher insgesamt 25 Nonsensemutationen bei VWS Typ 3 identifiziert werden konnten; davon 7 aus CGA-Triplets, die für die Aminosäure Arginin kodieren; durch die Transition CGA nach TGA entsteht ein prämaures Terminationskodon. Es liegen 11 CGA-Kodons im gesamten VWF-Gen vor (*Baronciani et al. 2003*).

Dieser relativ hohe Anteil, der CGA>TGA-Mutationen, kann dadurch erklärt werden, daß zum einen methylierte CG-Dinukleotide sogenannte hotspots für Mutationen darstellen, somit leichter mutieren (*Bird. 1980, Eikenboom et al. 1992 und 1998*) und zum anderen Transitionen (Ersatz eines Purins durch ein anderes Purin bzw. Ersatz eines Pyrimidins durch ein anderes Pyrimidin) häufiger als Sequenzabweichungen vorkommen im Vergleich zu Transversionen (Ersatz eines Purins durch ein Pyrimidin oder vv) (*Cooper und Krawczak. 1990*).

In dieser Arbeit ist nur eine Mutation an einem CG-Dinukleotid lokalisiert worden: p.R1853X, hierbei kam es zu einer CGA >TGA Transition. Sie tritt bei der Indexpatientin F19/II/1 in homozygoter Form auf. Diese Sequenzveränderung ist bereits von Zhang et al. 1992b, sowohl homozygot und heterozygot bei VWS Typ 3 Patienten als auch heterozygot bei Typ 1 Patienten beschrieben worden.

Nonsensemutationen lassen sich nicht ausschließlich über diese Sachverhalte erklären, da im VWF-Gen mehr als 1000 Triplets vorkommen, die durch eine 1-basige Nukleotidsubstitution ebenfalls in ein vorzeitiges Stopkodon umgewandelt werden können (*Baroncianni et al. 2003*), gleichzeitig aber nicht aus CG-Dinukleotiden bzw. CGA-Kodons bestehen.

Ferner ist die Nonsensemutation p.Q1311X (CAG>TAG) in dieser Studie bei einer belgischen Patientin ermittelt worden und zuvor von *Baroncianni et al. 2003* sowie von *Casaña et al. 2000* beschrieben worden. Gleichzeitig wurde eine stumme Mutation c.3951C>T detektiert.

Hierbei könnte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Genkonversion handeln, weil beide Mutationen mit der Sequenz des VWF-Pseudogens übereinstimmen (*Casaña et al. 2000 und Baroncianni et al. 2003*). Es ist die erste Nonsensemutation in der A1-Domäne des VWF (*Casaña et al. 2000*).

Desweiteren wurde die Mutation p.Q1311X bereits bei einem iranischen und indischen Patienten (*Baroncianni et al. 2003*) und -in dieser Studie- bei einer belgischen Patientin nachgewiesen. Somit ist diese Sequenzveränderung scheinbar unabhängig voneinander in drei verschiedenen Populationen aufgetreten. Dieser Umstand spricht am ehesten gegen einen founder effect. Die weiteren Nonsensemutationen p.S918X (TCA>TGA), p.Q1652X (CAG>TAG), p.Y2392X (TAT>TAG) waren bisher unbekannt und werden in dieser Arbeit zum ersten Mal besprochen.

Auch in diesen Fällen entsteht durch eine 1-basige Nukleotidsubstitution ein Stopkodon. Durch eine Nonsensemutation auf einem Allel entsteht ein Nullallel, d.h. es kann theoretisch von diesem kein funktionsfähiges Protein umgesetzt werden, sodass die Identifizierung eines prämaturnen Terminationskodons, in kodierenden Genabschnitten des VWF-Gens, eine an sich einleuchtende Erklärung für eine sehr niedrige bis nicht nachweisbare VWF-Plasma-Konzentration darstellt, vorausgesetzt die Nonsensemutation tritt homozygot bzw. compound-heterozygot auf.

Diese Feststellungen stehen im Einklang mit den gemessenen VWF-Antigen-Konzentrationen bei den Indexpatienten -in dieser Arbeit-, die eine Nonsensemutation tragen.

Bei Patientin F19/II/1 stand die VWF:Ag-Konzentration nicht zur Verfügung, dennoch würde sich dieser Sachverhalt bei ihr mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigen.

Vermutlich haben Nonsensemutationen bereits auf Transkriptionsproduktebene Auswirkungen und nicht erst auf Proteinebene, denn Nonsensemutationen in verschiedenen Genen können mit starker Verminderung der mRNA-Konzentration einhergehen. Für die Nonsensemutation p.Q1311X konnte eine verminderte mRNA-Konzentration in Thrombozyten nachgewiesen werden (*Casaña et al. 2000*). Desweiteren konnte bei anderen Stopkodons gezeigt werden, dass kein Transkriptionsprodukt von diesen Allelen gewonnen werden konnte (*Eikenboom et al. 1992*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nonsensemutationen, die zu einem Nullallel führen eine gute Erklärung für eine sehr niedrige bis nicht messbare VWF:Ag-Konzentration bieten.

IV.2.5 Splice-Site-Mutationen

Splice-Site-Mutationen sind Sequenzveränderungen an oder in der Nähe von Intron-Exon-Grenzen.

Bei Eukaryonten besteht das primäre Transkript alternierend aus Introns und Exons.

Exons stellen jene Abschnitte dar, die die Information für das zu realisierende Protein beinhalten.

Die Introns werden vor der Translation durch Splicen entfernt, wodurch die mRNA für die weitere Proteinbiosynthese entsteht (*Lehninger et al. 1994*).

Durch Basenpaarveränderungen in der Nähe oder direkt an Splice-Sites, ist es möglich, dass sie beim Splicen nicht erkannt werden.

Infolgedessen kann es zum Exonskipping kommen, da die Splice-Sites innerhalb der Introns, die das betroffene Exon flankieren, nicht erkannt werden.

Weiterhin kann es durch Splice-Site-Mutationen im Rahmen der Transkription zu einem Nonsense-mediated decay der RNA kommen (*Nesbitt et al. 1999*).

Die Splice-Sites zu Beginn eines Exons (5'-Ende) „ag“ bzw. am Ende des Exons (3'-Ende) „gt“ sind hochkonservativ (*Krawczak, Reiss, Cooper. 1992*), da diese Positionen bei vielen anderen Eukaryonten gleich und somit wichtig sind. Laut VWF-Datenbank (<http://www.sheffield.ac.uk/vwf>) sind bereits 12 potentielle Splice-Site-Mutationen lokalisiert worden.

Es wurden in dieser Studie drei potentielle Splice-Site-Mutationen identifiziert: c.3379+1g>a, c.5053+3a>g und c.6256+2_6256+3inst, die im Folgenden diskutiert werden.

c.3379+1g>a

Die Mutation c.3379+1g>a formt die normale Splice-Site am 3'-Ende des Exons 25 von „gt“ nach „ga“ um. Sie ist zum ersten Mal durch *Nesbitt et al. 1999*, beschrieben worden und wiederholt von *Baronciani et al. 2003*.

Nesbitt et al. konnte durch Untersuchung der mRNA aus Thrombozyten nachweisen, dass das Allel mit dieser Splice-Site-Mutation nicht exprimiert wurde und es sich folglich um einen Nonsense-mediated decay der RNA handelt (*Nesbitt et al. 1999*).

Laut Splice-Site-Prediction Programm (http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/splice.pl) fällt diese Donor-Splice-Site des Exons 25 weg. In diesem Programm wird die Struktur sowohl der Akzeptor- als auch der Donor-Splice-Site analysiert. In dessen Datenbank befinden sich nur Gene, deren Akzeptor-Splice-Sites sich aus „ag“ und deren Donor-Splice-Sites sich aus „gt“ zusammensetzen. Das Resultat dieses Programmes besteht aus einem Wert zwischen 1 und 0, wobei 1 bedeutet, dass es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um eine Splice-Site handelt (*Reese et al. 1996*).

Somit lässt sich zunächst untersuchen, wie hoch der Wert für eine gegebene Splice-Site ist und anschließend kann die potentielle Splice-Site-Mutation analysiert werden. Was die Mutation c.3379+1g>a betrifft, so fiel die Donor-Splice-Site in dem Splice-Site-Prediction- Programm weg.

Unter der theoretischen Annahme, dass das Exon 25 nicht translatiert wird, kommt es zur Verschiebung des Leserasters und folglich zu 87 veränderten Aminosäuren und einem vorzeitigem Stopkodon an Position p.1162. Daraus

lässt sich ableiten, dass es sich bei dieser Veränderung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um eine kausale Sequenzabweichung handelt.

c.5053+3 a>g

Diese Sequenzabweichung wurde zum ersten Mal in dieser Studie bei zwei Indexpatienten F7/II/1 und F20/II/1 heterozygot entdeckt. Hierbei ist nicht die Donor-Splice-Site selber betroffen, sondern, an Position+3, ihre direkte Nachbarschaft; es kommt zu einer Basensubstitution von c.5053+3a>g. Laut Splice-Site-Prediction-Programm fällt diese Donor-Splice-Site weg, womit es theoretisch zum Splicing des Exon 28 aus dem primären Transkript kommen würde.

Diese Mutation tritt jeweils compound-heterozygot bei Patient F7/II/1 mit einem Nullallel und bei Patientin F20/II/1 mit einer Missensemutation auf.

Vorausgesetzt Exon 28 liegt in der mRNA nicht vor, dann verschiebt sich das Leseraster der Translation und führt zu einem vorzeitigem Stopkodon an Position p.1225. Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei dieser Veränderung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um eine kausale Sequenzabweichung handelt.

c.6256+2_6256+3 inst

Diese Sequenzvariante stellt eine komplexe Sequenzabweichung dar.

Sie ist zum einen eine candidate Splice-Site-Mutation und zum anderen eine Insertion und wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal identifiziert.

Nach dem Splice-Site-Prediction-Programm würde die Donor-Splice-Site des Exon 36 mit dieser Insertion wegfallen, sodaß es zu einem Skipping des Exon 36 kommen würde. Demgemäß wären 12 Aminosäuren verändert und es käme aufgrund des verschobenen Leserasters zu einem vorzeitigem Stopkodon an Position p.2034.

Sie tritt bei Patient F7/II/1 compound-heterozygot mit einer Deletion auf, folglich lägen zwei Nullallele vor. Die VWF:Antigen-Konzentration mit 2,8% im Plasma ist stark erniedrigt.

Splice-Site-Mutationen und folglich Exonskipping aufgrund von Splicingdefekten konnten durch mRNA-Untersuchungen bzw. PCR/Sequenzierungen bereits bestätigt werden sowie z.B. Skipping des Exon 14 durch Mutation an der Akzeptor-Splice-Site (*Eikenboom et al. 1998*).

Mertes et al. konnte eine g>t-Substitution an der +3 Position der Donor-Splice-Site des Exons 50 lokalisieren und bestätigte ein Skipping dieses Exons durch eine Sequenzierung aus RT-PCR-Produkten aus mRNA (*Mertes et al. 1994*).

