

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

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

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

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms Typ 2

Dissertation

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

vorgelegt von:

Olivier Marggraf
aus Hamburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.06.2010**

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

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. R. Schneppenheim

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. med. K. Sydow

Prüfungsausschuss, 3. Gutachtin: Prof. Dr. rer. nat. K. Kutsche

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Das von Willebrand-Syndrom.....	4
1.2 Zur Historie des von Willebrand-Syndroms	4
1.3 Der von Willebrand-Faktor	5
1.4 Biosynthese des von Willebrand-Faktors	6
1.5 Physiologie des von Willebrand-Faktors	9
1.6 Diagnostik des von Willebrand-Syndroms.....	10
1.7 Klassifikation des von Willebrand-Syndroms.....	11
1.8 Therapie des von Willebrand-Syndroms	15
1.9 Fragestellung	16
2 Patienten und Methoden	16
2.1 Patienten	16
2.2 Methoden	19
2.3 DNA-Aufreinigung	19
2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	20
2.5 Gelelektrophorese	21
2.6 Restriktionsenzymverdau	22
2.7 Sequenzierung	23
2.8 Klonierung.....	23
3 Ergebnisse	25
3.1 Patienten mit gefundenen Mutationen.....	26
3.2 Patienten ohne gefundene Mutationen.....	50
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
4 Diskussion.....	53
4.1 Allgemeine Diskussion	53
4.2 Diskussion der Mutationen	55
4.3 Abschließende Diskussion	70
4.4 Zusammenfassung.....	71
5 Abkürzungsverzeichnis	72
6 Literaturverzeichnis	74
7 Anhang.....	88

1 Einleitung

1.1 Das von Willebrand-Syndrom

Das nach seinem Erstbeschreiber benannte von Willebrand-Syndrom (VWS) ist mit einer Prävalenz von bis zu 1 % die häufigste Erkrankung des hämorrhagischen Formenkreises [1]. Klinisch relevant findet sich das VWS jedoch nur mit einer Prävalenz von 1:8000 [2], und lediglich 0.5 bis 3 Patienten in einer Population von 1.000.000 sind schwer betroffen.

Bei klinischer Manifestation imponiert eine Neigung zu Hämatomen und Schleimhautblutungen, wobei Epistaxis eines der häufigsten Symptome ist. Meist kommt es zu Blutungen nach operativen Eingriffen im Schleimhautbereich wie z.B. Tonsillektomie, Adenotomie und Zahnextraktion. Gelenkblutungen und Muskelblutungen, wie man sie bei der Hämophilie A findet, sind selten und treten fast ausschließlich beim schweren VWS Typ 3 auf. Bei Frauen kann es zu Menorrhagien und postpartalen Blutungen kommen, die unbehandelt zum Tode führen können. Die Symptome variieren dabei zum Teil sehr stark zwischen verschiedenen Individuen, aber auch unterschiedlichen Lebenslagen desselben Patienten.

1.2 Zur Historie des von Willebrand-Syndroms

Erik Adolf von Willebrand, ein finnischer Internist, beobachtete bei einer Familie von den Ålandinseln eine autosomal vererbare Bluterkrankheit mit verlängerter Blutungszeit bei normaler Blutgerinnungszeit [3]. Er nannte die Erkrankung „Hereditäre Pseudohämophilie“. Damit verwies er zugleich auf die beiden Krankheitsbildern gemeinsame Blutungsneigung sowie auf die im Unterschied zur Hämophilie autosomale Vererbung. Bereits 1876 berichtete der deutsche Frauenarzt Kehler über eine „Weibliche Hämophilie“, die retrospektiv als VWS angesehen werden muss [4]. Von Willebrand war jedoch der erste, der dieses Krankheitsbild von der Hämophilie abgrenzte. Im Jahr 1933 publizierte von Willebrand eine gemeinsame Arbeit mit dem Leipziger Hämatologen Jürgens, von der sich die in Deutschland lange übliche Bezeichnung „von Willebrand-Jürgens-Syndrom“ ableitete [5]. Das heutige VWS wurde in der Vergangenheit

Pseudohämophilie, konstitutionelle Thrombozytopathie und vaskuläre Hämophilie genannt. Diese unterschiedlichen Namen spiegeln nicht nur den jeweiligen Kenntnisstand der Namensgeber, sondern auch die ausgeprägte klinische Heterogenität wider.

Die heutige internationale Bezeichnung lautet „von Willebrand Disease“ (VWD).

1953 wurde eine Assoziation zwischen VWS und niedrigem FVIII entdeckt [6, 7]. Es wurde gezeigt, dass Transfusionen mit Normalplasma [8] und sogar mit Plasma von Hämophiliepatienten [9] bei Patienten mit VWS zu einem Anstieg von FVIII sowie einer verkürzten Blutungszeit führten, was 1968 auf einen vom FVIII abzugrenzenden, die Hämostase regulierenden Plasmafaktor zurückgeführt wurde [10]. Der bis zu diesem Zeitpunkt noch unidentifizierte Plasmafaktor wurde im Jahr 1971 immunologisch als Komplex mit FVIII erfasst und als „FVIII-assoziiertes Antigen“ (oder auch FVIII/VWF) bezeichnet [11]. Erst später wurde bekannt, dass FVIII und VWF die Produkte unterschiedlicher Gene sind [12]. Die Aufklärung der genetischen Sequenz des VWF durch vier Arbeitsgruppen im Jahr 1985 [13, 14, 15, 16] und der Aminosäuresequenz im Jahr 1986 [17] ermöglichte es, das VWS auf molekularbiologischer Ebene umfassend zu erforschen, und bildet das Fundament dieser Arbeit.

1.3 Der von Willebrand-Faktor

Der von Willebrand-Faktor ist ein an der primären und sekundären Hämostase beteiligtes adhäsives Glykoprotein.

Er mediiert die Thrombozytenadhäsion an verletztes Subendothel und ist an der Thrombozytenaggregation beteiligt. Beides erfolgt vor allem bei hohen Scherkräften, wie sie in Arterien und Arteriolen wirken [18]. Eine weitere wichtige Funktion des VWF ist der Schutz von FVIII, dessen Halbwertszeit sich hierdurch auf das ca. 5-Fache verlängert [19].

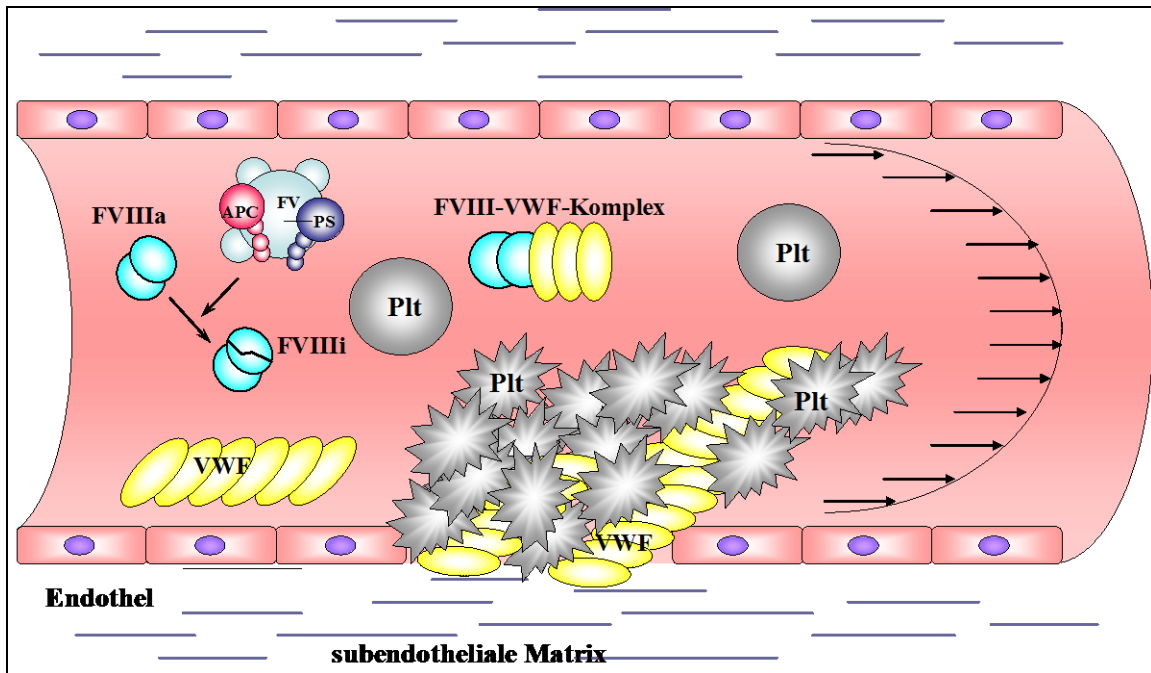


Abb. 1: Funktion des VWF in der primären und sekundären Hämostase des arteriellen Systems und der Mikrozirkulation.

Nach der Bindung hochmolekularer VWF-Multimere (gelb) an die Kollagene der subendothelialen Matrix [20] entfaltet der VWF seine strangförmige Struktur. Hierdurch werden multiple Bindungsstellen für Thrombozyten-GpIb exponiert, an welche Thrombozyten (Plt) reversibel binden, bevor anschließend die irreversible, GpIb/IIIa vermittelte Thrombozytenadhäsion stattfindet. Die Bindung der Plättchen untereinander (Aggregation) wird zu einem Teil ebenfalls über VWF mediiert. Die Bindung von FVIII (blau) und damit dessen Schutz vor Proteolyse, z.B. durch den aktivierten Protein C-Komplex (APC, FV, Protein S), ist von der Größe der VWF-Multimere unabhängig. Quelle: [21]

1.4 Biosynthese des von Willebrand-Faktors

Das aus 52 Exons und 51 Introns bestehende, 178 Kilobasen umfassende VWF-Gen befindet sich am distalen Ende des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p13.2) [22, 23] und kodiert für ein 2813 Aminosäuren großes Vorläuferprotein (Prä-Pro-VWF) mit einem Molekulargewicht von 360 Kilodalton [17]. Exon 1 ist untranslatiert. Die Exons 2 bis 17 kodieren das Signalpeptid und das Propeptid, die Exons 18 bis 52 den reifen VWF. Der Pro-VWF besteht zu über 90 % aus vier repetitiven Domänen: D1, D2, D', D3, A1-3, D4, B1-3, C1, C2, [24] die zum Teil in anderen Proteinen vorkommenden Bereichen ähneln und denen bestimmte Funktionen zugeordnet werden. Am carboxyterminalen Ende des

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

VWF (AS 2671 bis 2813) befindet sich die Cystin Knot like domain (CK-Domäne), die überdurchschnittlich viele Cysteine enthält.

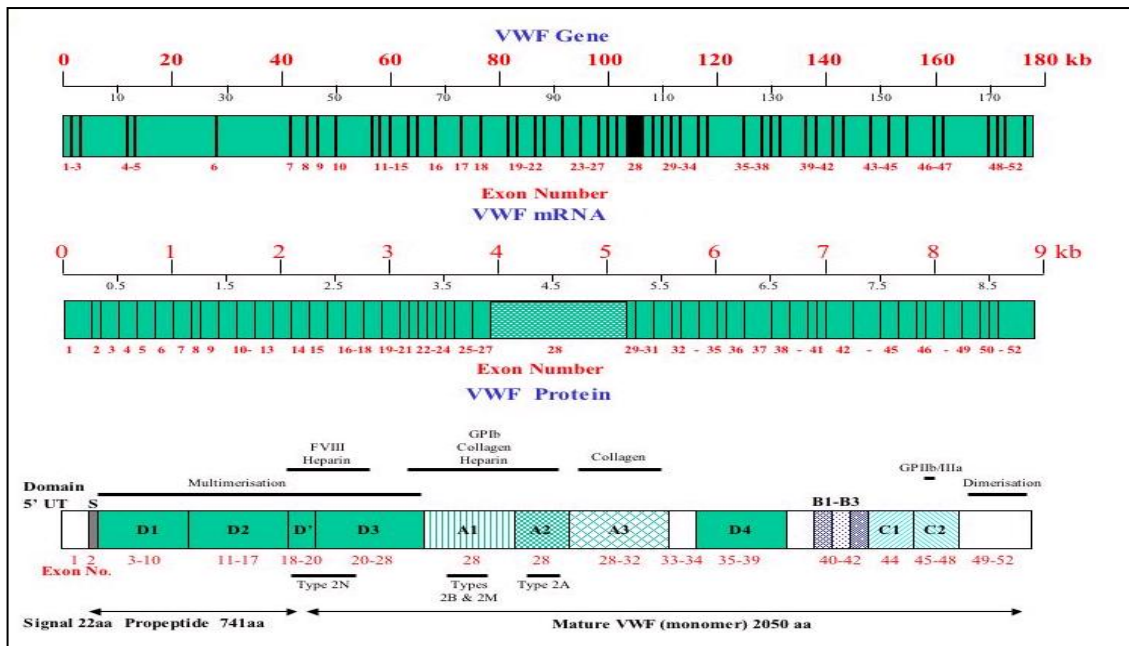


Abb. 2: Der VWF vom Gen zum Protein

Durch Transkription und Spleißen des ca 178 Kb umfassenden VWF Gens entsteht eine annähernd 8,5 Kb lange mRNA. Die Exons 2-17 kodieren für Signalsequenz und Propeptid, die Exons 18-52 für den reifen VWF. Die Funktionen der wichtigsten Domänen des VWF und die typischen Lokalisationen für Typ 2-Mutationen sind hier zusammen abgebildet. Quelle: ISTH-SSC VWF Online Database www.vwf.group.shef.ac.uk/ [Stand: 23.03.2010, 10:00 Uhr].