Die in dieser Studie gefundene c.6256+2_6256+3inst-Sequenzvariante liegt ebenfalls an einer +3 Position einer Donor-Splice-Site.

Zusätzlich ist festgestellt worden, dass es durch potentielle Splice-Site-Mutationen häufiger zum Exonskipping kommt, als dass neue kryptische Splice-Sites entstehen (*Krawczak, Reiss, Cooper. 1992*), entsprechend den in dieser Arbeit lokalisierten Sequenzabweichungen, betreffen sie entweder direkt eine Donor-Splice-Site oder befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft einer Donor-Splice-Site.

Die o.g. Sachverhalte deuten alle daraufhin, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um jeweils kausale Sequenzvarianten handelt.

Nichtsdestotrotz müssten die in dieser Studie identifizierten potentiellen Splice-Site-Mutationen, bis auf die c.3379+1g>a Substitution, auf RNA-Ebene verifiziert werden.

IV.3 Missensemutationen

Missensemutationen stellen beim VWS Typ 3 keine typische Mutationsform dar, weil sie, im Gegensatz zu Deletionen, Insertionen, Splice-Site-Mutationen, Nonsensemutationen, nicht unbedingt zu einem Nullallel führen, das an sich eine sehr niedrige VWF-Antigenkonzentration erklärt (*Eikenboom. 2001*).

Aus diesem Grund muss durch funktionelle Studien überprüft werden, inwiefern lokalisierte Missensemutationen bei klinischen VWS Typ 3 Patienten kausal sein können.

In dieser Arbeit wurden insgesamt neun Missensemutationen identifiziert, von denen vier einen Verlust eines Cysteins darstellen.

Die Missensemutationen p.L129R, p.G525E, p.F2267I, p.R854Q werden im Kapitel IV.4, im Rahmen einer Familienanalyse besprochen.

Die Cysteinmutationen als auch die Mutation p.W1120S werden im Folgenden diskutiert. Es ist nochmals darauf hinzuweisen, dass alle Angaben zu in-vitro-Expressionsstudien **nicht** Bestandteil dieser Arbeit sind.

Cysteinmutationen

Die Aminosäure Cystein kommt in einem reifen VWF-Monomer in sehr großer Zahl vor. Die Aminosäure Cystein tritt in Form von Clustern auf und liegt v.a. in amino- bzw. carboxyterminalen Regionen des Proteins in großer Zahl vor (*Marti et al. 1987*). Im Verlauf der Biosynthese des VWF unterliegt der Prä-Pro-VWF posttranslational mehreren Prozessierungsschritten. U.a. erfolgt im rauen Endoplasmatischem Retikulum (rER) die Dimerisierung der VWF-Monomere durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung zwischen Cysteinen am COOH-Ende. Anschließend werden, während des Transportes durch den Golgiapparat, die VWF-Dimere am NH₂-Ende ebenfalls durch Disulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen polymerisiert bzw. multimerisiert (*de Wit et al. 2001*). Aus diesen Synthesevorgängen als auch aus der Tatsache, daß sich im VWF keine freien Sulfhydrylgruppen detektieren lassen (*Ruggeri et al. 1993*), lässt sich die Annahme ableiten, dass alle Cysteine entweder an intermolekularen oder an intramolekularen Disulfidbrückenbildungen beteiligt sind.

Die intermolekularen Disulfidbrückenbildungen sind für die Dimerisierungen bzw. Multimerisierungen von Bedeutung, wohingegen die intramolekularen Disulfidbrückenbildungen die Primärstruktur des VWF mitbestimmen (*Budde und Schneppenheim. 2001*).

In dieser Arbeit wurden folgende Mutationen identifiziert:

p.C2304Y, p.C2533R, p.C2739R, p.C2754W

Die Missensemutation p.C2304Y (TGT>TAT) liegt in der B1-Domäne und wurde bereits beschrieben (*Hilbert et al. 2003*). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte der B1-Domäne keine spezielle Funktion zugeschrieben werden.

Um qualitative Defekte aufzudecken, wurden von Tjernberg et al. 2004 funktionelle Studien durchgeführt.

Qualitative Defekte wurden untersucht, indem ein VWF-cDNA-Konstrukt mit dieser Mutation in 293-EBNA Zellen eingeschleust wurde, die den rekombinanten mutierten VWF exprimierten. Im Experiment wurde die Situation einer homozygoten Mutation nachgestellt, welche sich auf die in dieser Studie identifizierten p.C2304Y –Mutation übertragen lässt, weil sie compound-heterozygot mit einem Nullallel auftritt. Anschließend wurde die Konzentration des VWF zum einen im Zelllysate als auch im Medium gemessen. Die erste Messung entspricht der intrazellulären VWF-Konzentration im Endothel bzw. in den Thrombozyten, während die letztere der des Plasmas gleichgesetzt werden kann. Im Zelllysate war die Konzentration sehr hoch, wohingegen sie im Medium sehr niedrig war im Vergleich zum Wildtyp-VWF (*Tjernberg et al. 2004*).

Außerdem zeigte die Multimeranalyse einen Verlust der hochmolekularen als auch der intermediären Multimere wie auch eine deutliche Verringerung der Bindung von rekombinant-mutiertem VWF an GpIb (*Tjernberg et al. 2004*). Bei Betrachtung der nachbarschaftlichen WT-Aminosäuresequenz, in der das p.Cys2304 liegt, stellt man fest, dass es das erste Cystein der Sequenz Cys-Gly-Leu-Cys ist.

Mayadas et al. 1992 berichtet, von einer CGLC-Sequenz auf Proteinebene innerhalb der Prosequenz des VWF. Eine Veränderung des Abstandes der Cysteine zueinander durch Einschleusen eines Glycins in der Mitte der vier Aminosäuren resultierte in einer Verhinderung der Multimerisierung (*Mayadas und Wagner. 1992*).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass der Cysteinverlust in vivo mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einer deutlich eingeschränkten Sekretion des VWF führt.

Die niedrige VWF:Ag-konzentration von 3% der Indexpatientin F18/II/1, die compound-heterozygot für die Mutation C2304Y und für die Insertion 6222_6223insAACC ist, steht im Einklang mit diesen molekulargenetischen Befunden.

Die folgende p.C2533R-Mutation (TGT>CGT) wurde in dieser Studie zum ersten Mal lokalisiert. Sie stellt die einzige Cysteinmutation im Exon 45 in der C2-Domäne dar. Dieser Cysteinverlust ist compound-heterozygot mit einem

Nullallel. Die Expressionsstudien (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit) zu dieser Cysteinmutation zeigen eine ähnliche VWF-Konzentrationsverteilung im Lysat der Zellen und im Medium im Vergleich zu der C2304Y-Mutation s.o.

Die sehr niedrige VWF:Ag-Konzentration von 1,4% der Indexpatientin F4/II/1 ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf die vorliegende compound Heterozygotie c.3379+1g>a (Intron 25) und c.7597T>C (p.C2533R, Exon 45) zurückzuführen. Die nächste Mutation Cystein nach Arginin an der Position p.2739 (TGT>CGT), der VWF- Aminosäuresequenz, ist in dieser Form zum ersten Mal in dieser Arbeit detektiert worden, jedoch berichtete *Zhang et al. 1994* bereits von einer Aminosäuresubstitution an derselben Stelle, an der Cystein nach Tyrosin anstatt nach Arginin mutierte. Die Missensemutation p.C2739R ist bei den zwei Indexpatientinnen F12/II/1 und F20/II/1 identifiziert worden. Indexpatientin F12/II/1 trägt auf dem vermutlich anderem Allel eine 1-Basen-Deletion (c.2435delC) und Indexpatientin F20/II/1 trägt auf dem vermutlich anderen Allel die candidate Splice-Site-Mutation c.5053+3a>g.

In-vitro-Expressionsstudien (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit) zur p.C2739R-Sequenzvariante zeigen eine stark eingeschränkte Sekretionskapazität.

Desweiteren konnte für die Missensemutation p.C2739Y gezeigt werden, dass die Sekretion in solch einem Ausmaß verringert war, dass keine Multimere nachgewiesen werden konnten (*Tjernberg et al. 2004*).

Hieraus ergibt sich, dass mit aller Wahrscheinlichkeit die p.C2739R-Mutation für die Sekretionsdefekte des VWF verantwortlich ist.

Bei Patientin F12/II/1 war nur ein Wert der VWF-Antigen-Konzentration von 229,5% verfügbar; es ließ sich jedoch verifizieren, dass es sich hierbei um einen Substitutionseffekt handelte.

Ähnlich verhält es sich bei der Indexpatientin F20/II/1 mit einer VWF:Ag-Konzentration von 36% im Plasma, aber einer VWF:Ag-Konzentration in Thrombozyten von 0,5%. Folglich wird es sich ebenfalls um einen Substitutionseffekt handeln, dieser konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Die Cysteinmutation p.C2754W (TGT>TGG) ist bereits zuvor von Schneppenheim et al. beschrieben worden (*Schneppenheim et al. 2001*). Sie befindet sich in Exon 52, das für die CK-Domäne kodiert.

Diese Missensemutation wurde in diesem Fall heterozygot gefunden und stellt zudem die einzige Mutation dar, die bei dieser Indexpatientin F23/II/1 festgestellt werden konnte.

Expressionsstudien haben gezeigt, dass diese Mutation ebenfalls mit einem Sekretionsdefekt einhergeht. (*Tjernberg et al. 2004*).

Desweiteren konnte in Studien nachgewiesen werden, dass es bei der p.C2754W-Mutation zur Sekretion von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren kommen kann, die bei der Multimeranalyse zu irregulären Zwischenbanden führen (*Schneppenheim et al. 2001*).

Bei der Koexpression von rekombinantem Wildtyp VWF und rekombinantem mutiertem VWF wurden hochmolekulare Multimere detektiert, dies könnte dadurch erklärt werden, dass das mutierte Allel im Vergleich zum WT-Allel weniger VWF exprimiert und somit die normalen VWF-Untereinheiten in der Mehrzahl sind und normale VWF-Multimere bilden können. In vitro wurde durch eine Konzentrationserhöhung der aberranten VWF-Multimere gegenüber Wildtyp VWF-Multimeren eine Reduktion der hochmolekularen Multimere nachgewiesen (*Schneppenheim et al. 2001*). Gemäß Katsumi et al. 2000 ist das Cystein p.2754 wahrscheinlich nicht direkt für eine intermolekulare, sondern für eine intramolekulare Disulfidbrückenbildung verantwortlich, dennoch ist die Mutation mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit, nach den Expressionsstudien, zu urteilen, verantwortlich für Dimerisierungsdefekte (*Schneppenheim et al. 2001*). Unglücklicherweise liegt von dieser Indexpatientin F23/II/1 weder eine VWF:Ag-Konzentration noch ein weiterer klinischer Befund vor.

Somit lässt sich letztlich, bei bisherigem Vorliegen eines einzigen lokalisierten genetischen Defektes, nicht eindeutig klären, ob die Diagnosestellung fehlerfrei ist, oder ein noch nicht entdeckter weiterer Defekt die Ursache für ein eventuelles VWS Typ 3 ist.

Es bestünde die Möglichkeit, dass bei dieser Indexpatientin F23/II/1 nur die p.C2754W-Mutation vorliegt, die zu einem VWS Typ 2A Subtyp IIE führt, wie bereits von *Schneppenheim et al. 2001* beschrieben wurde.

Missensemutationen führen nicht unbedingt zu Nullallelen, sodaß eine sehr niedrige bis nicht nachweisbare VWF:Ag-Konzentration, nicht an sich plausibel erscheint.

Die Expressionsstudien haben jedoch gezeigt, dass Missensemutationen aufgrund von Sekretionsdefekten, zu quantitativen VWF-Defekten führen können (*Tjernberg et al. 2004*).

Insgesamt können die Cysteinmutationen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als kausal für u.a. das VWS Typ 3 betrachtet werden.

p.W1120S

Bei der Missensemutation p.W1120S (TGG>TCG) im Exon 25 wird ein Tryptophan durch die Aminosäure Serin ersetzt. Diese Aminosäuren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften. Tryptophan besitzt hydrophobe Seitenketten, weshalb es vermutlich eher dazu neigt, im Zentrum des Proteins verankert zu sein, wohingegen es sich bei Serin um eine Aminosäure mit polaren Seitenketten handelt, die bei physiologischem pH ungeladen sind.

Durch diesen Austausch könnten eventuell die Struktur und die Funktion des VWF gestört sein.

Diese Mutation tritt compound-heterozygot mit einem Nullallel auf. Sie wurde laut VWS-Datenbank bereits im Labor von Mazurier 1997 identifiziert (<http://www.sheffield.ac.uk/vwf/index.html>).

Interessanterweise handelt es sich in dieser Studie, um eine belgische Patientin, aufgrund eines fraglichen Foundereffektes.

Diese Mutation wurde bei keinem, in dieser Studie untersuchten Patienten, entdeckt.

Desweiteren wurde bei dieser Indexpatientin F11/II/1 keine weitere Mutation bis auf eine Deletion detektiert.

Heterozygote Cysteinmutationen in der D3-Domäne zeigen Hinweise für ein VWS Typ 1/2E mit einem relativen Verlust der großen und einer relativen Vermehrung der kleinen VWF-Multimere mit einer abnormalen Tripletstruktur. Solche Abweichungen zeigen sich weniger ausgeprägt bei Patienten mit einer milden Form eines VWS Typ 1, die auf Nicht-Cysteinmutationen, wie z.B. die Missensemutation W1120S, zurückzuführen sind (*Gadisseur et al. 2009*). Da diese Missensemutation in der D3-Domäne liegt, könnten unterschiedliche Mechanismen in Betracht gezogen werden, die zu Defekten führen könnten,

sowie Multimerisierungs- und/oder Dimerisierungsstörungen, FVIII-Bindungsstörungen oder Gp1b-Bindungsstörungen.

Um eine genauere Aussage über die Kausalität dieser Missensemutation treffen zu können, müssten Expressionsstudien durchgeführt werden.

Bei der Indexpatientin F11/II/1 wurde eine VWF:Ag-Konzentration von < 1% gemessen. Da bei ihr die Exons 2 bis 52 untersucht wurden und keine weitere Veränderung gefunden werden konnte, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die ursächliche Mutation in Kombination mit dem Nullallel handelt, die zum VWS Typ 3 führt. Eine größere Deletion müsste noch ausgeschlossen werden.

IV.4 Familienanalyse

Familie Nr.3

Bei dieser Indexpatientin F3/II/1 sind drei Missensemutationen, bei einem klinischen VWS Typ 3, identifiziert worden (s.Abb.III.2.3.5 Stammbaum). Dieser Genotyp ist für das VWS Typ 3 ungewöhnlich, weil er nicht zu einem Nullallel führt, das eine sehr niedrige VWF:Antigen-Konzentration an sich erklären würde.

Zwei Missensemutationen wurden in der Prosequenz, p.L129R (CTG>CGG) in Exon 5 in der D1-Domäne und p.G525E (GGG>GAG) in Exon 14 in der D2-Domäne, festgestellt, die für das Propeptid kodieren, als auch eine weitere Missensemutation p.F2267I (TTC>ATC), lokalisiert in Exon 39 in der D4-Domäne. Alle drei Mutationen sind in dieser Arbeit zum ersten Mal detektiert worden.

Durch Untersuchung der Eltern der Indexpatientin F3/II/1, F3/I/1 (Vater) und F3/I/2 (Mutter), konnte festgestellt werden, dass die Mutation p.L129R von einem maternalen und die Mutation p.G525E von einem paternalen Allel stammen.

Das Propeptid besitzt mehrere Funktionen wie die Multimerisierung der VWF-Dimere und den gerichteten Transport der nonkovalenten VWF-Multimer-Propeptid-Komplexe in Weibel-Palade-Körperchen zur intrazellulären

Speicherung. Das VWF-Propeptid kommt im Verhältnis 1:1 mit reifen VWF-Multimeren in den Weibel-Palade-Körperchen vor (*Wagner et al. 1991*). Abgesehen davon besitzt es vermutlich weitere Aufgaben, da bei Verletzungen des Gefäßendothels sowohl VWF-Propeptid als auch reife VWF-Multimere freigesetzt werden. Es wird vermutet, dass das VWF-Propeptid eine regulierende Rolle in inflammatorischen und zelladhärierenden Prozessen spielt. Außerdem ist das Propeptid fähig, an Bestandteile des Subendothels, sowie u.a. an Integrine und Kollagentyp I, zu binden. Desweiteren kann es eine Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation inhibieren, wodurch eine regulatorische Eigenschaft des Propeptides demonstriert wird, um z. B. eine überschießende Wirkung von reifem VWF zu verhindern. (*de Wit et al. 2001*). Da die ersten zwei der o.g. Missensemutationen in der Prosequenz lokalisiert sind, könnten funktionell defekte VWF-Multimere als Folge nicht voll funktionsfähiger VWF-Propeptide entstehen als auch eine Beeinträchtigung des gerichteten Transportes.

Zu den Mutationen wurden Expressionsstudien durchgeführt (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit).

Es wurden drei verschiedene Vererbungsmodi simuliert und zwar die zwei Mutationen jeweils in homozygoter Form, jeweils heterozygot mit einer WT-Sequenz und eine compound Heterozygotie der zwei Mutationen. Unter der Vorstellung, dass die zwei Mutationen homozygot vorliegen, konnte festgestellt werden, dass die VWF:Ag-Konzentration im Lysat der Zellen sehr hoch war im Vergleich zur VWF:Ag-Konzentration des Wildtyps. Dementsprechend war die Konzentration des rekombinant-mutierten VWF im Medium sehr niedrig.

Im Medium wies die Missensemutation p.G525E immerhin noch mit 20,4 % ca. ein Fünftel der VWF:Ag-Konzentration des Wildtyps auf, im Gegensatz zur sehr niedrigen VWF:Ag-Konzentration der Mutation p.L129R mit <0,04%.

Anschließend wurde ein heterozygoter Vererbungsmodus für beide Mutationen nachgeahmt, indem ein rekombinant- mutierter VWF mit einem rekombinanten Wildtyp VWF koexprimiert wurde.

Dabei stellte sich heraus, dass bei beiden Mutationen p.L129R und p.G525E immer noch eine starke Retention von VWF in den Zellen vorlag, wenngleich auch eine geringere im Vergleich zu den Expressionen mit den homozygoten Mutationen.

Jedoch konnten gleichzeitig, zwischen den zwei Missensemutationen bei der Simulation des Vorliegens einer Heterozygotie verschiedene Tendenzen beobachtet werden.

Im Medium war die VWF:Ag-Konzentration der p.L129R-Mutation mit 24,6% vom WT zwar im Vergleich mit dem Wildtypen stark vermindert, aber gleichzeitig, im Vergleich mit der homozygoten Expression, stark erhöht. Im Gegensatz dazu war die VWF:Ag-Konzentration der G525E-Mutation mit 20,4% im Medium unverändert im Vergleich zur homozygoten Expression und folglich niedriger als bei der p.L129R-WT-Koexpression.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Proteinprodukte der rekombinant-mutierten VWF-Plasmide unterschiedlich auf die Anwesenheit der Proteinprodukte der rekombinant-WT-VWF-Plasmide reagieren.

Es scheint, dass VWF-Derivate mit der p.L129R-Mutation in stärkerem Ausmaß durch einen WT-VWF kompensiert werden können, wohingegen sich die VWF-Produkte mit der p.G525E-Mutation relativ unbeeinflusst zeigen, was die VWF:Ag-Konzentration im Medium betrifft.

Abschließend wurde eine compound Heterozygotie durch Expressionen nachgeahmt, indem die zwei Mutationen p.L129R und p.G525E koexprimiert wurden.

Dabei wurde ebenfalls eine starke Retention von VWF:Antigen mit 89,6% vom WT im Lysat der Zellen nachgewiesen und parallel eine sehr niedrige VWF:Ag-Konzentration im Medium mit 7,4 % vom WT gemessen.

Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass sich die Missensemutationen gegenseitig negativ beeinflussen, da die VWF:Ag-Konzentration im Medium bei der Koexpression beider Mutationen niedriger ist, im Vergleich zu den einzeln gemessenen VWF:Ag-Konzentrationen im Medium in den homozygoten Expressionsreihen, wenn man diese addiert und den Mittelwert bildet.

Die Sequenzvariante p.F2267I befindet sich in Domäne D4. In-vitro-Expressionenstudien (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit) konnte bezüglich Retention oder Sekretion kein funktioneller Defekt detektiert werden. Es handelt sich gleichzeitig um eine de novo Sequenzvariante, da sie weder bei den Eltern noch bei dem Bruder der Indexpatientin entdeckt werden konnte.

Die Ergebnisse bezüglich der p.L129R- und p.G525E-Expressionen lassen sich auf die Familie 3 übertragen.

Die Indexpatientin ist compound-heterozygot für die zwei Missensemutationen in der Prosequenz, während ihre Mutter (F3/I/2) die Mutation p.L129R und ihr Vater (F3/I/1) die Mutation p.G525E trägt. Der Bruder erbte normale VWF-Allele.

Die Parameter VWF:Ag aus dem Plasma und aus Thrombozyten, VWF-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und FVIII-Koagulationsaktivität sind bei der Indexpatientin, entsprechend den Expressionsergebnissen, sehr niedrig und z.T. nicht nachweisbar (s.Tab.IV.4.1). Dies stellt eine typische Konstellation für einen VWS Typ 3 dar.