Der VWF wird sowohl in Endothelzellen [25], als auch in Megakaryozyten [26] synthetisiert und unterliegt mehreren posttranslationalen Veränderungen. Der Prä-Pro-VWF besteht aus einer Signalsequenz (22 Aminosäuren), einem aminoterminal gelegenen VWF-Propeptid (741 Aminosäuren) sowie dem reifen VWF (2050 Aminosäuren) und wird zwei proteolytischen Schritten unterzogen. Nach Abspaltung des Signalpeptides durch einen Signalpeptidase-Komplex erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum (ER), eine N-Glycosylierung des Pro-VWF und eine Dimerisierung durch Disulfidbrückenbildung über Cysteine der CK-Domäne. Diese Dimere werden im Golgi-Apparat weiter glykosyliert und sulfatiert [27]. Bis zu 50 von ihnen werden am aminoterminalen Ende, vor allem in der D3-Domäne, ebenfalls durch Disulfidbrücken zu ca. 500 bis > 20.000 KD schweren und bis zu 2 µm langen strangförmigen [28, 29] Multimeren polymerisiert.

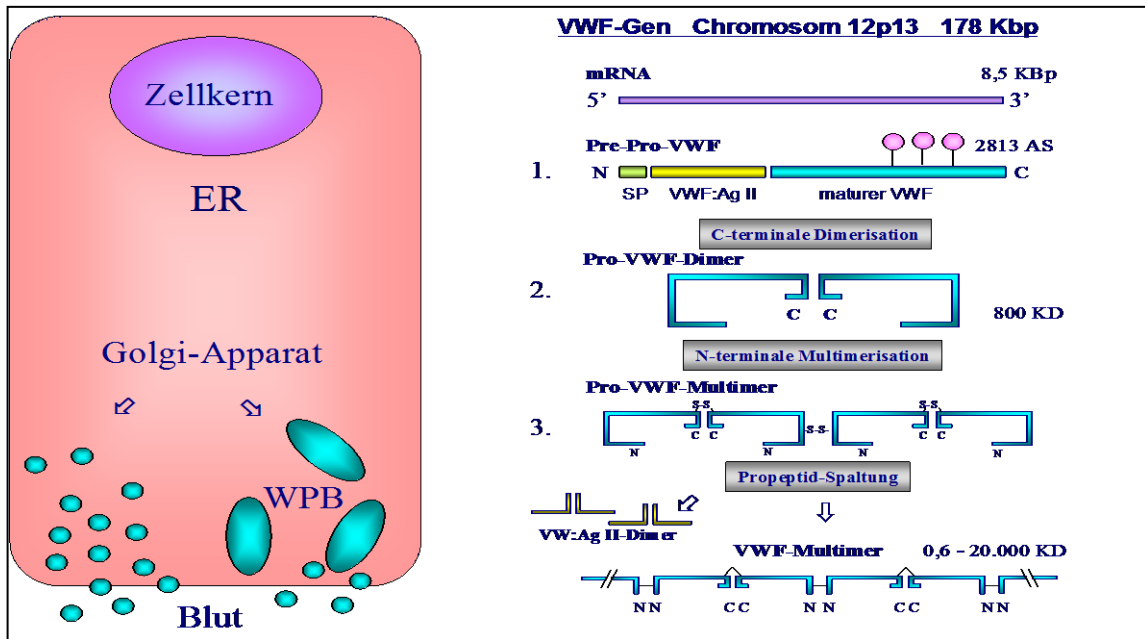


Abb. 3: Multimerisierung und Sekretion des VWF

Nach enzymatischer Abspaltung des Signalpeptids an der „Furin cleavage site“ wird der Pro-VWF mehrfach glykosyliert (1.) und im ER am Carboxyterminus dimerisiert (2.) [27]. Die Dimere polymerisieren im Golgi- und Post-Golgi-Aparat zu unterschiedlich großen Multimeren (3.) [27]. Schließlich wird das VWF-Propeptid (VW:Ag II-Dimer) abgespalten. Die Sekretion erfolgt entweder konstitutiv oder Mediator-abhängig aus Weibel Palade Bodies (WPB). Quelle: [21].

Pro-VWF besitzt eine „Furin cleavage site“, an der das als VW:Ag II gemessene Propeptid [30] zwischen Argenin 763 und Serin 764 durch eine Furinprotease vor der Sekretion abgespalten wird. Maßgeblich für das Erkennen der Schnittstelle sind die Aminosäuren Argenin 760 und Lysin 762 in der vor der Schnittstelle liegenden Konsensussequenz [31].

Der „reife“ VWF wird zum einen konstitutiv sezerniert [32] und zum anderen in Endothelzell-spezifischen Speicherorganellen, den Weibel-Palade-Bodies [33], gespeichert [34]. Aus diesen werden besonders große und für die Thrombozytenadhäsion besonders effektive Multimere [35] durch bestimmte Mediatoren wie Fibrin [36], Histamin [37], Thrombin [38], Serotonin [39], Vasopressin [40] oder Vasopressinanaloga freigesetzt. Serotonin und Vasopressin wirken dabei über eine cAMP-Erhöhung, die anderen Proteine über den Anstieg des Ca²⁺-Gehaltes der Endothelzellen [41].

Im Gegensatz zur konstitutiven Sekretion, die ungerichtet stattfindet, wird der VWF aus den Weibel-Palade-Bodies teils luminal, aber überwiegend basal in

die subendotheliale Matrix sezerniert und in diese integriert [42].

Bei Endothelverletzungen kommt es zur Exposition dieses subendothelialen von Willebrand-Faktors und konsekutiv zur Thrombozytenadhäsion.

Der in Megakaryozyten synthetisierte thrombozytäre VWF wird in α -Granula gespeichert und nach Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt.

Im Blut zirkulierender VWF stammt fast ausschließlich aus Endothelzellen, da weder Megakaryozyten noch Thrombozyten den VWF in relevanten Mengen konstitutiv sezernieren [43]. Dabei wird er zunächst in besonders hochmolekularer Form, den supranormalen Multimeren, freigesetzt.

1.5 Physiologie des von Willebrand-Faktors

Die funktionellen Domänen jeder VWF Untereinheit beinhalten unter anderem Bindungsstellen für Heparin, Kollagen, sulfatierte Glykolipide, die thrombozytären Integrine GpIb und GpIIb/IIIa, Ristocetin und für FVIII.

Bestimmte Bereiche in der A1- und A3-Domäne des VWF interagieren mit den Kollagenen Typ I, III und VI der subendothelialen Matrix [20] und verändern hierdurch die Konformation des VWF. Dieser bindet nun, ebenfalls mit einer Region in der A1-Domäne, besonders gut an das GpIb der Thrombozyten und vermittelt so bei Endothelverletzung und freiliegender subendothelialer Matrix die initial transiente Thrombozytenadhäsion. Dabei unterstützt die Scherkraft des Blutflusses eine Entfaltung der VWF-Multimere zu ihrer strangförmigen Struktur [44] und damit eine vermehrte Bindung von Thrombozyten.

Nach der Plättchenaktivierung durch die Bindung von VWF an GpIb wird GpIIb/IIIa exprimiert [46], welches die Aggregation der Thrombozyten über VWF, und im venösen System überwiegend über Fibrinogen mediiert.

Die irreversible Fixierung erfolgt über interthrombozytäre Bindungen durch GpIIb/IIIa in multiplen Substrat-Rezeptor-Interaktionen. Dabei wirkt VWF synergistisch mit Fibrinogen, welches ebenfalls an GpIIb/IIIa bindet [47].

VWF bildet nach seiner Sekretion über eine Region der D'-Domäne [48] mit FVIII einen nicht-kovalenten Komplex und inhibiert die Proteolyse durch aktivierten Faktor X [49] sowie aktiviertes Protein C [50]. Auf diese Weise werden sowohl Verbrauch als auch Abbau von FVIII gebremst.

Im Gegensatz zur Thrombozytenadhäsion und -aggregation, bei der nur große Multimere eine Rolle spielen, können auch kleine Multimere FVIII binden [51]. Das physiologische FVIII:VWF-Verhältnis von 1:50 [52] hat dabei zur Folge, dass nicht jede Schwankung der Konzentration von VWF:Ag einen messbaren Abfall der FVIII-Konzentration nach sich zieht.

Der VWF wird zunächst in besonders hochmolekularer Form freigesetzt und im Blut von einer spezifischen Metalloprotease ADAMTS13 (**A** Disintegrin-like **A**nd **M**etalloprotease domain with **T**hrombo**S**pondin type I motifs) [53] proteolytisch in seiner Größe und damit in seiner Thrombozyten-abhängigen Funktion reguliert. ADAMTS13 bindet spezifisch an gebundenen oder denaturierten VWF [54] sowie an die aus Weibel-Palade bodies sezernierten hochmolekularen VWF-Multimere [45]. Die Spaltung erfolgt spezifisch in der A2-Domäne zwischen Tyrosin 1605 und Methionin 1606 [45, 55]. Ein Verlust dieser Protease führt zum schweren Krankheitsbild der Thrombotisch-Thrombozytopenischen Purpura, welches auch Morbus Moschcowitz genannt wird [56] (Übersichtsarbeit). Zwei weitere, die VWF-Aktivität verringernde Enzyme sind Thrombospondin-1, eine Disulfidbrücken-Reduktase/Isomerase, die Multimere an den Disulfidbrücken des carboxyterminalen Endes spaltet und so ihre Größe verringert [57], und Plasmin, welches zwar die Ausschüttung von VWF fördert, diesen jedoch auch proteolysiert [58].

1.6 Diagnostik des von Willebrand-Syndroms

Neben der Blutungs- und Familienanamnese können folgende unterschiedliche Methoden der Labormedizin und der Molekulargenetik für die Diagnose des VWS herangezogen werden.

1.6.1 Labormedizinische Diagnostik

Bei Blutungssymptomatik bilden Blutungszeit, z.B. modifiziert nach Ivy et al [59], verlängerte Verschlusszeit, gemessen mit dem Platelet Function Analyzer (PFA-100), sowie die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) die Basisdiagnostik. Die Blutungszeit wird dabei unter anderem wegen mangelnder

Sensitivität und Reproduzierbarkeit sowie der Belastung der Patienten kaum noch angewandt.

Die Verdachtsdiagnose VWS wird durch den Nachweis eines niedrigen VWF:Ag mittels ELISA und einer erniedrigten, die Bindung an GpIb reflektierenden Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (VWF:RCo), sowie einer erniedrigten Kollagen-Bindungsaktivität (VWF:CB) bestätigt [60].

Methoden zur erweiterten Diagnostik sind:

- Die Ristocetin-induzierte Plättchenagglutination (RIPA) zur Unterscheidung des Typs 2A vom Typ 2B.
- Der FVIII-Bindungs-Assay zur Diagnose des Typs 2N.
- Die Multimeranalyse - eine Agarosegel-Elektrophorese - zur Diagnose der Typ 2 Subtypen.