Die Laborparameter VWF:Ag aus dem Plasma, VWF-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität des Vaters sind mäßig erniedrigt und die FVIII-Koagulationsaktivität befindet sich im Normbereich. Im Vergleich dazu sind die Werte der Mutter insgesamt niedriger (s.Tab.IV.4.1). Die Eltern sind als heterozygote Anlageträger für das VWS Typ 3 einzuordnen. Der Bruder der Indexpatientin weist physiologische Laborergebnisse auf.

Klinisch zeigt die Indexpatientin v.a. stärkere Schleimhautblutungen in der Mundhöhle im Rahmen von Zahnextraktionen und Hypermenorrhoeen.

Sie wird bei Bedarf mit Haemate HS, einem FVIII/VWF-Präparat substituiert und erhält gleichzeitig eine orale Kontrazeption mit Ovysmen.

Fam	Sequenzvarianten	VWF:Ag (P)	VWF:Ag(T.)	VWF: RiCof	FVIII
F3/II/1	p.[L129R]+p.[G525E;F2267I]	<1%	nn	<5%	1,5%
F3/I/1	p.[G525E]+[=]	40%	kDv	28%	75%
F3/I/2	p.[L129R]+[=]	8%	8 U/10 ¹¹ Thr	6%	30%
F3/II/2	[=]+[=]	66%	kDv	>100%	>100 %

Tab. IV.4.1: Familie 3: Mutationen und klinische Daten.

FVIII: FVIII-Aktivität N: 60-150%, Fam: Familie, kDv keine Daten vorhanden, nn: nicht nachweisbar, N: Normbereich, (P): Plasma, (T): Thrombozyten, VWF:Ag im Plasma N: 50-160%, VWF:Ag in Thrombozyten N: 10-50 U/10¹¹, VWF-RiCof: VWF-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität, VWF:RiCof N: >60%, FVIII-Aktivität N: 60-150%, WT: Wildtyp, RiCof testet die Fähigkeit von VWF an normale Thrombozyten zu binden in Anwesenheit von Cofaktor Ristocetin, der vorzugsweise die hochmolekularen Anteile von VWF-Multimeren erkennt (Favaloro. 2001).

Familie Nr.4:

In dieser Familie (s.Abb.III.2.4.6 Stammbaum) erbte die Indexpatientin F4/II/1 folgende zwei Missensemutationen p.R854Q in Exon 20 und p.C2533R in Exon 45 von ihrem Vater und eine potentielle Splice-Site-Mutation c.3379+1g>a, die sehr wahrscheinlich zum Skipping von Exon 25 führt, von ihrer Mutter.

Die Mutationen c.3379+1g>a und p.C2533R sind bezüglich ihrer Kausalität in Kapitel IV.2.5 und Kapitel IV.3 besprochen worden.

Die Mutation p.R854Q ist im Gegensatz zu den zwei zuvor genannten Mutationen bereits bekannt und laut VWS-Datenbank

(<http://www.sheffield.ac.uk/vwf>) von Kroner et al. 1991b, Mazurier. 1992, Schneppenheim et al. 1996a beschrieben worden. Sie macht 94% der Typ 2N Mutationen aus und stellt somit eine sehr häufige Typ 2N Mutation dar. Das VWS Typ 2N, mit autosomal-rezessivem Erbgang, ist durch eine defekte FVIII-Bindestelle des VWF charakterisiert, sodass hauptsächlich die sekundäre Hämostase gestört ist (*Mazurier et al. 2001*).

Gerade diese Vererbungskonstellation ist zuvor schon untersucht worden, wobei festgestellt wurde, dass die Ko-Vererbung von p.R854Q auf einem Allel mit einem Nullallel die symptomatische Ausprägung des VWS innerhalb einer Familie verschlechtert hat. Die Familienmitglieder unter ihnen, die nur heterozygot waren, wiesen geringfügige Blutungssymptome auf (*Rodeghiero und Castaman. 2001*). Das lässt darauf schließen, dass eventuell auch die Ko-Vererbung zweier verschiedener VWF-Allele, mit Mutationen anderer VWS Typen, den Schweregrad der Erkrankung erhöht.

So könnte man vermuten, dass die Ausprägung der Erkrankung bei der Indexpatientin F4/II/1 dadurch verschlechtert wird, weil sie zum einen die p.R854Q-Mutation auf einem Allel in Kombination mit einer potentiellen Splice-Site-Mutation auf dem 2. Allel geerbt hat. Exakt diese Situation wurde bei Nesbitt et al. 1999 beschrieben. Die Ergebnisse jenes Patienten zeigen, dass die VWF:Ag-Konzentration mit 46 IU/dl (N: 46-146 IU/dl) und die VWF:RiCof-Aktivität mit 42 IU/dl (N:50-172 IU/dl) gerade noch im unteren Normbereich bis mäßig erniedrigt sind, während die FVIII-Koagulationsaktivität mit 20 IU/dl (N: 52-140 IU/dl) in stärkerem Ausmaß reduziert ist (*Nesbitt et al. 1999*).

Daraus lässt sich ableiten, dass vermutlich eher die Cysteinmutation p.C2533R auf dem paternalen Allel, für die Intensität der Erkrankung der Indexpatientin

F4/II/1 in Kombination mit dem Nullallel ausschlaggebend ist, weil u.a die VWF:Antigen-Konzentration mit 4% sehr viel niedriger ist.

Die Eltern der Indexpatientin weisen bezüglich der VWF:Ag-Konzentration geringfügige Verringerungen gegenüber dem Normbereich auf, während die VWF-Kollagenbindungsaktivität normal ist (s.Tab.IV.4.3).

Die Multimeranalysen zeigen bei beiden ein normales Muster an, lediglich die Anfärbung im Vergleich zum normalen Plasmapool ist leicht vermindert (Befund Prof. Dr. Budde).

Diese Laborergebnisse wären charakteristisch für ein VWS Typ 1 bezüglich der Vorgeschichte sind die Eltern als asymptotische heterozygote Anlageträger für das VWS Typ 3 einzuordnen.

Fam.	Sequenzvarianten	VWF:Ag (P)	VWF:Ag (T)	VWF:CB	VWF:FVIII
F4/II/1	c.[2561G>A;7597T>C]+ c.[3379+1g>a]	4%	kDv	1,6%	2%
F4/I/1	c.[2561G>A;7597T>C]+ c.[=]	47%	13,1 U/10 ¹¹ (T)	43%	60%
F4/I/2	c.[3379+1g>a]+c.[=]	38%	kDv	33%	75%

Tab.:IV.4.3: Familie 4 Mutationen und klinische Daten.

Fam: Familie, kDv: keine Daten vorhanden, (P): Plasma, (T): Thrombozyten, VWF:FVIII: VWF:FVIII-Aktivität, VWF:CB: VWF:Kollagenbindungsaktivität, WT: Wildtyp, VWF:Ag im Plasma N: 50-160%, VWF:Ag in Thrombozyten N: 10-50 U/10¹¹Thrombozyten, VWF:CB: N: 0,8-2,0xVWF:Ag%, VWF:FVIII N: 60-150%

Familie Nr. 22

Diese Deletionen der Indexpatientin F22/II/1 c.374_387del14 und c.2269_2270delCT sind bereits im Kapitel IV.2.1 bezüglich ihrer Kausalität besprochen worden (s.Abb.III.2.22.4 Stammbaum).

Ihre VWF:Ag-Konzentration ist jeweils im unteren Normbereich angesiedelt bzw. grenzwertig erniedrigt (s.Tab.IV.4.4). Die Multimeranalyse zeigt ein normales Muster mit leicht verminderter Anfärbung der Multimere im Vergleich zum normalen Plasmapool (Befunde Prof. Dr. Budde).

Somit sind die Eltern ebenfalls als asymptotische heterozygote Anlageträger eines VWS Typ 3 zu klassifizieren.

Fam.	Sequenzvarianten	VWF:Ag (P)	VWF:Ag (T)	VWF:CB	VWF: FVIII
F22/II/1	c.[374_387del14]+ c.[2269_2270delCT]	<1%	nn	<1,5%	kDv
F22/I/1	c.[2269_2270delCT]+c.[=]	57%	kDv	kDv	70%
F22/II/2	c.[374_387del14]+ c.[=]	48/56%	11,5 U/10 ¹¹ T	53%	88%
F22/II/2	c.[=]+ c.[=]	116%	kDv	kDv	82%

Tab.:IV.4.4.: Familie 22: Mutation und klinische Daten.

Fam: Familie, kDv: keine Daten vorhanden, nn: nicht nachweisbar, (P): Plasma, (T): Thrombozyten, VWF:Ag (P): N: 50-160%, VWF:Ag (T): N: 10-50 U/10¹¹Thrombozyten, VWF:CB: VWF:Kollagenbindungsaktivität N: 0,8-2,0xVWF:Ag%, VWF:FVIII-Aktivität N: 60-150%, WT: Wildtyp

Abschließend kann festgestellt werden, dass Missensemutationen zu derart schwergradigen funktionellen VWF-Defekten führen können, die sich quantitativ äußern, wenn sie v.a. auf zwei Allelen ko-vererbt werden (*Rodeghiero et al. 2001*). Somit werden gewisse Missensemutationen hinsichtlich des VWS Typ 3 und ihrer klinischen Auswirkungen vergleichbar mit Mutationen, die zu Nullallelen führen, die in nicht messbare VWF:Ag-Konzentrationen münden. Das Resultat dieser zwei Mutationsformen kann ähnlich sein, während die Ebene, auf der der Defekt eingreift unterschiedlich ist. Somit können die vorgestellten Missensemutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit als kausal für das VWS Typ 3 der Indexpatienten angesehen werden.

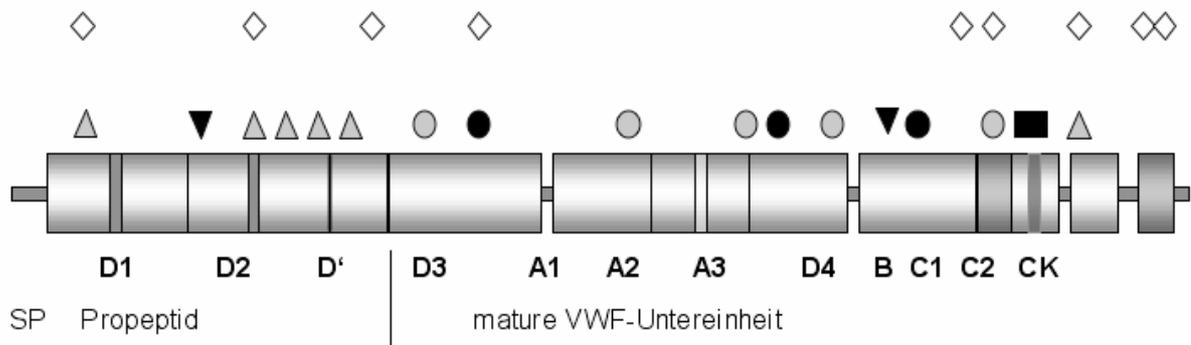
IV.5 Schlußfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte bezüglich des VWS Typ 3 ein sehr heterogenes Mutationsspektrum nachgewiesen werden. Es wurden keine Mutationscluster in einer bestimmten Region beobachtet (s.Abb.IV.5.1). Die einzige Mutation, die gehäuft auftritt ist die Deletion c.2435delC in Exon 18. Sie kommt mit einer Allelfrequenz von 19,6 % vor und ist wahrscheinlich auf einen Foundereffekt zurückzuführen. Denn diese Deletion wurde auf der Hälfte der Chromosomen schwedischer Patienten, auf 20 % der Chromosomen deutscher Patienten und auf 75% der Chromosomen polnischer Patienten lokalisiert; gleichzeitig wurde sie nicht bei anderen untersuchten Patienten (z.B. Niederlande, Türkei) festgestellt. Haplotypanalysen zeigten, dass es sich um eine „alte“ slawische Mutation handelt, die in unterschiedlichen Ostsee-Anrainerstaaten vorkommt (s.Abb.IV.5.2) und wahrscheinlich gemeinsamen genetischen Ursprungs ist (*Schneppenheim et al. 2004a*).