1.6.2 Molekulargenetische Diagnostik

Der Nachweis großer homozygoter Deletionen erfolgt im hiesigen Labor durch PCR und Elektrophorese der PCR-Produkte. Heterozygote Deletionen werden durch quantitative PCR und Auswertung mittels denaturierender HPLC (DHPLC) im Vergleich zu einem Referenzgen und ggfs. mittels Southern Blot nachgewiesen. Kleine Deletionen oder Punktmutationen können mittels PCR einzelner Exons und ihrer flankierenden Intronsequenzen mit anschließender direkter Sequenzierung entdeckt werden.

1.7 Klassifikation des von Willebrand-Syndroms

1972 wurden erstmalig Subklassen des VWS publiziert [61], 1987 ein erster Klassifikationsversuch der unübersichtlichen Subgruppen unternommen [62]. Eine offizielle Klassifikation, die den Typ 1 und den Typ 3 als quantitative Defekte sowie den Typ 2 mit 4 Subtypen als qualitative Defekte umfasst, existiert seit 1994 [63, 64] und wurde 2006 überarbeitet [65].

Tabelle 1: Neue und alte Klassifikation des VWS

Neue Klassifikation nach Sadler et al. [63,64,65], alte Klassifikation nach Ruggeri [62]. Die neuen Typ 2-Subtypen sind durch arabische Ziffern gekennzeichnet, dahinter finden sich die neu zugeordneten Subtypen der alten Klassifikation mit römischen Ziffern.

Typ (neu)	Typ (alt)
1	I
2A	IIA, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH, III
2B	I New York/ Malmö, IIB
2M	B, I Vicenza
2N	-
3	III

Diese, das VWS in drei Typen mit Subtypen unterteilende, Klassifikation orientiert sich in erster Linie an Untersuchungen des Phänotyps, deren Ergebnisse in unterschiedlichen Laboratorien voneinander abweichen können.

Typ 1 ist durch eine Verminderung und Typ 3 durch ein Fehlen des VWF gekennzeichnet. Typ 1 und Typ 2 werden meist dominant, Typ 3 wird rezessiv vererbt. Das VWS Typ 1 kommt mit 55 bis 60 % am häufigsten [65], Typ 3 am seltensten vor.

Durch zunehmende Inanspruchnahme von Referenzlaboratorien wurden in den letzten Jahren jedoch viele ursprüngliche Typ 1-Diagnosen in Typ 2 korrigiert [57, 66].

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde ein Typ 2 diagnostiziert. Dieser beinhaltet alle qualitativen Defekte des VWF und wird in die folgenden Subtypen unterteilt:

1.7.1 VWS Typ 2A

Typ 2A umfasst Defekte mit einem Verlust von großen Multimeren und entsprechend verringerter Thrombozyteninteraktion des VWF. Zur genaueren Beschreibung wird hier zusätzlich zur neuen Bezeichnung (Typ 2A) auch die alte Bezeichnung in römischen Ziffern angegeben.

Die dem Typ 2A zugrundeliegenden Defekte beruhen entweder auf einer gestörten Dimerisierung (Typ 2A IID) [68, 69] oder Multimerisierung (Typ 2A IIE,

IIC) [70, 71, 72], einem gestörten intrazellulären Transport großer Multimere [73] oder einer verstärkten Proteolyse der hochmolekularen VWF-Multimere durch ADAMTS13 im Plasma (Typ 2 IIA,) [74, 75]. Die VWF:RCo und VWF:CB können durch den Mangel an großen Multimeren disproportional niedrig zum VWF:Ag ausfallen [76].

Für folgende zum Typ 2A gehörige Phänotypen sind eindeutige Phänotyp-Genotyp-Korrelationen bekannt:

- Subtyp 2A (IIA): Phänotyp mit verstärkter Proteolyse und ursächlichen Mutationen in der A2-Domäne [77].
- Subtyp 2A (IIC): Phänotyp mit Multimerisierungsdefekt und verminderter Proteolyse. Die ursächlichen Mutationen liegen in der D1- und D2-Domäne und betreffen Disulfidisomerase-Konsensussequenzen, welche für die Disulfidbrückenbildung in der D3-Domäne von Bedeutung sind [70, 71]. Es besteht ein rezessiver Erbgang.
- Subtyp 2A (IID): Phänotyp mit Dimerisierungsdefekt und ursächlichen Cysteinmutationen in der carboxyterminalen CK-Domäne [68, 69].
- Subtyp 2A (IIE): Phänotyp mit Multimerisierungsdefekt (mit oder ohne Beteiligung des VWF in Thrombozyten), verminderter Proteolyse und ursächlichen Mutationen in der D3-Domäne [72].

1.7.2 VWS Typ 2B

Typ 2B ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Affinität zum Gplb, was zu spontaner Thrombozytenagglutination sowie zu einem Verbrauch großer Multimere und Thrombozyten führt. Als ursächlich für die gesteigerte Gplb Affinität werden Mutationen in A1 Domäne angesehen. Dieser Typ wird durch eine verstärkte RIPA, im Zweifelsfall durch die Identifizierung der ursächlichen Mutation diagnostiziert [76, 78].

1.7.3 VWS Typ 2M

Typ 2M ist ähnlich wie der Typ 2A durch eine gestörte Plättchen-abhängige Funktion bei annähernd normalen Multimeren charakterisiert. Zusätzlich zeigt sich eine in Relation zum VWF:Ag niedrig ausfallende VWF:RCo [76, 79].

1.7.4 VWS Typ 2N

Typ 2N (Normandie) wird rezessiv vererbt, steht für verminderte FVIII-Bindung und kann mit einer Hämophilie A verwechselt werden. Laborchemisch zeigt sich ein FVIII-Verlust. VWF:Ag und VWF:RCo können dabei unauffällig sein [76, 80].

1.7.5 VWS Typ 2 unklassifizierbar

Es finden sich immer wieder Veränderungen des VWF, die keiner bisher bestehenden Klasse zuzuordnen sind und Lücken in der bestehenden Klassifikation aufzeigen.

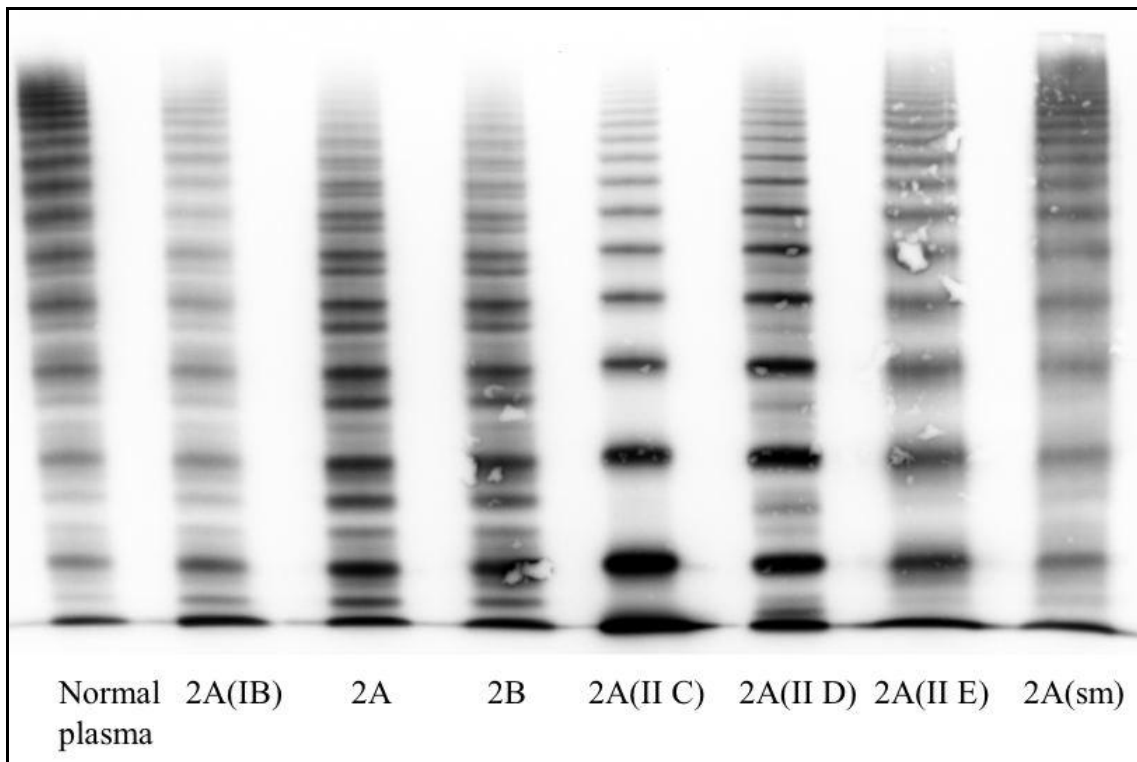


Abb. 4: VWS Typ2 Multimere

Die Abbildung zeigt den lumineszenten Western Blot einer Multimeranalyse von Plasma-VWF mittels Agarosegel-Elektrophorese (Laufrichtung von oben nach unten).

Normalplasma: Im Normalplasma zeigen sich Multimere mit der typischen Tripletstruktur, welche durch die spezifische ADAMTS13-Proteolyse generiert wird, sowie betonte große Multimere. Typ 2A (IB) zeigt eine relative Verminderung großer Multimere bei normaler Tripletstruktur. Typ 2A (IIA) zeigt eine Akzentuierung der Triplet-Subbanden und den Verlust großer Multimere als Zeichen verstärkter Proteolyse. Bei Typ 2B liegt aufgrund erhöhter Affinität zu GpIb mit konsekutiv gesteigerter Proteolyse das gleiche Multimermuster wie beim 2A mit betonten Satellitenbanden und verminderten großen Multimeren vor. Der Typ 2A (IIC) Phänotyp

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

ist in der Mutimeranalyse am vollständigen Fehlen von Tripletstruktur (fehlende Proteolyse) und großen Multimeren (Multimerisierungsdefekt) zu erkennen. Beim Typ 2A (IID) führt eine Dimerisierungsstörung neben Multimeren mit einer geraden Anzahl von Monomeren auch zu solchen mit ungerader Anzahl, die als Zwischenbanden sichtbar sind. Zusätzlich kommt es zur Verminderung großer Multimere. Beim Typ 2A (IIE) sind die großen Multimere aufgrund gestörter Multimerisierung reduziert und die Subbanden wegen verminderter Proteolyse abgeschwächt.

Ganz rechts findet sich ein Typ 2A Subtyp mit verwaschener Struktur: Kennzeichnend ist eine dezente Abnahme der großen Multimere und die Präsenz von amorphem Material anstelle der klar abgrenzbaren Tripletstruktur des Normalplasmas. Quelle: ISTH-SSC VWF Online Database www.vwf.group.shef.ac.uk/ [Stand: 23.03.2010, 10:00 Uhr].

1.7.6 Erworbenes VWS

Vom hereditären VWS abzugrenzen ist der vermehrt diagnostizierte erworbene VWF-Mangel im Rahmen anderer Grunderkrankungen. Erworbenes VWS wurde erstmalig 1968 in Zusammenhang mit systemischem Lupus erythematoses publiziert [81]. Differentialdiagnostisch wegweisend sind der späte Beginn der Blutungssymptomatik, das Vorliegen einer potentiell ursächlichen Grunderkrankung und die leere Familienanamnese. Erworbenes VWS ist am häufigsten bei Lymphoproliferativem Syndrom, kardiovaskulären Erkrankungen, Myeloproliferativem Syndrom, anderen Neoplasien sowie gelegentlich bei Autoimmunerkrankungen zu beobachten. Eine Übersichtsarbeit hierzu findet sich unter [82]. Bei VWS aufgrund kardialer Grunderkrankungen wird am häufigsten ein dem Typ 2A entsprechendes Fehlen großer Multimere beobachtet.

1.8 Therapie des von Willebrand-Syndroms

Die Therapie beruht hauptsächlich auf der Erhöhung des VWF-Plasmaspiegels durch Substitution oder Freisetzen von VWF aus seinen zellulären Speichern, den Weibel-Palade bodies (WPB).

Desmopressin (1-deamino-8-D-arginine Vasopressin) ist ein synthetisches Vasopressinanalogen, welches ursprünglich für die Therapie des Diabetes insipidus entwickelt wurde [83]. Desmopressin bindet an den Vasopressin-V2-Rezeptor, aktiviert den cAMP-Signaltransduktionsweg in den Endothelzellen und bewirkt eine Freisetzung von VWF aus den WPB. DDAVP wird vor allem als Therapeutikum für das VWS Typ 1 und einige Subtypen des VWS Typ 2

eingesetzt [84]. Die Substitution des VWF erfolgt durch VWF-enthaltende FVIII-Konzentrate. Hochgereinigte FVIII-Konzentrate oder rekombinante FVIII-Konzentrate sind wegen des fehlenden VWF zur Substitution nicht geeignet [84].

1.9 Fragestellung

Die Klassifikation des VWS wird in den letzten Jahren zunehmend genauer, einerseits durch präzisere Labordiagnostik und andererseits durch den Einsatz der molekulargenetischen Diagnostik. Die verwaschene Struktur von VWF-Multimeren wurde lange als Artefakt angesehen, da inadäquate Präanalytik bei Probenlagerung und Transport, sowie das unsachgemäße Auftauen eingefrorener Plasmen einen ähnlichen Phänotyp vortäuschen können. Seitdem sich jedoch dieser Phänotyp auch in Familienuntersuchungen als genetisch determiniert bestätigt hat und durch Expressionsstudien der Zusammenhang zwischen bestimmten Mutationen und verwaschener Multimerstruktur nachgewiesen wurde, wird dieses Phänomen zunehmend als valide betrachtet.

Diese Arbeit befasst sich mit der Relation zwischen Phänotyp und Genotyp einer Gruppe von 22 Patienten, deren Multimere in einem Referenzlabor als verwaschen beurteilt wurden.

Dabei sollte durch Extraktion von DNA aus Leukozyten in Patientenblut, Amplifizierung mittels PCR und anschließender Sequenzierung geklärt werden, ob sich bei diesen Patienten spezifische Mutationen nachweisen lassen, die mit dem Phänotyp korrelieren könnten. Es sollte außerdem untersucht werden, ob den Multimeren mit verwaschener Struktur ein einheitlicher Genotyp zugrunde liegt oder ob unterschiedliche molekulare Mechanismen zu einem ähnlichen Ergebnis führen.

2 *Patienten und Methoden*

2.1 Patienten

Die Untersuchung erfolgte nach Aufklärung der Patienten oder Erziehungsberechtigten durch den behandelnden Arzt und deren Einverständniserklärung. Diese Studie steht im Einklang mit der revidierten Deklaration von Helsinki zu

ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Tokio, 2004).

Es wurden 22 Patienten aus 21 nicht miteinander verwandten Familien untersucht. Bei allen Patienten wurde zuvor im Labor von Prof. Dr. med. U. Budde (ehemals Labor Prof. Arndt und Partner, Hamburg, jetzt AescuLabor Hamburg) im Rahmen der klinischen Routinediagnostik ein VWS Typ 2A oder 2M mit verwaschener Multimerstruktur diagnostiziert. Da Anamnese und Erstdiagnose der Patienten von unterschiedlichen Ärzten und Instituten durchgeführt wurden und nur in Ausnahmefällen bekannt waren, beschränken sich die in dieser Arbeit aufgeführten Parameter auf die im Gerinnungslabor von Prof. Dr. Budde durchgeführten Untersuchungen.

Die Multimeranalysen sowie die Laborparameter aller Patienten finden sich ausführlich im Ergebnisteil in Zusammenschau mit den gefundenen Mutationen.

Es handelt sich um eine heterogene Gruppe aus jeweils 11 weiblichen und 11 männlichen Patienten. Das Alter der Patienten beim Eingang der Proben lag zwischen einem und neunzig Jahren, das Durchschnittsalter bei dreiunddreißig Jahren (siehe Tabelle 2).

Gemeinsam war allen Patienten eine verwaschene Struktur der einzelnen VWF-Oligomere und somit das Fehlen der typischen proteolytisch bedingten Triplett-Struktur in der SDS-Agarosegel-Elektrophorese. Bei einigen Patienten waren die großen VWF-Multimere relativ reduziert oder fehlend (45 % der Patienten), bei anderen fanden sich im Gegensatz sogar besonders große, sogenannte supra-normale Multimere (36 % der Patienten). Auch die übrigen phänotypischen Parameter, wie VWF:Ag, VWF:CB und die VWF:CB/VWF:Ag-Ratio waren sehr heterogen und reichten von normalen Werten bis zu starker Verminderung. Einige Patienten zeigten einen proportionalen Abfall von VWF:Ag und VWF:CB; bei anderen war die Ratio aus VWF:CB und VWF:Ag, einem funktionellem Defekt entsprechend, erniedrigt (siehe Tabelle 2).

Im Durchschnitt war das VWF:Ag bei ausgeglichener VWF:CB/VWF:Ag-Ratio jedoch nur leicht vermindert.

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Tabelle 2: Zusammenfassende Auflistung der Patientendaten

Die einzelnen nicht verwandten Patienten sind von 1 bis 19 durchnummeriert. Bei unterschiedlichen phänotypischen Parametern desselben Patienten sind Mindest- und Höchstwerte durch einen Bindestrich getrennt. Familien sind mit der Familiennummer, Familienmitglieder mit den Nummern eins für den Vater, zwei für die Mutter und einer fortlaufender Nummerierung in der Geburtsreihenfolge der Kinder gekennzeichnet. Thrombozytärer VWF und Thrombozytenzahl waren bei allen Patienten unauffällig.

Bei den Patienten Nr. 14 und Nr. 16 wird eine relative Verminderung der großen Multimere vom gleichzeitigen Vorliegen supranormaler Multimere begleitet. Die Multimere einiger Patienten zeigen erwähnenswerte Besonderheiten: Bei Patient Nr. 1 ist eine zusätzliche hintere Subbande zu erkennen. Die Multimere der Patienten Nr. 14, 15, F1/P2 und F1/P2 wandern schneller als die Multimere des Normalplasmas.

Patient Nr. 9 war zum Zeitpunkt beider Untersuchungen schwanger.

Patient Nr.	Geschlecht	Alter bei Probeneingang (Jahre)	VWF: Ag %	VWF: CB %	VWF:CB / VWF:Ag	Verminderung großer Multimere	Supranormale Multimere
1	W	55	72	71	0,9	-	-
2	M	24	48	57	1,2	-	-
3	W	30	16	10	0,6	-	-
4	M	39	23	14	0,6	-	-
5	W	90	23	15	0,6	-	+
6	M	23	17	10	0,6	+	-
7	M	11	23	15	0,6	+	-
8	M	1	5	2	0,4	+	-
9	W	31	36-38	34-39	0,9-1	-	-
10	W	25	94	164	1,7	-	-
11	W	76	62	48	0,8	+	-
12	M	12	15	11	0,7	+	-
F2/P2	W	36	52	55	1,1	-	+
13	W	43	46-54	47-61	1-1,1	-	-
14	W	39	43	42	1	+	+
15	M	21	113	101	0,9	-	+
F1/P2	W	49	51-80	55-87	1,1	-	+
F1/P3	M	24	83	113	1,4	-	+
16	W	40	14-22	9-12	0,4-0,9	+	+
17	M	12	23	23	1	-	-
18	M	23	30	27	0,9	+	-
19	M	24	38	36	0,9	-	-
Gesamt	Verteilung	Durchschnitt	Durchschnitt			Gesamt	
22	W11/M11	33	42,6	44,7	0,9	10	8

2.2 Methoden

Von allen untersuchten Patienten wurde DNA aus Leukozyten isoliert. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden von allen Patienten zunächst die Exons 18 bis 28 mit flankierenden Intronsequenzen amplifiziert und im Anschluss nach Qualitätskontrolle mittels einer PAGE direkt sequenziert, da hier die meisten Typ 2-Mutationen zu finden sind. Wurde in diesem Abschnitt keine Mutation gefunden, erfolgte anschließend die Sequenzierung vom Exon 29 bis zum Exon 52 in gleicher Weise. Bei Patienten, in deren Exons 18 bis 52 sich keine Mutation fand, wurden auch die Exons 2 bis 17 sequenziert, welche das Signalpeptid und das Propeptid kodieren. In jeweils einem Fall wurden ein Restriktionsenzymverdau zur Verifizierung einer in der Sequenzanalyse gefundenen Mutation und eine Klonierung zum Quantifizieren einer in der Sequenzanalyse gefundenen heterozygoten Deletion durchgeführt.

Eine mögliche Kausalität der gefundenen Mutationen für den Phänotyp wurde mittels Datenabgleich mit der ISTH-SSC VWF Online Database (www.vwf.group.shef.ac.uk/) und durch Sequenzvergleich mit weiteren Spezies überprüft. Im Rahmen einer weiteren Dissertationsarbeit (Frau H. Eckert) wurden zudem die gefundenen Mutationen mittels „In-vitro-Mutagenese“ in einen VWF-Expressionsvektor eingeführt und exprimiert. Anschließend erfolgte die phänotypische Analyse des rekombinanten VWF im Vergleich zum Wildtyp-VWF (nicht Bestandteil dieser Arbeit).

Eine Liste alle verwendeten Geräte und Materialien (siehe 7.2), sowie sämtlicher Rezepte (siehe 7.3) und Cyclerprogramme (siehe 7.4) befindet sich im Anhang dieser Dissertation.

2.3 DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde aus Leukozyten in Patienten-Citrat oder –EDTA-Blut extrahiert. Hierfür wurde das QIAamp DNA Mini® Kit verwendet und mit leichter Modifikation nach der Anleitung aus dem Handbuch gearbeitet. Die von mir verwendete Blutmenge entsprach mit 400 µl der doppelten Menge der im Protokoll empfohlenen 200 µl, zudem wurde die Eluierung doppelt durchgeführt. Auf diese Weise sollte der DNA-Gewinn aus den teilweise sehr alten Proben gesteigert werden.

Die Zellen wurden zunächst durch Proteinase K lysiert, anschließend wurde das Gemisch durch eine die DNA bindende Silicia-Matrix mit 6000 g über 1 min zentrifugiert. Diese wurde nun mehrfach gewaschen, um die Zellproteine und das Hämoglobin zu entfernen. In einem letzten Schritt wurde die DNA mittels des im Kit enthaltenen AE-Puffers eluiert. Eine Erfolgs- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometrische Bestimmung der Konzentration des gewonnenen Eluates mittels eines Eppendorf Photometers bei E260 nm.

2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe dieser einfachen, 1983 von Kary Mullis eingeführten und von Saiki et al. weiterentwickelten Methode [85] ist es möglich, Teile der genomischen DNA selektiv in vitro zu amplifizieren und somit die Basis für weitere molekulargenetische Untersuchungen zu schaffen.

Der Prozess der PCR bestand in dieser Arbeit aus 35 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt wurden. Jeder Zyklus bestand aus folgenden drei Schritten:

- *Denaturierung*: Trennung der Doppelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen bei 94 °C. Dabei war der erste Denaturierungsschritt mit 5min länger, um eine vollständige Trennung zu erreichen.
- *Primerhybridisierung* (primer annealing): Abkühlung des Reaktionsansatzes auf eine Temperatur, bei der die Primer sich an ihren Komplementärstrang anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von der Länge und dem GC-Anteil der Primern ab und lag zwischen 52 °C und 68 °C. Bei zu hoher Temperatur findet kein annealing statt, bei zu niedrigen Temperaturen ein zunehmend unspezifisches.
- *Elongation*: Die optimale Synthesetemperatur der eingesetzten hitzestabilen Taq (Thermus aquaticus)-Polymerase liegt bei 72 °C. Das Enzym beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann - komplementäre Desoxynukleotide verbindend - dem DNA-Template.

Nun beginnt der Zyklus wieder mit der Denaturierung. Die in den ersten Zyklen gewonnenen PCR-Produkte dienen ebenfalls als Matrize, so dass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung kommt.

Zum Generieren der Primer müssen die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankierenden Sequenzen bekannt sein. Die Primersequenzen für das VWF-Gen wurden der Literatur [23] entnommen bzw. aus der genomischen Sequenz ausgewählt (Genbank No. NT_009759).

Im menschlichen Erbgut befindet sich auf Chromosom 22 ein 21 bis 29 Kilobasen langes VWF-Pseudogen [86, 23], das den Exons 23 bis 34 des VWF-Gens zu 96,9 % homolog ist [86]. Aus diesem Grund wurden Oligonukleotide ausgewählt, deren komplementäre Sequenzen in Bereichen des VWF Genes lagen, welche sich hinsichtlich der Sequenz vom Pseudogen unterscheiden.

So wurde eine unerwünschte Vervielfältigung des Pseudogens verhindert.