In der Mehrzahl liegen Mutationen vor, die zu Nullallelen führen, wie auch bestätigend durch Baronciani et al. 2000 festgestellt wurde.

Trotz des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwandes ist die molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit einem schweren VWS Typ 3 indiziert.

Neben der Bestätigung der Diagnose ist nur durch die Gendiagnostik die Identifizierung asymptomatischer Träger von VWS Typ 3-Mutationen und damit eine fundierte genetische Beratung möglich.



- Nonsensemutation
- ◇ Missensemutation
- △ Deletion
- ▼ Insertion
- Splice-Site-Mutation
- Duplikation

Abb.IV.5.1: VWS Typ 3 Mutationsspektrum (Ergebnisse der Studie) SP: Signalpeptid, D1-CK: Bezeichnung der einzelnen Domänen des VWF

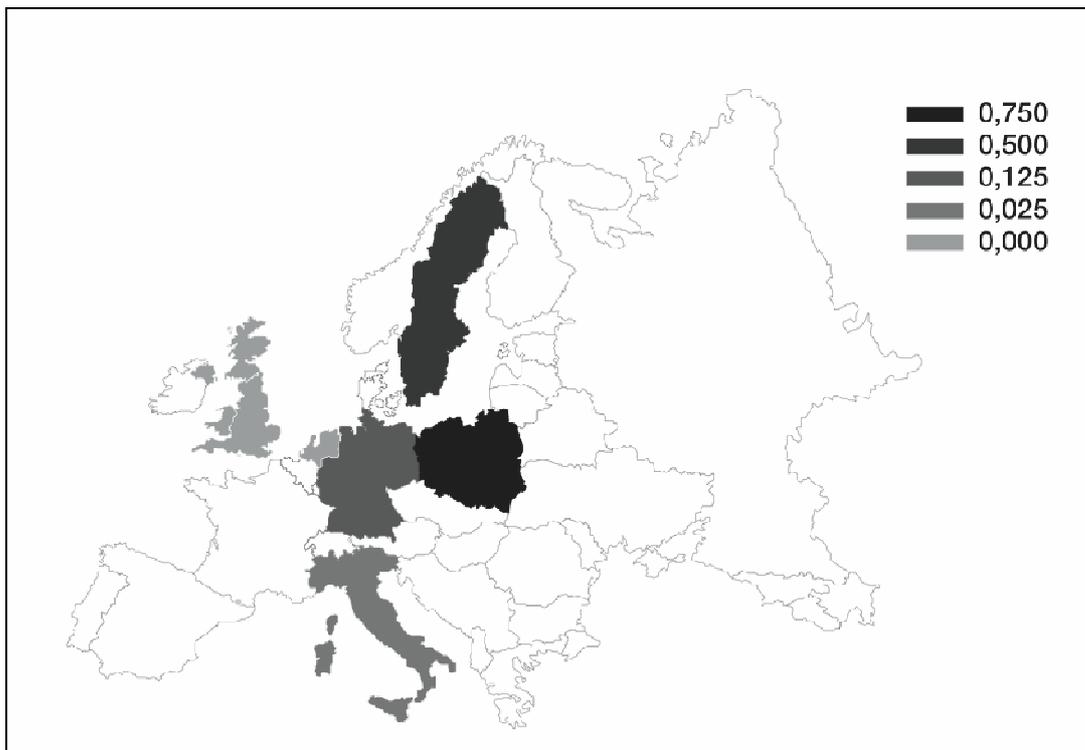


Abb.IV.5.2: Geographische Verteilung der so genannten baltischen Mutation c2435delC mit Angabe der prozentualen Häufigkeit der Mutation auf den Chromosomen von Typ-3-Patienten. (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Schneppenheim)

Bei genetisch nicht gesichertem VWS Typ 3 empfiehlt sich folgendes Vorgehen: Untersuchung des Exons 18. Bei negativem oder lediglich heterozygotem Ergebnis würde u. U. die Komplettssequenzierung des Genes durchgeführt werden müssen. Diagnosestellung bei Vorliegen einer compound Heterozygotie oder einer Homozygotie möglich. Bei Verdacht auf das Vorliegen größerer Deletionen kann eine Genodosisanalyse angeschlossen werden (s.Abb.IV.5.3).

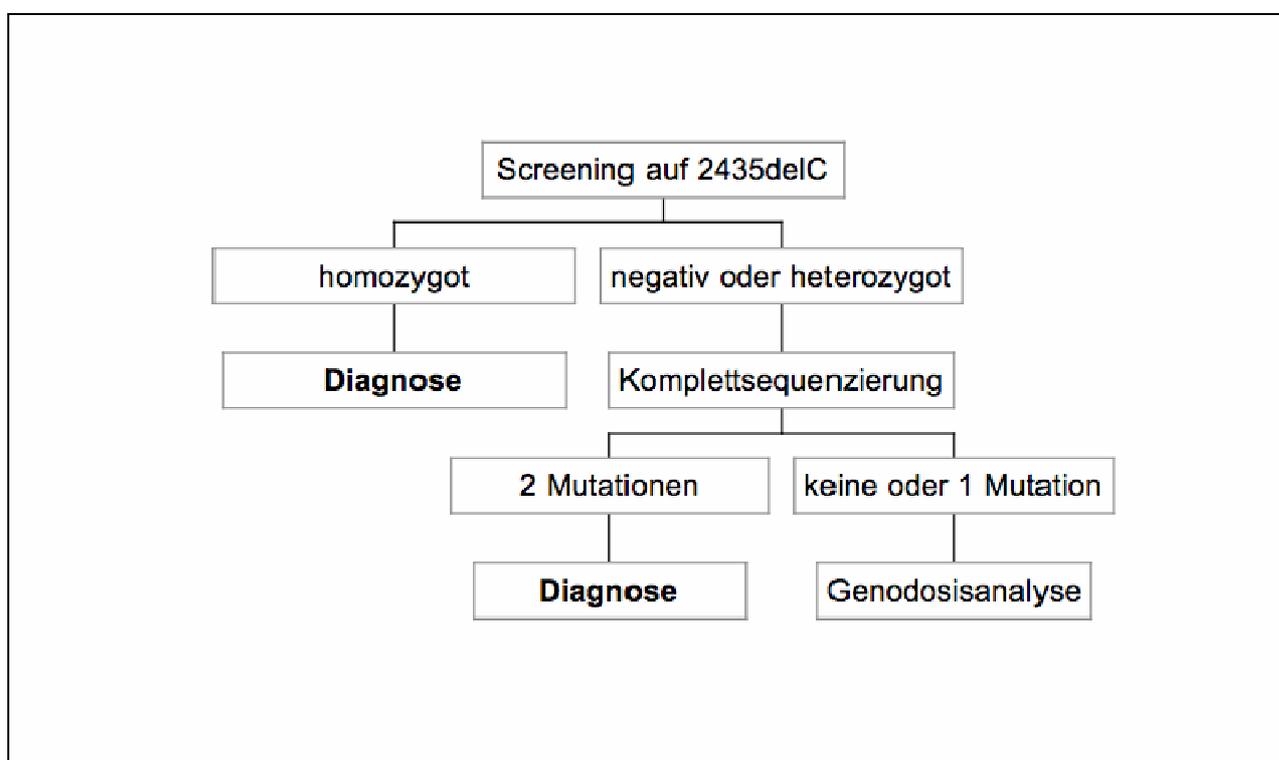


Abb.IV.5.3: VWS Typ 3 Mutations-Screening-Strategie

V. Zusammenfassung

Das VWS Typ 3 wird autosomal-rezessiv vererbt und ist die schwerste und seltenste Form des VWS. Charakteristisch ist seine phänotypische Homogenität im Gegensatz zu seiner genotypischen Heterogenität.

Die vorliegende Arbeit wurde im Hinblick auf folgende Fragen durchgeführt:

1) Lokalisierung typischer VWS Typ 3 Mutationen? 2) Spektrum der VWS Typ 3 Mutationen in Deutschland? 3) Häufung spezifischer VWS Typ 3 Mutationen?

Abschließend erfolgte, basierend auf den Ergebnissen, die Ableitung einer Screeningstrategie. Von 23 Indexpatienten wurde das VWF-Gen molekularbiologisch via PCR, Sequenzierung und z.T. Klonierung untersucht. Die identifizierten Mutationen wurden mit einer zweiten unabhängigen Methode bestätigt. Missensemutationen wurden durch rekombinante in-vitro-Expressionsstudien analysiert (**nicht** Bestandteil dieser Arbeit), um funktionelle Defekte aufzudecken. Von 23 Indexpatienten konnten 17 komplett aufgeklärt werden, durch Nachweis homozygoter Mutationen oder compound Heterozygotie. Bei fünf Patienten konnte jeweils nur eine Sequenzvariante bzw. bei einer Patientin keine Sequenzvariante lokalisiert werden; eine Gendosisanalyse und/oder eine Re-Evaluation der Diagnose müsste durchgeführt werden. Von 26 unterschiedlichen Mutationen, führen 17 direkt zu einem Nullallel und neun vermutlich zu posttranslationalen Biosynthesestörungen. Die Mutationen verteilen sich über das gesamte VWF-Gen. Eine Häufung spezifischer VWS Typ 3 Mutationen in einem bestimmten Abschnitt des VWF-Genes konnte bis auf eine Ausnahme nicht erkannt werden. Die Mutation c.2435delC kommt mit einer Allelfrequenz von 19,6% vor. Haplotypenanalysen haben gezeigt, dass diese Mutation wahrscheinlich auf einen gemeinsamen genetischen Ursprung, aus den Ostsee-Anrainerstaaten, zurückzuführen ist. Auf Basis der Ergebnisse, wäre es empfehlenswert, erst auf c.2435delC zu screenen. Bei negativem Befund bzw. Heterozygotie wäre eine Komplettssequenzierung unumgänglich. Ohne Nachweis einer compound Heterozygotie würde sich eine Gendosismessung anschließen. Die molekulargenetische Untersuchung des schweren VWS Typ 3 ist indiziert, auf deren Basis eine Identifikation asymptomatischer Träger und anschließend eine genetische Beratung ermöglicht werden.