2.5 Gelelektrophorese

2.5.1 Agarosegel

Das Agarosegel wurde benötigt, um die PCR-Produkte von Primern und unspezifischen Produkten zu trennen. Die Konzentration des zu verwendenden Agarosegels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden PCR Produkte und lag in dieser Studie bei 1,2 %. Als Laufpuffer diente 1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer und als Farbstoff das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid. Die noch ungelierete Agarose wurde in eine Trägerschale gegossen. Ein über die Kammer gehängter Kamm sorgte im sich verfestigenden Gel für Aussparungen, welche dann als Taschen für die amplifizierte DNA dienten.

Die Träger mit dem Agarosegel wurden vor dem Einbringen der mit 1/10 Volumen Gel loading Buffer versetzten PCR-Produkte und der zur Größenorientierung aufgetragenen 100 Basenpaarleiter in die mit 1X TAE Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Auftrennung lief bei 120 bis 180 V mit einer Laufzeit von ca. 20-30 min.

Nach der Elektrophorese wurden die das Produkt enthaltenden Banden auf einem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und durch eine für Agarose undurchlässigen Säule (Ultrafree-DA Millipore) abzentrifugiert.

2.5.2 Multimeranalyse (nicht Bestandteil dieser Arbeit)

Die Multimeranalyse fand ebenfalls in einem Agarosegel statt [87]. Sie wurde im Labor von Prof. Dr. med. Budde mit SDS/LGT-Agarose in 1,6 % und 1,2 % Konzentration angefertigt. Es folgten ein Western Blot und das unspezifische Blocken der Trägermembran mit Milchprotein aus fettarmer Kuhmilch. Anschließend wurde mit einem mit Peroxidase markierten VWF-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Peroxidaseaktivität kann mittels Lumineszenz über einen Röntgenfilm oder eine Spezialkamera visualisiert werden.

2.5.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die PAGE diente der Qualitätskontrolle der PCR und ermöglichte in einem Fall (Deletion), schon eine Mutation zu erkennen.

Nach dem Polymerisieren wurde das Gel auf eine gekühlte (8 °C) Elektrophoresegrundplatte gelegt. Im Weiteren wurden jeweils 1,6 µl der PCR-Produkte auf der kathodennahen Seite aufgetragen.

Nach einer Laufzeit von ca. 20 min bei einer Leistung von 15 W wurden die Gele mit Silbernitrat gefärbt.

Das Gel wurde hierzu mittels Ethanol (10 %) fixiert, durch Salpetersäure (1 %) oxidiert und nach Inkubation mit Silbernitratlösung (10 mM) so lange in Natriumbikarbonat/Formalinlösung (siehe 7.2 Rezepte) reduziert, bis sich die DNA gut sichtbar anfärbte. Diese Reaktion wurde durch Essigsäure (10 %) gestoppt.

2.6 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme können eine spezifische Basensequenz in einem DNA-Doppelstrang erkennen und beide Stränge schneiden.

Durch Schnittstellen verändernde oder neue Schnittstellen generierende Mutationen im VWF-Gen entstehen bei Mutant und Wildtyp unterschiedlich große Fragmente, die durch eine Gelelektrophorese, in diesem Fall durch eine PAGE visualisiert werden können. Diese Methode wurde in Einzelfällen zur Verifizierung von durch Sequenzanalyse identifizierten Mutationen eingesetzt.

In dieser Arbeit verwendete ich das Restriktionsenzym BglI, welches über Nacht mit dem PCR-Produkt des betreffenden Exons bei 37 °C in einem

Thermocycler inkubiert wurde. Am folgenden Tag eine Auswertung mittels PAGE satt.

2.7 Sequenzierung

Es wurde die Didesoxymethode nach Sanger [88] in modifizierter Form angewandt. Sequenzierungsansatz und Programme finden sich in Anhang. Analog zur PCR durchläuft die Sequenzierung mehrere Zyklen von Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Der Sequenzierungsansatz enthält neben der DNA, deren Sequenz es zu bestimmen gilt, alle nötigen Bausteine der in vitro DNA-Replikation. Es wird jedoch nur ein Primer zugegeben, welcher entweder vor dem 3'-Ende des kodierenden- oder dem 3'-Ende des komplementären Stranges des zu sequenzierenden DNA Abschnittes bindet. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zur PCR ist, dass der Ansatz neben den dNTPs eine gewisse Menge mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) enthält. Diese verursachen, wenn sie eingebaut werden, einen Strangabbruch. So entstehen DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge, an deren Ende sich jeweils ein als solches markiertes Guanin, Adenin, Thymin oder Cytosin befindet.

Die aufgereinigten Bruchstücke werden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zum Fluoreszieren angeregt. Die Reihenfolge der basenspezifischen Fragmente und damit die Sequenz wird mittels eines Detektors abgelesen.

Nach der in Thermocyclern durchgeführten Sequenzierungsreaktion wurden die Produkte mittels Quiagen Dyeex 96 Kit und Zentrifugieren bei 1000 g für 3 min. von den restlichen Dye-Terminatoren befreit. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Sequenz in einem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer.

2.8 Klonierung

Unter diesem Begriff wird in der Molekularbiologie das Einbringen einer spezifischen DNA-Sequenz in eine Wirtszelle unter Zuhilfenahme eines Vektors und anschließendes Amplifizieren der DNA-Sequenz durch Zellteilung verstanden. In dieser Arbeit wurde die Klonierung eingesetzt, um eine heterozygote numeri-

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

sche Sequenzabweichung allelspezifisch charakterisieren zu können.

Zum Nachweis heterozygoter numerischer Sequenzabweichungen wie z. B. Deletion, Insertion und Duplikation ist die direkte Sequenzierung ungeeignet, da sie beide Allele sequenziert und diese übereinander liegend abgebildet werden. Somit ist z. B. nicht eindeutig erkennbar, ob eine Deletion eine oder mehrere Basen betrifft.

Da bei der Klonierung nur ein DNA-Fragment und damit nur ein Allel in den TOPO TA® Vektor integriert wird, können die Allele getrennt sequenziert werden

Es wurde das TOPO TA® cloning kit verwandt und nach den Protokollbedingungen des One Shot® Chemical Transformation Protocol für TOP10 Competent Cells gearbeitet.

Zunächst wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert und mit einem Vektor (in diesem Fall einem Plasmid) ligiert, um die Wirtszelle damit transformieren zu können.

Die Taq Polymerase baut mit ihrer Transferaseaktivität ein Desoxyadenin an das 3'-Ende des PCR-Produktes an, wodurch ein A-Überhang entsteht. Der Vektor besitzt einen T-Überhang am 3'-Ende und ist kovalent mit der Topoisomerase I des Vaccinia Virus verbunden, die das Plasmid und die amplifizierte DNA verbindet. Nun können chemisch kompetente E. coli, deren Membran für den Vektor permeabel gemacht wurde, mit den ligierten Vektoren durch gemeinsame Inkubation und anschließendem Hitzeschock transformiert werden.

Der Vektor enthält ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen. So können auf einer mit Ampicillin versetzten Agarplatte nur solche Bakterien wachsen, die einen Vektor aufgenommen haben. Zusätzlich wird durch die Ligation das Leseraster des im Vektor enthaltenen letalen control of cell death B (ccdB) Genes zerstört, wodurch seine Expression inhibiert wird. Dies führt dazu, dass nur mit erfolgreich ligiertem Vektor transfizierte E. coli überleben.

Nach dem Ausplattieren der E. coli auf die Nährböden bilden sich Kolonien. In einer Kolonie wird entweder das Wildtypallel oder das mutierte Allel vermehrt.

Nun kann eine Kolonie-PCR mit plasmidspezifischen Primern mit anschließender Sequenzierung erfolgen.

3 Ergebnisse

Zur besseren Übersicht werden die gefundenen Mutationen in Zusammenschau mit den im Labor von Prof. Dr. med. U. Budde durchgeführten Multimeranalysen sowie den Ergebnissen der dort durchgeführten Labordiagnostik präsentiert.

Die Nomenklatur der Mutationen folgt den Vorschlägen von Goodeve et al. [89].

Die Nummerierung der Nukleotide der komplementären DNA (cDNA) des von Willebrand-Faktors beginnt mit dem Adenin (= c.1) des Startcodons ATG.

Auf der Proteinebene des VWF (Propeptid und reifer VWF) wird die Startaminosäure Methionin im Prä-Pro-VWF, als p.1 bezeichnet. Zunächst wird die Mutation auf Nukleotidebene nach dem Schema c.0123X>Y angegeben, dahinter die zu erwartende Konsequenz auf Aminosäureebene nach dem Schema p.X0123Y.

In den Graphiken, welche den die Mutation enthaltenden Sequenzausschnitt darstellen, ist das betroffene Triplet durch einen Kasten eingerahmt. Das veränderte Nukleotid wird infolge zweier übereinander abgebildeten Basen mit N für nicht lesbar gekennzeichnet. Darüber befindet sich die Base des mutierten Allels, darunter die des Wildtyps.

Sequenzierungs-Chromatogramme ohne besondere Kennzeichnung beziehen sich grundsätzlich auf die Sequenzierung mit dem Sense-Primer. Die Bezeichnung ASN verweist auf die Sequenzierung mit dem Antisense-Primer.

3.1 Patienten mit gefundenen Mutationen

3.1.1 c.2278C>A p.R760C Patient Nr. 01

VWF:Ag und VWF:CB des Patienten liegen im Normbereich (Tabelle 3), die Multimeranalyse (Abb. 5A) zeigt alle Multimere des normalen Plasmapools. Die Tripletstruktur ist erkennbar, jedoch durch amorphes Material überlagert. Außerdem ist eine zusätzliche Subbande zu erkennen (Markierung).

Der Patient ist heterozygot für die Mutation CGC>TGC im Codon 760 (c.2275C>T) (Abb. 5B), die zum Austausch der AS Arginin durch die AS Cystein führt (p.R760C). Diese Mutation zerstört die Furin-Cleavage site des VWF.

Tabelle 3: Laborwerte des Patienten Nr. 01

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	72%	50-160%
VWF:CB	71%	50-250%

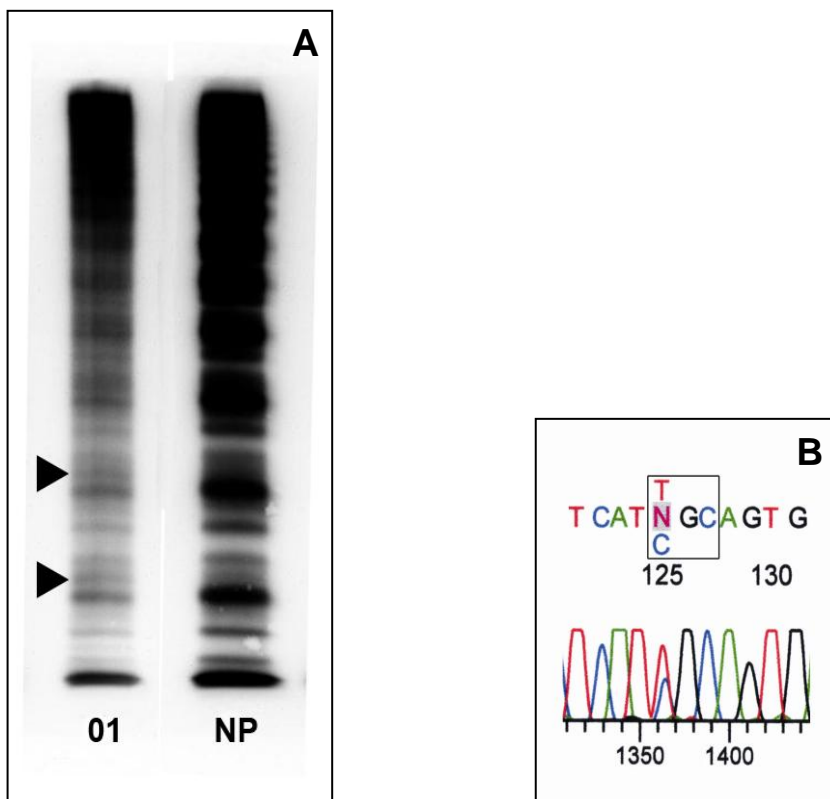


Abb. 5: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 01

3.1.2 c.2276G>A p.R760H Patient Nr. 02

Das VWF:Ag des Patienten Nr. 02 ist leicht erniedrigt, seine VWF:CB liegt im unteren Normbereich (Tabelle 4). Außerdem zeigte die Laboruntersuchung eine FVIII Bindungskapazität von 80% des Plasmapools, was zum Ausschluss eines Typ 2N führte. Die Multimeranalyse (Abb. 6A) lässt alle Multimere des normalen Plasmapools erkennen, die Tripletstruktur ist kaum ausgeprägt und durch amorphes Material überlagert. Der Patient ist heterozygot für die Mutation CGC>CAC im Codon 760 (c.2276G>A) (Abb. 6B), die zum Einbau der AS Histidin anstelle der AS Arginin führt (p.R760H). Diese zerstört wie p.R760C ebenfalls die Furin-Cleavage Site des VWF.

Tabelle 4: Laborwerte des Patienten Nr. 02.

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	48%	50-160%
VWF:CB	57%	50-250%

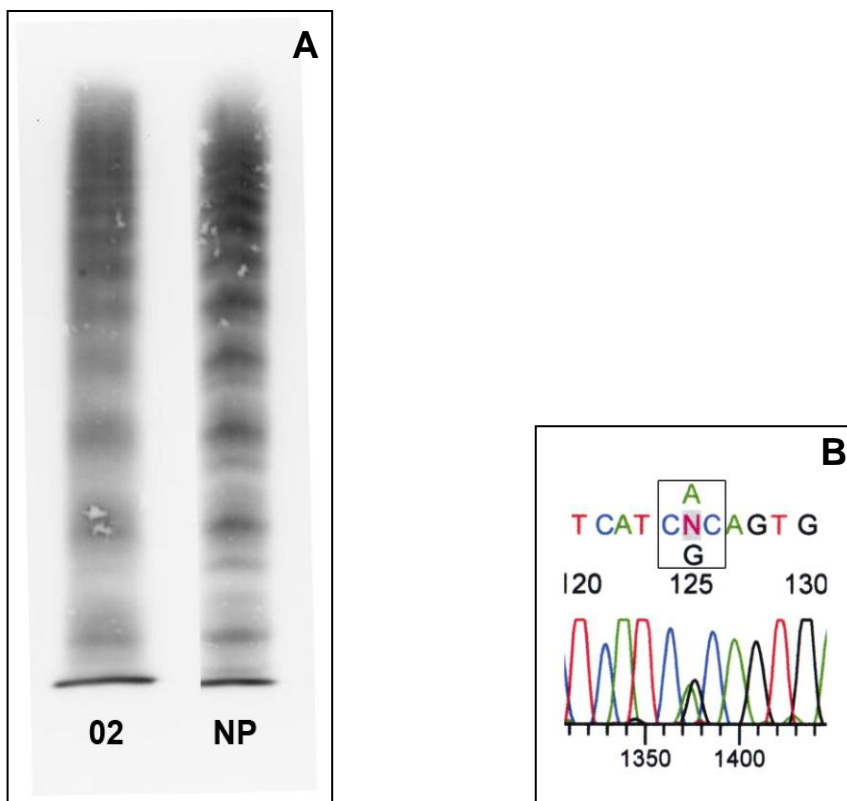


Abb. 6 Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 02

3.1.3 c.3437A>G p.Y1146C Patient Nr. 03

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 03 sind erniedrigt (Tabelle 5). Die Multimeranalyse (Abb. 7A) lässt alle Multimere des normalen Plasmapools erkennen, es besteht jedoch eine relative Abnahme zu den großen Multimeren hin. Die Tripletstruktur der Multimere ist nicht erkennbar, zwischen den Zentralbanden befindet sich lediglich amorphes Material. Der Patient ist heterozygot für die Mutation TAT>TGT im Codon 1146 (c.3437A>G) (Abb. 7B), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Tyrosin führt (p.Y1146C).

Tabelle 5: Laborwerte des Patienten Nr. 03

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	16%	50-160%
VWF:CB	10%	50-250%

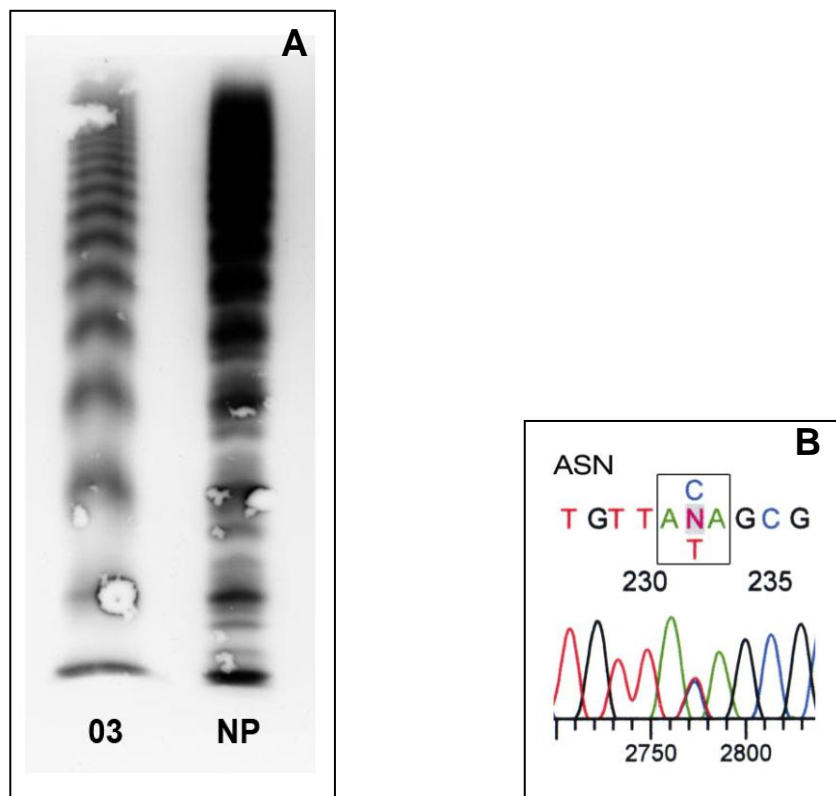


Abb. 7: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 03

3.1.4 c.3515G>A p.G1172D Patient Nr. 04

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 04 sind erniedrigt (Tabelle 6). Die Multimeranalyse (Abb. 8A) zeigt alle Multimere des normalen Plasmapools. Eine Tripletstruktur ist nur angedeutet erkennbar, stattdessen findet sich amorphes Material zwischen den Zentralbanden. Das Multimermuster ähnelt dem eines Typ 2A (IIE). Der Patient ist heterozygot für die Mutation GGC>GAC im Codon 1172 (c.3515G>A) (Abb. 8B), die zum Einbau der AS Asparaginsäure anstelle der AS Glycin führt (p.G1172D).

Tabelle 6: Laborwerte des Patienten Nr. 04

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	23%	50-160%
VWF:CB	14%	50-250%

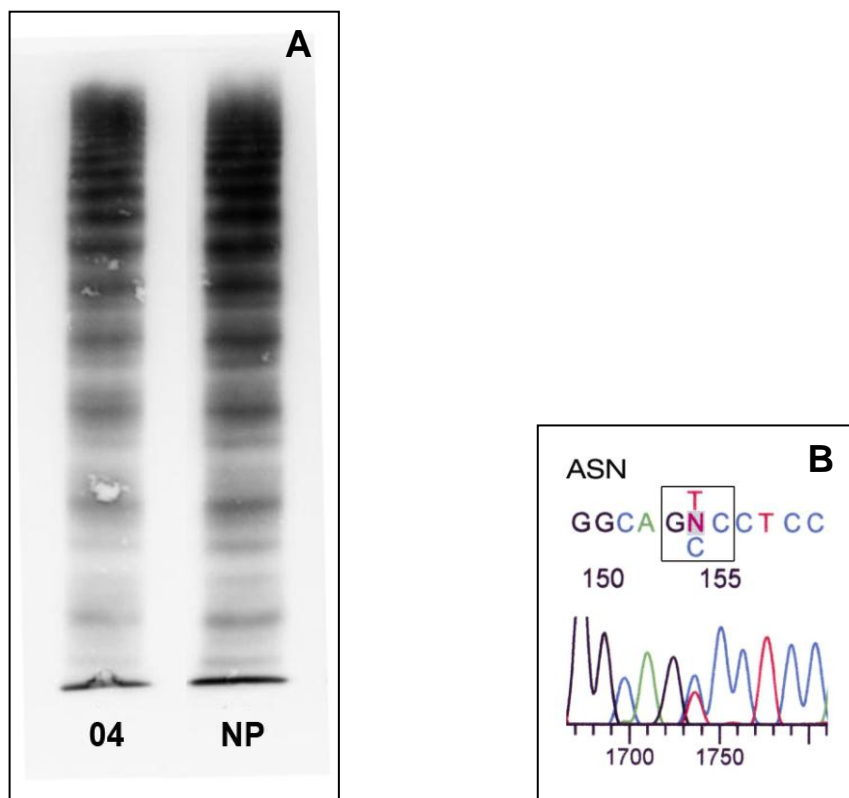


Abb. 8 Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 04

3.1.5 c.3614G>A p.R1205H Patient Nr. 05

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 05 sind erniedrigt (Tabelle 7). Die Multimeranalyse (Abb. 9A) zeigt alle Multimere des normalen Plasmapools. Zusätzlich sind supranormale Multimere zu erkennen. Die Tripletstruktur ist erkennbar, jedoch findet sich auch amorphes Material um die Zentralbande. Der Patient ist heterozygot für die Mutation CGT>CAT im Codons 1205 (c.3614G>A) (Abb. 9B), die zum Austausch der AS Arginin durch die AS Histidin führt (p.R1205H).

Tabelle 7: Laborwerte des Patienten Nr. 05

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	23%	50-160%
VWF:CB	15%	50-250%

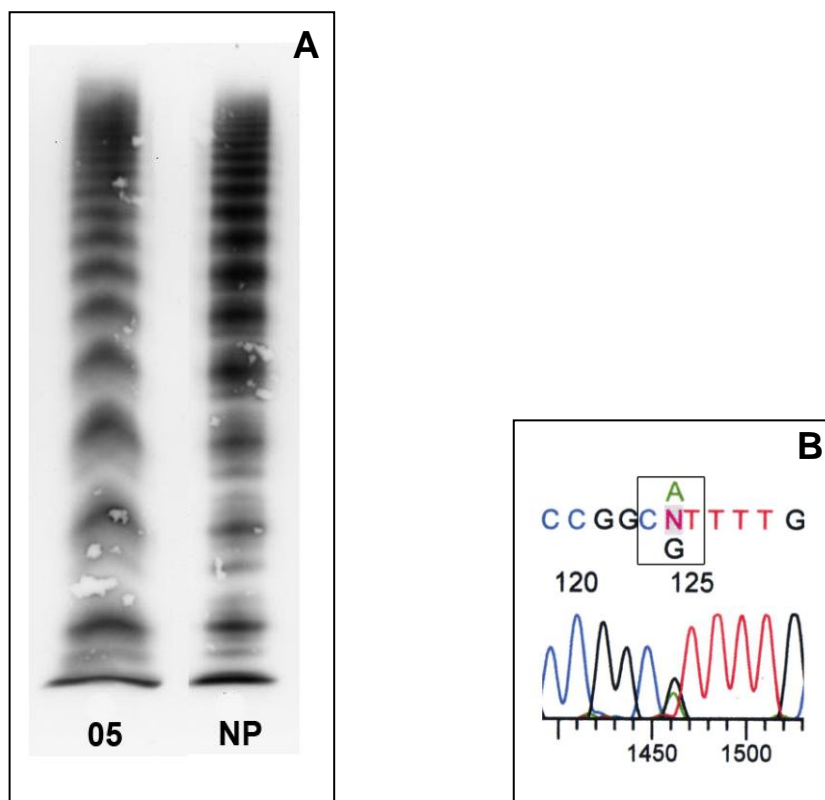


Abb. 9: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 05

3.1.6 c.4120C>T p.R1374C Patient Nr. 06

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 06 sind erniedrigt (Tabelle 8). Die Multimeranalyse (Abb. 10A) zeigt alle Multimere des normalen Plasmapools, es besteht jedoch eine relative Abnahme zu den großen Multimeren hin. Die Tripletstruktur ist in höherer Auflösung erkennbar, jedoch nur schwach ausgeprägt und durch amorphes Material überlagert. Der Patient ist heterozygot für die Mutation CGC>TGC im Codon 1374 (c.4120C>T) (Abb. 10B), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Arginin führt (p.R1374C).