VI. Literaturverzeichnis

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

Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannucci PM. (2003) Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. Blood Cells Mol Dis 30(3):264-70

Bernard P, Couturier M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J Mol Biol 226(3):735-745

Bernard P, Kezdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M. (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. J Mol Biol 234(3):534-541

Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M. (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. Gene 148(1):71-74

Bird AP. (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. Nucleic Acids Res 8(7):1499-504

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. Am J Hum Genet. 48(1):137-144

Budde U, Schneppenheim R. (2001) Von Willebrand factor and von Willebrand disease. Rev Clin Exp Hematol 5(4):335-68

Cacheris PM, Nichols WC, Ginsburg D. (1991) Molecular characterization of a unique von Willebrand disease variant. A novel mutation affecting von Willebrand factor/factor VIII interaction. J Biol Chem 266(21):13499-502

Casaña P, Martinez F, Haya S, Lorenzo JI, Espinos C, Aznar JA. (2000) Q1311X: a novel nonsense mutation of putative ancient origin in the von Willebrand factor gene. *Br J Haematol* 111(2):552-555

Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. (2003) Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* 88(1):94-108

Cooper DN, Krawczak M. (1990) The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet* 85(1):55-74

Cooper DN, Krawczak M. (1991) Mechanisms of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease. *Hum Genet* 87(4):409-15

Cornu, P, Larrieu MJ, Caen J, Bernard J. (1963) Transfusion studies in von Willebrand's disease: effect on bleeding time and factor VIII. *Brit J Haematol* 9:189

Denis CV. (2002) Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol* 75(1):3-8

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

de Wit TR, van Mourik JA. (2001) Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):241-255

Eikenboom JC, Ploos van Amstel HK, Reitsma PH, Briet E. (1992) Mutations in severe type III von Willebrand's disease in the Dutch population: candidate missense and nonsense mutations associated with reduced levels of von Willebrand factor messenger RNA. *Thromb Haemost* 68(4):448-54

Eikenboom JC, Castaman G, Vos HL, Bertina RM, Rodeghiero F. (1998) Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. *Thromb Haemost* 79(4):709-17

Eikenboom JC. (2001) Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):365-379

Favaloro EJ. (2001) Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):299-319

Gadisseur A, Berneman Z, Schroyens W, Michiels JJ. (2009) Laboratory Diagnosis of von Willebrand Disease Type 1/2E(2A Subtype IIE), Type 1 Vicenza and Mild Type 1 Caused by Mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 Domains of the von Willebrand Factor Gene. *Acta Haematol* 121:128-138

Gaucher C, Mercier B, Jorieux S, Oufkir D, Mazurier C. (1991) Identification of two point mutations in the von Willebrand factor gene of three families with the „Normandy“ variant of von Willebrand disease. *Br J Haematol* 78(4):506-14

Ginsberg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GAP, Latt SA, Orkin SH. (1985) Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localisation. *Science* 228:1401-1406

Goodeve A, Peake I. (2001) A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):235-240

Hilbert L, Messenger SL, Ribba AS, Mazurier C, Schneppenheim R, Goodeve AC, Castaman G, Federici AB, Battle J, Eikenboom JJ, Ingerslev J, Habart D, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. (2003) In vitro expression of 4 novel mutations identified in type 1 von Willebrand disease patients. *Thromb Haemost* 1 Supplement: OC349

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. (1974) Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1906-9

Katsumi A, Tuley EA, Bodo I, Sadler JE. (2000) Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 275(33):25585-94

Krawczak M, Cooper DN. (1991) Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 86(5):425-41

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90(1-2):41-54

Kroner PA, Friedman KD, Fahs SA, Scott JP, Montgomery RR. (1991) Abnormal binding of factor VIII is linked with the substitution of glutamine for arginine 91 in von Willebrand factor in a variant form of von Willebrand disease. *J Biol Chem* 266(29):19146-9

Larrieu MJ, Soulier JP. (1953) Déficit en facteur anti-hémophilique chez une fille associé à un trouble de saignement. *Rev Hematol* 8:361-70

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (1994) RNA-Stoffwechsel. In: Tschesche H (Hrsg) *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford (2.Aufl., S.973-1013)

Lenk H, Nilsson IM, Holmberg L, Weissbach G. (1988) Frequency of different types of von Willebrand's disease in the GDR. *Acta Med Scand* 224(3):275-80

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. (1989) Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 264(33):19514-19527

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

Mayadas TN, Wagner DD. (1992) Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(8):3531-3535

Mazurier C. (1992) von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb Haemost* 67(4):391-6

Mazurier C, Ribba AS, Gaucher C, Meyer D. (1998) Molecular genetics of von Willebrand disease. *Ann Genet* 41(1):34-43

Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. (2001) Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):337-347

Mertes G, Ludwig M, Schwaab R, Brackmann HH, Olek K. (1993) Delta C in exon 18 of the von Willebrand gene is uncommon in German vWD type III patients. *Thromb Haemost* 70(6):1064-1065

Mertes G, Ludwig M, Finkelnburg B, Krawczak M, Schwaab R, Brackmann HH, Olek K. (1994) A G+3-to-T donor splice site mutation leads to skipping of exon 50 in von Willebrand factor mRNA. *Genomics* 24(1):190-191

Meyer D, Fressinaud E, Hilbert L, Ribba AS, Lavergne JM, Mazurier C. (2001) Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):349-364

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215

Nachman R, Levine R, Jaffe EA. (1977) Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes *J Clin Invest* 60:914-21

Nagamine CM, Chan K, Lau YF. (1989) A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet* 45(2):337-9

Nesbitt IM, Hampton KK, Preston FE, Peake IR, Goodeve AC. (1999) A common splice site mutation is shared by two families with different type 2N von Willebrand disease mutations. *Thromb Haemost* 82(3):1061-1064

Ngo KY, Glotz VT, Koziol JA, Lynch DC, Gitschier J, Ranieri P, Ciavarella N, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. (1988) Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(8):2753-2757.

Nilsson IM, Blombäck M, von Francken I. (1957) On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. *Acta med Scand* 159:35-7

Nilsson IM, Blombäck M, Jorpes E, Blombäck B, Johansson SA. (1957) V. Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction 1-0. *Acta Medica Scandinavica* 159:179-188

Peerlinck K, Eikenboom JC, Ploos Van Amstel HK, Sangtawesin W, Arnout J, Reitsma PH, Vermeylen J, Briët E. (1992) A patient with von Willebrand's disease characterized by a compound heterozygosity for a substitution of Arg854 by Gln in the putative factor-VIII-binding domain of von Willebrand factor (vWF) on one allele and very low levels of mRNA from the second vWF allele. *Br J Haematol* 80(3):358-63

Quick AJ, Hussey CV. (1953) Haemophilic condition in the female. *J Lab Clin Med* 42:929-30

Reese MG, Eeckman FH. (1996). "Splice Sites: A detailed neural network study", *Proceedings of the 1996 Genome Mapping & Sequencing Meeting*, Cold Spring Harbour, New York, arranged by D. Bentley, E. Green and P. Hieter. [Poster]

Rodeghiero F, Castaman G. (2001) Congenital von Willebrand disease type I: definition, phenotypes, clinical and laboratory assessment. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):321-335

Ruggeri ZM, Ware J. (1992) The structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 67(6):594-599

Ruggeri ZM, Ware J. (1993) von Willebrand factor. *FASEB J* 7(2):308-316

Ruggeri ZM. (2001) Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):257-279

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

Sadler JE. (1994) A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 71(4):520-5

Sadler JE. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67:395-424

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354

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

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. (1994) Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Hum Genet* 94(6):640-652

Schneppenheim R, Budde U, Krey S, Drewke E, Bergmann F, Lechler E, Oldenburg J, Schwaab R. (1996) Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost* 76(4):598-602

Schneppenheim R, Gazda H, Budde U, Drewke E, Federici A, Krey S, Riesen G. (1999) A Single Base Deletion (Δ C in Exon 18 of the VWF Gene) is the Most Common Molecular Defect in von Willebrand Disease Type 3 in Countries Surrounding the Baltic Sea. In: Herrmann FH (Hrsg) *Molekulare (DNA) Diagnostik Hereditärer Hämostasedefekte*. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb (S.91-96)

Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Mainusch K, Ruggeri ZM, Schneppenheim S, Schwaab R, Oldenburg J. (2001a) Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood* 97(7):2059-2066

Schneppenheim R, Budde U, Ruggeri ZM. (2001b) A molecular approach to the classification of von Willebrand disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2):281-298

Schneppenheim R. (2004a) Molekulare Genetik des von-Willebrand-Syndroms. *Hamostaseologie* 24(1):37-43

Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE. (1987) Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest* 79(5):1459-1465

Stryer L. (1996) Die Erforschung der Gene. In: Lubert Stryer (Hrsg) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (4. Aufl., S.123 - 150)

Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K. (1986) Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25:3171-3184

Tjernberg P, Vos HL, Castaman G, Bertina RM, Eikenboom JC. (2004) Dimerization and multimerization defects of von Willebrand factor due to mutated cysteine residues. *J Thromb Haemost* 2(2):257-265

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

Von Willebrand E.A. (1926) Hereditär Pseudothrombophilie. Finska. Läk.-Sällsk. Handl. 68:87-112

Wagner DD, Saffaripour S, Bonfanti R, Sadler JE, Cramer EM, Chapman B, Mayadas TN. (1991) Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide. *Cell* 64(2):403-413

Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T. (1989) Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J Clin Invest* 83:288-297

Zhang ZP, Falk G, Blomback M, Egberg N, Anvret M. (1992a) A single cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene is the most common mutation in Swedish vWD type III patients. *Hum Mol Genet* 1(9):767-768

Zhang ZP, Lindstedt M, Falk G, Blomback M, Egberg N, Anvret M. (1992b) Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. *Am J Hum Genet* 51(4):850-858

Zhang ZP, Blomback M, Egberg N, Falk G, Anvret M. (1994) 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(1):188-193

Zhang ZP, Blomback M, Anvret M. (1997) Understanding von Willebrand's disease from gene defects to the patients. *J Intern Med Suppl* 740:115-119

Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. (1971) 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 acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor). *J Clin Invest* 50:244-254

Zucker MB, Brockman MJ, Kaplan KL. (1979) FVIII-related antigen in human blood platelets. Localization and release by thrombin and collagen. J Lab Clin Med 94:675-682