Tabelle 8: Laborwerte des Patienten Nr. 06

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	17%	50-160%
VWF:CB	10%	50-250%

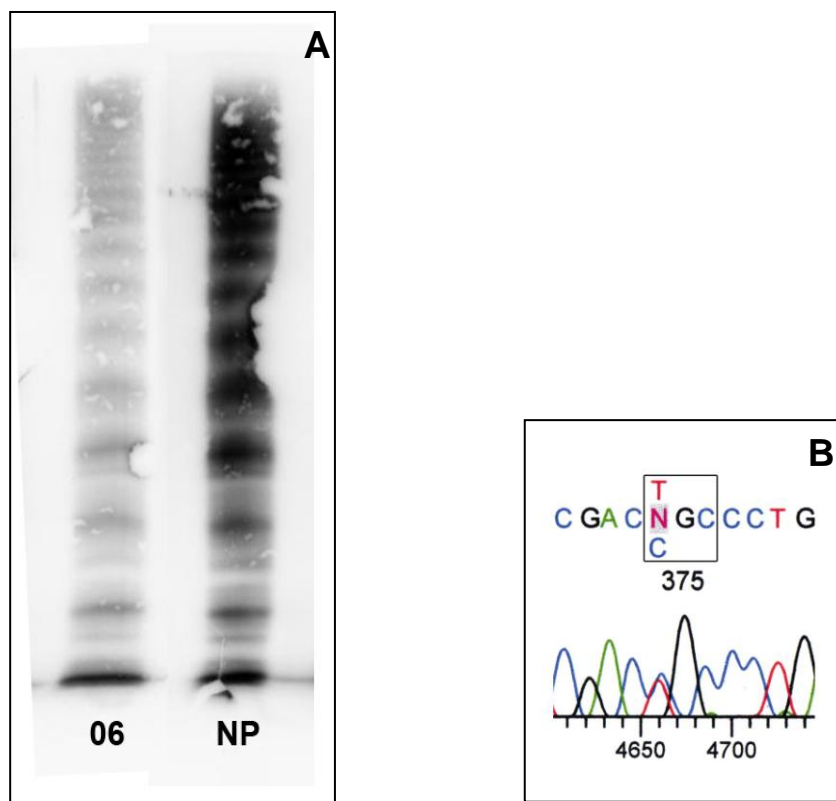


Abb. 10: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 06

3.1.7 c.4120C>T p.R1374C Patient Nr. 07

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 07 sind erniedrigt (Tabelle 9). Die Multimeranalyse (Abb. 11A) zeigt alle Multimere des normalen Plasma-pools, es besteht jedoch eine relative Abnahme zu den großen Multimeren hin. Die Tripletstruktur ist erkennbar, aber nur schwach ausgeprägt und durch amorphes Material überlagert. Der Patient ist wie Patient 06 ebenfalls heterozygot für die Mutation CGC>TGC im Codon1374 (c.4120C>T) (Abb. 11B), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Arginin führt (p.R1374C).

Tabelle 9: Laborwerte des Patienten Nr. 07

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	23%	50-160%
VWF:CB	15%	50-250%

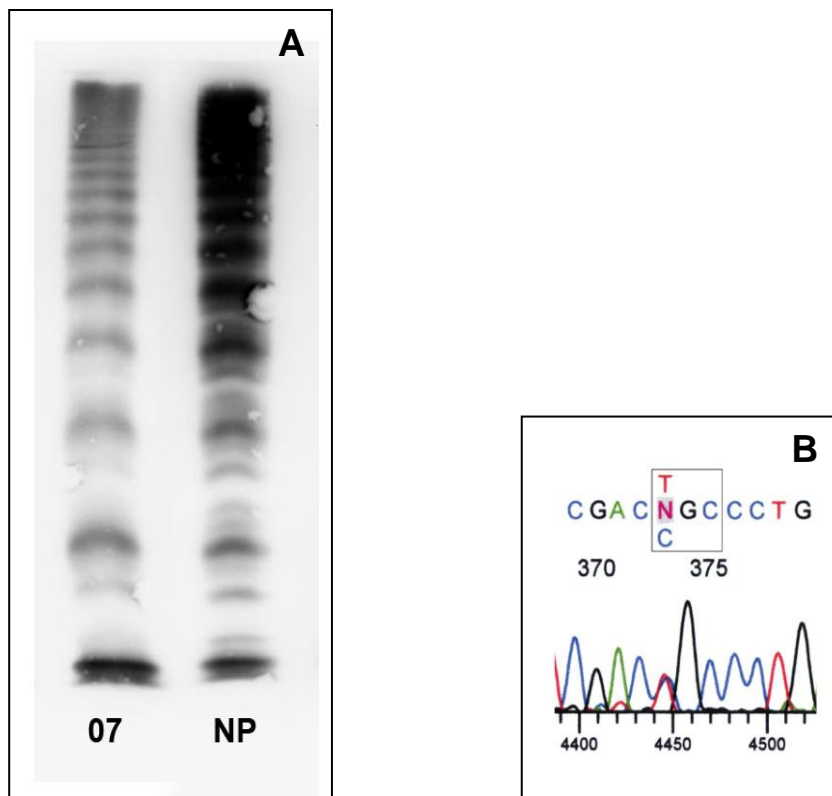


Abb. 11: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 07

3.1.8 c.4120C>A p.R1374S + c.5310delC fs.1781 Patient Nr. 08

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 08 sind stark vermindert (Tabelle 10). Die Multimeranalyse (Abb. 12A) zeigt alle Multimere des normalen Plasmapools mit einer starken relativen Abnahme zu den großen Multimeren hin. Die Tripletstruktur ist nicht erkennbar, lediglich amorphes Material umgibt die Zentralbande. Der Patient ist compound-heterozygot für die Mutation CGC>AGC im Codon 1374 (c.4120C>A) (Abb. 12B), die den Einbau der AS Serin anstelle der AS Arginin bewirkt (p.R1374C) und die Einbasendeletion c.5310delC in Exon 30 (Abb. 13A), die zu einem TGA Stopp-Codon an Position 1781 und somit zu einem Nullallel führt.

Tabelle 10: Laborwerte des Patienten Nr. 08

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	5%	50-160%
VWF:CB	2%	50-250%

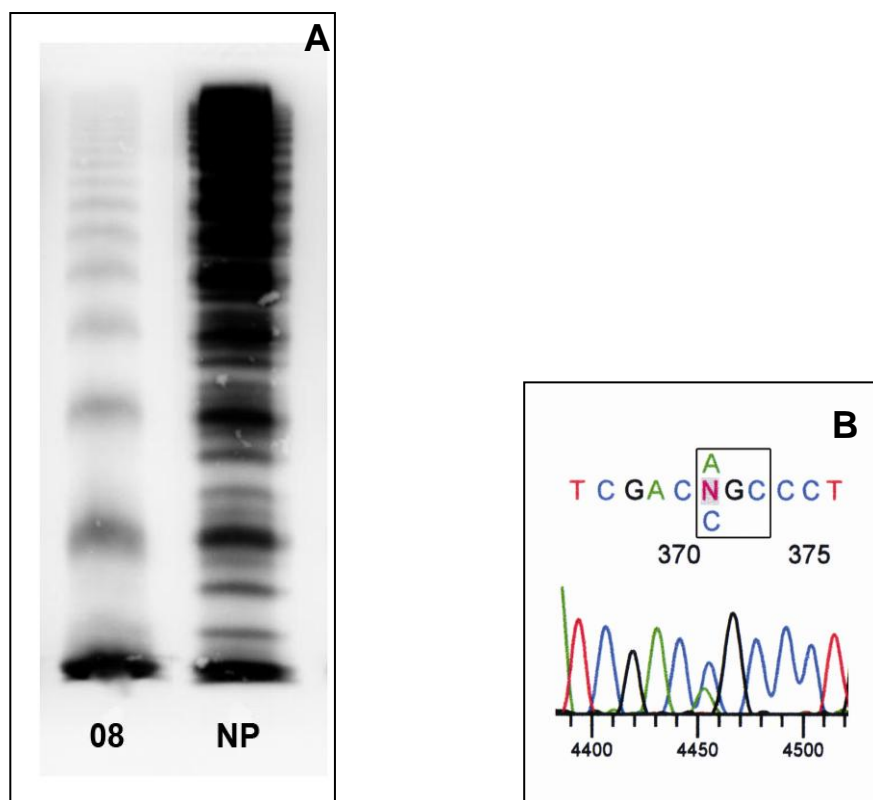


Abb. 12: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 08

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

In der PAGE (Abb. 14) zeigt sich das Exon 30 des Patienten Nr. 08 als Doppelbande, was bereits auf zwei unterschiedlich schnell laufende Allele schließen lässt. Die Sequenzanalyse zeigte das Bild einer Deletion und lieferte die Erklärung für das Laufverhalten des PCR Produktes. Um die Länge der Deletion mit Sicherheit bestimmen zu können, wurde eine Klonierung (Abb. 13 B+C) durchgeführt.

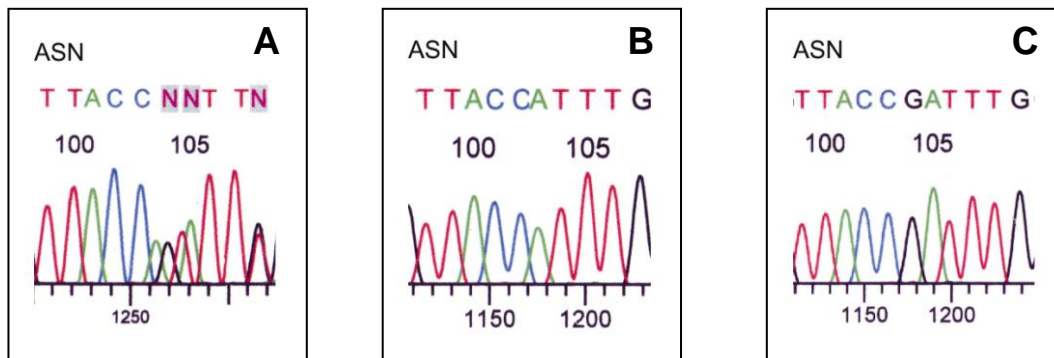


Abb. 13: Ausschnitte der Sequenzanalyse des Patienten Nr. 08 (A), des klonierten mutierten Allels (B), des klonierten wt Allels (C)

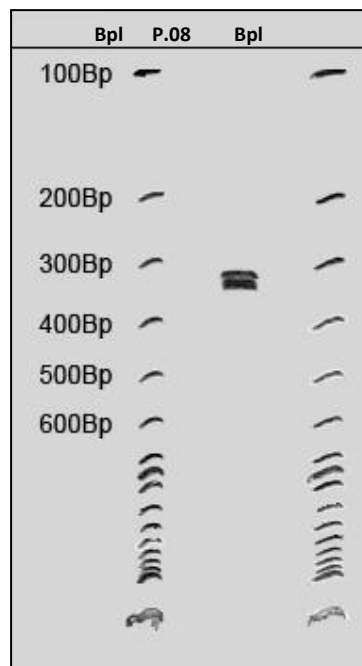


Abb. 14: PAGE des Exons 30 des Patienten Nr. 08 (P.08). Flankierend 100 Bp Leiter (BspI)

3.1.9 c.4176T>A p.L1392Q Patient Nr. 09

Patient Nr. 09 wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht, beide Untersuchungen fanden während einer Schwangerschaft statt. Die erste Blutentnahme erfolgte in der 32. Schwangerschaftswoche, die zweite ca. zwei Monate später am Ende des dritten Trimenons. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten bestand eine Verminderung des VWF:Ag und der VWF:CB (Tabelle 11). Die erste Multimeranalyse (Abb. 16A) zeigte alle Multimere des NP, die Tripletstruktur war schwach ausgeprägt und durch amorphes Material überlagert. Es wurde die Diagnose eines VWS Typ 2M mit verwaschener Multimerstruktur gestellt.

Die Zweituntersuchung (Abb. 16B) zeigte selbst bei niedriger Auflösung eine eindeutige Tripletstruktur und weniger amorphes Material als bei der Voruntersuchung.

Der Patient ist heterozygot für die Mutation CTG>CAG im Codon 1392 (c.4176T) (Abb. 15), die zum Einbau der AS Glutamin anstelle der AS Leucin führt (p.L1393Q). In derselben Abbildung ist auch der bekannte AS Polymorphismus p.A1381T zu sehen.