VII. Anhang

VII.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.III.1.	Prozentuale Verteilung der VWS Typ3 Sequenzvarianten
Abb.III.2.1.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.Q1311X
Abb.III.2.2.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Deletion c.1596_1597delCG
Abb.III.2.2.2	Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.1596_1597delCG
Abb.III.2.3.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.L129R
Abb.III.2.3.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.L129R
Abb.III.2.3.3	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.G525E
Abb.III.2.3.4	DHPLC des VWF-Gens bei der Missensemutation p.G525E
Abb.III.2.3.5	Stammbaum der Familie 3
Abb.III.2.4.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.R854Q
Abb.III.2.4.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.R854Q
Abb.III.2.4.3	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.3379+1g>a
Abb.III.2.4.4	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2533R
Abb.III.2.4.5	DHPLC des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2533R
Abb.III.2.4.6	Stammbaum der Familie 4
Abb.III.2.5.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Duplikation c.7357_7373dup17
Abb.III.2.5.2	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Duplikation c.7357_7373dup17 Wildtyp
Abb.III.2.5.3	Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Duplikation c.7357_7373dup17
Abb.III.2.6.1	Sequenzierung und Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Insertion c.1239_1240insG
Abb.III.2.6.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Insertion c.1239_1240insG
Abb.III.2.6.3	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.Q1652X
Abb.III.2.7.1	Sequenzierung und Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Deletion c.2435delC
Abb.III.2.7.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Deletion c.2435delC
Abb.III.2.7.3	Sequenzierung und DHPLC des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.5053+3a>g
Abb.III.2.7.4	DHPLC des VWF-Gens bei der Sequenzvariante c.5053+3a>g
Abb.III.2.8.1	Sequenzierung und Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Insertion c.6256+2_6256+3inst
Abb.III.2.8.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Insertion c.6256+2_6256+2inst
Abb.III.2.10.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.Y2392X
Abb.III.2.11.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Deletion c.1795delG
Abb.III.2.11.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Deletion c.1795delG
Abb.III.2.11.3	Sequenzierung und Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.W1120S

Abb.III.2.11.4	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.W1120S
Abb.III.2.12.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2739R
Abb.III.2.12.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2739R
Abb.III.2.15.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.S918X
Abb.III.2.16.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Deletion c.7650_7651delCC
Abb.III.2.16.2	Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.7650_7651delCC
Abb.III.2.18.1	Sequenzierung und Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Insertion c.6222_6223insAACC
Abb.III.2.18.2	Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Mutation c.6222_6223insAACC
Abb.III.2.18.3	Sequenzierung und Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2304Y
Abb.III.2.18.4	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2304Y
Abb.III.2.19.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Nonsensemutation p.R1853X
Abb.III.2.22.1	Sequenzierung und Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.374_387del14
Abb.III.2.22.2	Sequenzierung und Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.2269_2270delCT
Abb.III.2.22.3	Heteroduplexanalyse des VWF-Gens bei der Deletion c.2269_2270delCT
Abb.III.2.22.4	Stammbaum der Familie 22
Abb.III.2.23.1	Sequenzierung des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2754W
Abb.III.2.23.2	Restriktionsenzymverdau des VWF-Gens bei der Missensemutation p.C2754W
Abb.IV.5.1	VWS Typ 3 Mutationsspektrum
Abb.IV.5.2	Geographische Verteilung der so genannten baltischen Mutation 2435delC mit Angabe der prozentualen Häufigkeit der Mutation auf den Chromosomen von Typ-3-Patienten.
Abb.IV.5.3	VWS Typ 3 Mutations-Screening-Strategie

VII.2 Abkürzungsverzeichnis

aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
cDNA	kodierende DANN
CK-Domäne	cystine knot Domäne
DHPLC	denaturing high performance liquid chromatography
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDV	elektronische Datenverarbeitung
Gp	Glykoprotein
IU/dl	international units/deziliter
kb	Kilobasen
kD	KiloDalton
LB-Agarplatten	Luria broth-Agarplatten
mRNA	Mitochondriale Ribonucleinsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
REV	Restriktionsenzymverdau
RT PCR	Real time PCR
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA- Puffer

vv	vice versa
VWF	Von Willebrand Faktor
VWF:Ag	Von Willebrand Faktor: Antigen
VWS	Von Willebrand Syndrom
WT	Wildtyp

VII.3 Material- und Geräteliste

	Typ	Hersteller	Ort
1) DNA-Extraktion	Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega	Madison, USA
2) dNTP's		Peqlab	Erlangen
Thermo Fast 96 PCR Plates	0,2ml Tube Plate	Peqlab	Erlangen
Deckel	8er Domed Cap Strips	Peqlab	Erlangen
DNA-Synthetase	Taq DNA Polymerase	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Synthetase	Advantage GC2-Polymerase		
Destilliertes Wasser	Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen
Thermocycler	T-Gradient	Biometra	Göttingen
Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra	Göttingen
Thermocycler	T1-Thermocycler	Biometra	Göttingen
3) Trägerfolie	Gelbond PAG	FMC	Rockland, ME, USA
Spacer	0,4mm	Gibco-BRL	Eggenstein
Glasplatten	26x12x0,5cm	Hampe	Kiel
Äthanol	80%	Apotheke UKE	Hamburg
Stromquelle	Desatronic 3000/200	Desaga	Heidelberg
Kühlgerät	Multitemp 3	Pharmacia Biotech	Freiburg
Elektrophoresekammer	Multiphor 2	Pharmacia Biotech	Freiburg
BPL	Gene Ruler 100bp DNA ladder	MBI Fermentas	Litauen
Filterstreifen	Gel Blotting Papier, GB 002	Schleicher-Schuell	Dassel
Schüttler	Mini-Shaker	Adolf Kühner AG	Basel, CH
4) Trägerplatte			
Kämme			
Elektrophoresekammer	Gel Electrophoresis Apparatus GNA200	Pharmacia Fine Chemicals	Schweden
Aufreinigungssäulen	Ultrafree-DA	Millipore	
Aufreinigungssäulen	GenElute Agarose Spin Column	Sigma	St Louis, Missouri, USA
Aufreinigungskit	E.Z.N.A. cycle pure kit	Peqlab	Erlangen
Milchglasreinigung	QIAEX2 Gel Extraction Kit	Qiagen	
Stromquelle	Powerpack P25	Biometra	Göttingen
UV-Lichttisch	Transilluminator TR 302 302 nm UV	Spectroline	
Zentrifuge	EBA 12R	Hettich-Zentrifugen	Tuttlingen
5) Cycler	Trio Thermoblock	Biometra	Göttingen
SEQ Kit	ABI Prism Big Dye Terminator Cycle	Applied Biosystems	Foster City, USA

	Typ	Hersteller	Ort
	Sequencing Ready Reaction Kits Original Vers. with AmpliTaq-Polymerase		
SEQ-Puffer	5xSequencing Buffer	Applied Biosystems	Foster City, USA
SEQ-Tubes	Softtubes 0,5ml	Biozym, Hess. Oldendorf	NA
Aufreinigung der SEQ-Rkt	DyeEx 96 Kit	Qiagen	
Sequencer	ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Foster City, USA
6) Cloning Kit	TOPO TA Cloning Kit Version J	Invitrogen	Karlsruhe
Brutschrank		Heraeus Instruments	
Wasserbad		Wilke med technik	Hamburg
LB-Agar		Invitrogen	Karlsruhe
Schüttler			
7) Geldokumentationssystem			
Kamerarechner	The Imager	Appligene	
Fotokammer	Universal UV/WL Cabinet	Appligene oncor	

VII.4 Rezepte

1. PCR

10x Cetus Puffer

Tris	1M	100mM	Sigma
MgCl ₂	100mM	15mM	Merck
Kcl	1M	500mM	Merck
Gelatine	2%	0,01% (v/v)	BioRad
pH 8,3	mit 1n Hcl	Ad 100ml	Merck
Sterilfiltration durch 0,2 µm			Millipore

PCR-Ansatz auf 50 µl

Cetus	10x	s.o.
MgCl ₂	1mM	Invitrogen
dNTP's	0,2mM	Peqlab
Primer-Sense	2 ng/µl	
Primer-Antisense	2 ng/µl	
TAQ-Polymerase	1 unit	Invitrogen
DNA-Probe	10ng-400ng/µl	
Aqua dest.	ad 40ml	Braun

2. Polyacrylamidgelelektrophorese

APS 10x

Ammoniumpersulfat	0,44M	Sigma
-------------------	-------	-------

Polyacrylamidgel

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lsg 30%	6,00% (v/v)	Roth
Glycerin	7,00% (v/v)	Sigma
Tris/Sulfat-Puffer 1M pH 9,0	0,033mM	Sigma
APS	2,00%(v/v)	Sigma
TEMED	0,05% (v/v)	Merck

Tris-Borat pH 9

Tris	0,14 M	Merck
Borat	0,07M	Merck

3.Silberfärbung

Ethanol (vergällter Alkohol)	10% (v/v)	Merck
HNO ₃ 65%	1% (v/v)	Merck
AgNO ₃	10mM	Merck
Reduktionslösung Na ₂ CO ₃ wasserfrei Formaldehyd	280mM 0,02% (v/v)	Merck Merck
Essigsäure 100% p.a.	10% (v/v)	Merck

4.Agarosegelelektrophorese

Agarosegel

Agarose	1,2% (v/v)	Eurogentec
Ethidiumbromid	0,1µl/ml	
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	1x	Millipore

5.Restrictionsenzymverdau

ENZYM	PUFFER	INKUBATIONSTEMP.	HERSTELLER
TaqI	TaqI+BSA	65°C	Biolabs
AluI	NEB2	37°C	Biolabs
HpaII	Tango Y ⁺	37°C	MBI Fermentas
Eco72I	Tango Y ⁺	37°C	MBI Fermentas
NlaIII	NEB4+BSA	37°C	Biolabs
Tru 1 I	R ⁺	65°C	MBI Fermentas
Bst-NI	NEB2+BSA	60°C	Biolabs
DpnII	NEB4	37°C	Biolabs
HaeIII	NEB2	37°C	Biolabs
DdeI	NEB3	37°C	Biolabs
Bgl I	O+	37°C	MBI Fermentas

VII.5 PCR-und Sequenzierprogramm

Vervielfältigungsprogramm für die Exons 2-52 (außer Exon 15 und Exon 28)

1.	95°C	Pause	
2.	95°C	5 Minuten	
3.	95°C	40 Sekunden	
4.	Primerannealingtemperatur (52°C-68°C)	30 Sekunden	
5.	72°C	1 Minute	→ 3.-5. 40x
6.	72°C	5 Minuten	
7.	4°C	Pause	

Vervielfältigungsprogramm für Exon 15

1.	96°C	Pause	
2.	96°C	3 Minuten	
3.	96°C	30 Sekunden	
4.	60°C	30 Sekunden	
5.	68°C	3 Minuten	→ 3.-5. 40x
6.	68°C	5 Minuten	
7.	4°C	Pause	

Vervielfältigungsprogramm für Exon 28.I/28.II

1.	95°C	Pause	
2.	95°C	5 Minuten	
3.	95°C	40 Sekunden	
4.	65,4/55°C	30 Sekunden	
5.	72°C	1,20 Minuten	→ 3.-5. 50x
6.	72°C	5 Minuten	
7.	4°C	Pause	

Sequenzierprogramm

1.	95°C	Pause	
2.	95°C	5 Minuten	
3.	95°C	30 Sekunden	
4.	Primerannealingtemperatur (52-63°C)	30 Sekunden	
5.	60°C	4 Minuten	→ 3.-5. 45x
6.	4°C	Pause	

VII.6 Oligonukleotide

Ex	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')	AT (°C)	SEQ TA (°C)	bp	Nr.
2	gcagcaatgaccagctcag	Gaaaggtgtcactccagatggc	60,9	55	156	216/217
3	ctaatttctacgagccagagagg	Cagccctccctctgaagtcc	59	60	295	Ex3sn2/Ex3asn2
4+5	ctgctgagaaaaggttacg	Gcaaagagataaggttggc	53,4	52/52	~850	130/131
6	aacacacaaaaccaccagc	Gatccagaaatcacacacc	55,2	52	~250	214/215
7	cacactcaggagacactaacg	Tttgtagtactggctggctgg	59	60	~390	211/212
8	catggctggtgagatgatgc	tctgatctgtaaataaagtggg	55,2	52	~200	168/135
9	gaagaaaccaaccattgtccc	Agtccccaggcaggtctcc	62,8	63	~260	62/63
10	tttggggactgtgataactatc	ggaaggaggaagagaatgagcg	57,1	60	~170	138/139
11	gtccatgcagtttggggaagg	agcagccgggctggcaaagc	62,8	63	~270	209/806
12	tttctctgattaagaggtctctggg	ttgagaaggaggtgctaaggg	62,8	60	~290	807/210
13	ccaaatacatctgctgccacc	tcttctccaccacaaaagcc	66,5	60	300	158/159

Molekulargenetik des schweren von Willebrand Syndroms Typ 3

Ex	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')	AT (°C)	SEQ TA (°C)	bp	Nr.
14	ccagagtggcctggctctc	tggagacctcgagattctgcg	62,8	60		254/Ex14asn1
15	ctcctcccaccacatcccagg	caggaacaacgcagagaaagg	55	63	~350	160/161
16	tcctgtgctccaacattcccg	Gctctgtgttttagaggctcc	66,5	60		166/167
17	gtggaggcagcgagtatagacg	gtgaggaatctgggaggatgg	67,6	60	~200	174/175
18	aaaggacagtgtggaaggtagg	acaagaaaactgaagggcaggc	64,7	55	~260	136/137
19	agggcttagatcagtcactgtggcct	tggccgctgacacctcactccacc	68	63		42/43
20	tctgttctctcattgcctcc	accctcctagaaagaaacagc	62,8	60		182/183
21	aatcttctggctgtggtagagc	Catctctttaatggctgtgcg	57,1	60	~320	198/199
22	gtagagtggaggaggatctgg	agcaagtccttagagacctacg	66,5	60	~310	201/202
24	taacccaagtttgaccagctg	Actctgtgcataccacca	55,2	55		776/290
25	ccagactaagagccagagttc	Catctgagaacatgagggc	57,1	55		559/560
26	gtcctggaggcttgcctg	tgactctgatgaaagaaccac	53,4	55	305	561/562
27	tagttaaaaatgaggcttct	caataagattcatcactcaaac	55,2	52		563/564
28I	tcactggatgtggaatgtcc	aactcctgctcctgtgaagtc	65,4			24/50b
28I	tcactggatgtggaatgtcc			60		24
28I	aggcctgggtgctcctcc			60		544
28I	gccttgtggtggacatgatgg			60		162
28I	atcgaccgcctgaagcctc			60		583
28I		tccgatcctccaggacgaac		61		50
28II	atggttctggatgtggcgctc	gtatctggcagatgcatgtagc	55		653	132/133
28II	atggttctggatgtggcgctc			60		132
28II	caacctggctacatggtcacc		60			seq24
28II		tctgatctcatcagaggcagg		55		165
29	tgtgctcaccttctggttg	Tttgaaatcaagtagagcca	55,2	52	~200	150/151
30	aaaataatccgattttctc	Tagccctcactttccagga	52	60	305	234/235
31	accgtaagacaggggtgctg	accaggacagaggttggtat	59	55	344	148/149
32	cctttctgtctcttggta	cctgaacagaaactaaag	53,4	52		146/147
33	ccactcagcctcatgtccctat	Gcccaaacacatcttaac	59	55	262	565/566
34	ttctgtctcatgtacaggg	cagaaaagcaatttctcctcca	57,1	52	~280	567/568
35	catgggggttggataacgtcg	actaaaagcaactgccaccagg	60,9	60	354	207/208
36	attgtaggactacggatgagc	Aagagcctcagatgagagc	57,1	55	~310	205/275
37	caatgttttgtaccaggg	tggctccaggatttcagagg	57,1	52	~440	276/206
38	agctgtgccatttcaactctgg	agccaatgggaagtgaaggc	60,9	60	~295	203/204
39	tcgtacctagaatgtcctgtg	Agtgtttgagctgctctgcca	60,9	55	~210	124/125
40	agcaagaacatttcaaatcct	gtatccaatcggtccttacc	59	52	~250	122/123
41	gagtaaccttctgaactctgc	atcttgaagaggtccctgagg	62,8	52	~200	120/121
42	gcatagctgaatacttacgagc	Agttaatagccaagcagctc	59	52		295/296
43	gcggtctgtgtagtaggtgc	taccttctcaagatgccctcc	66,5	60	307	74/75
44	gtaagagcccctgtgctttgc	aaaccaaggtcaacgctggtcc	60,9	60		313/314
45	accaccttctgagagaagagc	agccaaaagtggaaagagagggc	64,7	55		Ex45sn2/65
46	gtttgccactctcactctgc	Ctgcttacaatgacttgc	57,1			277/278
47	tgagtgggggttgggggatgct	gtccagtcctatgccctggtcc	64,7	63		555/556
48	actggataagagagatgagagg	agatggtgatatgtgaggagc	59			114/115
49	acactgtctgactttacc	gagacagtaaagaggaaagc	53,4	52	~200	110/279
50	gagttcggagctaaaattggc	ttgctaattgggtgcaaggag	55,2			280/111
51	acctattccagcccagtgagg	caccagccctattgaagc	57,1	55	~220	108/281
52	Gactcccaccattgtgaagc	gtgcttcttctcagaaccgg				
	Einsatz interner Primer für Ex 28					

VII.7 Elektronische Hilfsmittel

Software

Programm	Typ	Hersteller	Ort
Dnasis	Ver.2.6 für Windows	Hitachi	Japan
Adobe Photoshop	Vers. 7.0 für Windows	Adobe	
PowerPoint		Microsoft	
Microsoft Word		Microsoft	
Microsoft Excel		Microsoft	

Websites:

<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html>, zuletzt gesichtet am 23.11.2009, 16:00 Uhr

<http://www.sheffield.ac.uk/vwf>, zuletzt gesichtet am 23.11.2009, 16:00 Uhr

http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/splice.pl, zuletzt gesichtet am 23.11.2009, 16:00 Uhr

www.google.de, zuletzt gesichtet am 23.11.2009, 16:00 Uhr

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, zuletzt gesichtet am 23.11.2009, 16:00 Uhr

VII.8 Patientendaten

Fam.	m/ w	Jahr- gang	VWF: Ag (%)	Multimere	Sonstiges
F1/II/1	w	kDv	0	kDv	RiCof: 20%
F2/II/1	w	1999	0	nn	RiCof: 0%
F3/II/1	w	1985	<1	nn	FVIII-Aktivität: 5%
F3/I/1	m	kDv	40	kDv	RiCof: 28%, FVIII-Aktivität: 75%
F3/I/2	w	1965	8	noB, außer verminderter Anfärbung;	VWF:CB: 12%
F3/II/2	m	kDv	66	kA	RiCof: >100%, FVIII-Aktivität: >100%
F4/II/1	m	2000	1,4	nn	VWF:CB: 1,3%
F4/I/1	m	kDv	31	noB außer verminderter Anfärbung;	VWF:CB: 43%
F4/I/2	w	kDv	33	noB außer verminderter Anfärbung;	VWF:CB: 33%
F5/II/1	w	1976	0	kA	FVIII- Aktivität: 1,8%
F6/II/1	w	1977	<1	nn	
F7/II/1	m	1984	2,8	Nachweis einiger Multimere mit abnormer Struktur;	FVIII-Bindungsfähigkeit des VWF: oB
F8/II/1	m	1997	<10		FVIII-Aktivität: 8%
F9/II/1	m	2000	<1	nn	
F10/II/1	w	1999	<1	nn	VWF:CB: <2%
F11/II/1	w	1993	<1	sehr kleines Signal in Protomerregion	VWF:CB: <2%
F12/II/1	w	1966	229,5		Substitutionseffekt der VWF:Ag-Konzentration
F13/II/1	w	kDv	kDv		
F14/II/1	w	kDv	<0,2	Multimere vorh. mit schwer geschädigter Struktur	
F15/II/1	w	1982	1,5	Sehr wenig VWF nachweisbar	VWF:CB: 2,2%
F16/II/1	w	1974	<1	nn	
F17/II/1	w	1997	<1	nn	
F18/II/1	w	1977	3	sehr wenig VWF nachweisbar	
F19/II/1	w	1938	3		RiCof: 6%
F20/II/1	w	kDv	36	große Multimere nicht vorh., Anfärbung vermindert, Struktur oB	VWF:Ag in Thromb.: < 0,5%; VWF:Ag-Konzentration fraglicher Substitutionseffekt;
F21/II/1	w	1948	<1	nn	
F22/II/1	w	1988	<1	nn	VWF:CB: 1,5%
F22/I/1	m	1960	57	noB außer verminderter Anfärbung;	
F22/I/2	w	1960	56	noB außer verminderter Anfärbung;	
F22/II/2	m	1985	116	oB	
F23/II/1	w	kDv	kDv	kDv	

Abkürzungslegende: kDv: keine Daten vorhanden, m: männlich, ni: nicht identifiziert, nn: nicht nachweisbar, noB: nachweisbar ohne Befund, oB: ohne Befund, w: weiblich, Referenzbereiche: VWF:Ag: 50-160%, VWF:CB: 0,8-2,0 x VWF:Ag%

VII.9 Danksagung

Diese Studie entstand im Zeitraum von August 2002 bis Dezember 2009 im Labor der Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. rer.nat. Schneppenheim zum einen für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung der Mittel, als auch für die Unterstützung, insbesondere auch in technischen Belangen, außerordentlich bedanken. Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Budde und seinen Mitarbeitern sehr herzlich für die Bereitstellung der Multimeranalysen sowie für die freundliche Hilfe bei der Literaturrecherche. Tobias Obser bin ich für die Durchführung der Expressionsstudien sehr dankbar, da die Diskussion der Ergebnisse dadurch sehr gut untermauert werden konnte. Außerdem bin ich Tobias Obser, Florian Oyen und Katharina Michael sowie stellvertretend allen Mitarbeitern des gesamten Labors zu tiefem Dank für sowohl die stets freundliche und geduldige Anleitung und Hilfestellung bezüglich aller Arbeiten im Labor verpflichtet.

VII. 10 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

VII.11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift:

Anja Harbeck-Seu