Tabelle 11: Laborwerte des Patienten Nr. 09

Laborparameter	1.Wert	2.Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	38%	36%	50-160%
VWF:CB	39%	34%	50-250%

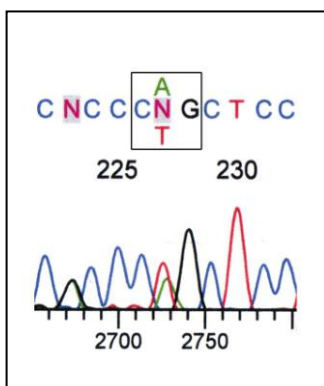


Abb. 15: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Patienten Nr. 09

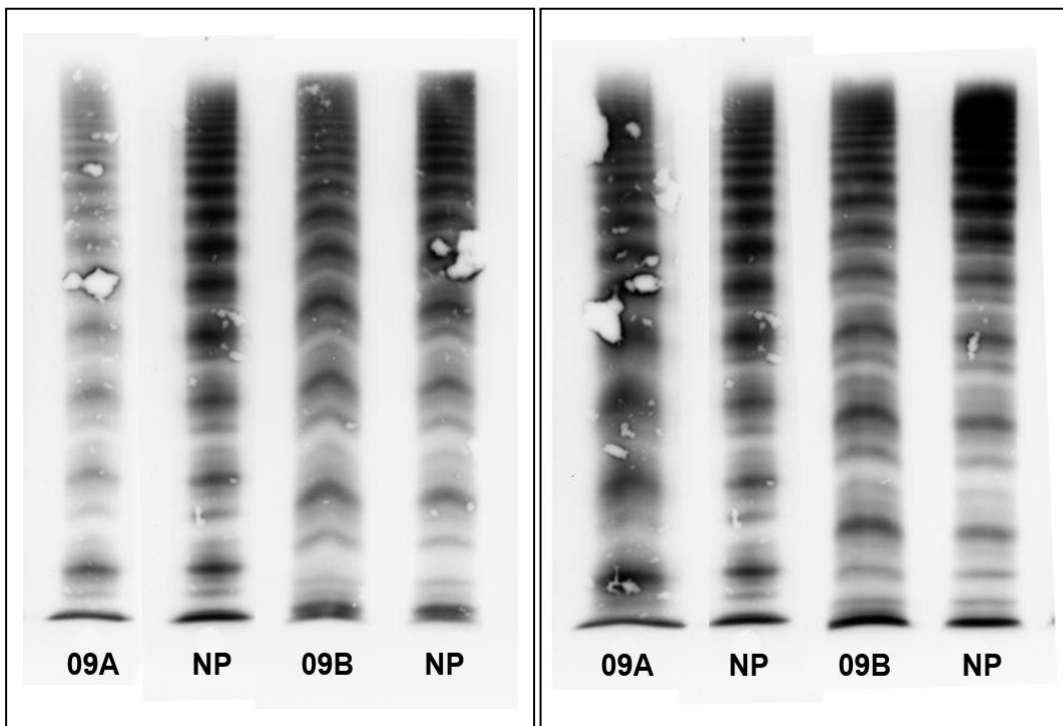


Abb. 16: Zwei Multimeranalysen (A/B) des Patienten Nr. 09 in Agarose Gelen mittlerer Auflösung (MRG) (Links) und niedriger Auflösung (LRG) (Rechts)

3.1.10 c.4195C>T p.R1399C Patient Nr. 10

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 10 liegen im Normbereich (Tabelle 12). Die Multimeranalyse zeigt alle Multimere des NP, eine Tripletstruktur ist jedoch nicht erkennbar, die Zentralbanden sind lediglich von amorphem Material umgeben (Abb. 17A). Der Patient ist heterozygot für die Mutation des Codons CGC>TGC im Codon 1399 (c.4195C>T), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Arginin führt (p.R1399C) (Abb. 17B).

Tabelle 12: Laborwerte des Patienten Nr. 10

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	94%	50-160%
VWF:CB	164%	50-250%

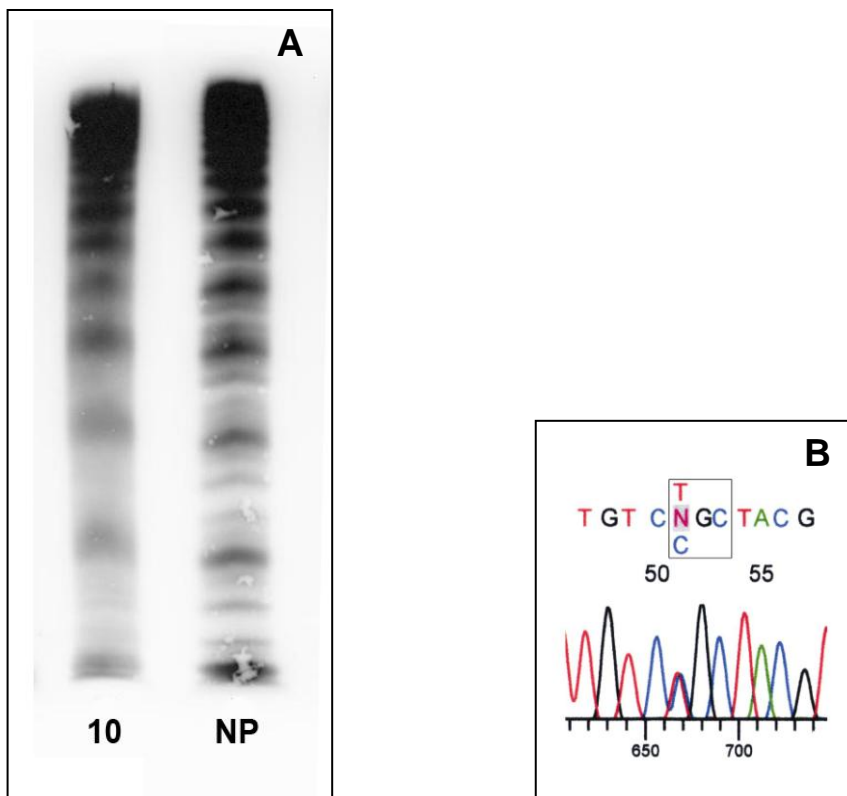


Abb. 17: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 10

3.1.11 c.4195C>T p.R1399C Patient Nr. 11

Die Werte für VWF:Ag und VWF:CB des Patienten Nr. 11 sind niedrig normal bzw. schwach erniedrigt (Tabelle 13). Die Multimeranalyse (Abb. 18A) zeigt alle Mutlimere des NP, die Tripletstruktur ist erkennbar, jedoch durch amorphes Material überlagert. In niedrigerer Auflösung war zusätzlich eine Abnahme zu den großen Multimere hin aufgefallen. Trotz der niedrigeren VWF:Ag und VWF:CB Werte liegt die Struktur der Multimere des Patienten Nr. 11 näher an der des NP als die des Patienten Nr. 10. Bei diesem Patienten liegt wie bei Patient Nr. 10 die Mutation c.4195C>T, p.R1399C vor (Abb. 18B).

Tabelle 13: Laborwerte des Patienten Nr. 11

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	62%	50-160%
VWF:CB	48%	50-250%

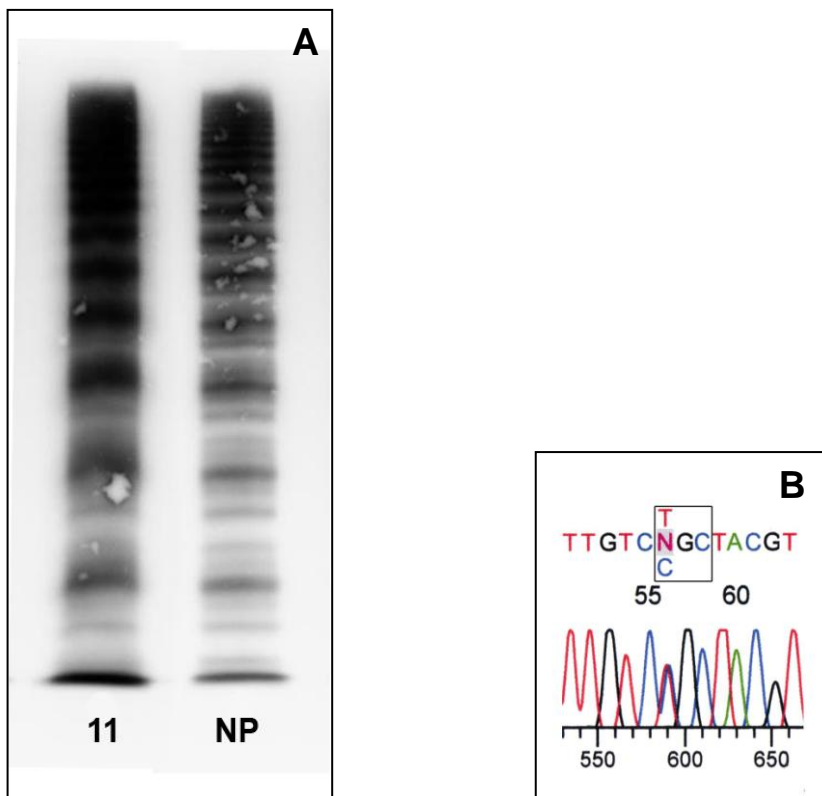


Abb. 18: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 11

3.1.12 c.4751A>G p.Y1584C + c.2435delC fs.842x Patient Nr. 12

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 12 sind erniedrigt (Tabelle 15). Die Multimeranalyse (Abb. 19A) zeigt ein Fehlen der größten Multimere des NP, die Tripletstruktur ist nur schwach ausgeprägt und durch amorphes Material überlagert. Der Patient ist compound-heterozygot für die Mutation TAC>TGC im Codon 1584 (c.4751A>G) (Abb. 19B), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Tyrosin führt (p.Y1584C) und eine Einbasendeletion im Exon 18 (c.2435delC fs. 842x) (Abb. 20B), die zu einer Leserasterverschiebung und dem Entstehen eines TGA Stopp-Codons an Position 842 führt. Diese Leserasterverschiebung bewirkt die Entstehung einer neuen Restriktionsschnittstelle für *Bgl*I.

Tabelle 14: Laborwerte des Patienten Nr. 12

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	15%	50-160%
VWF:CB	11%	50-250%

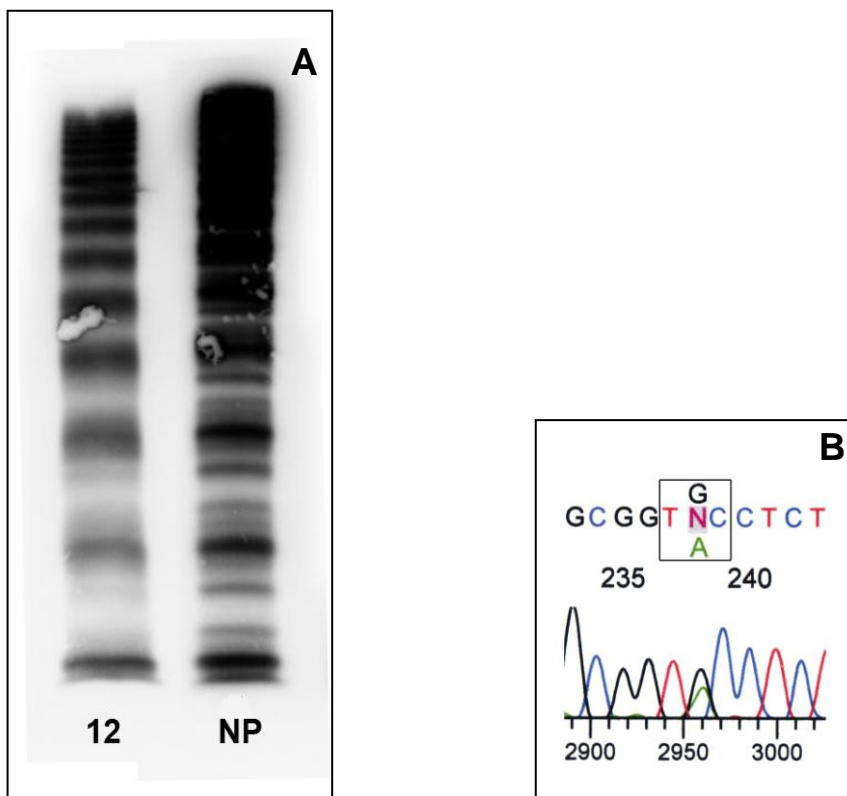


Abb. 19: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 12

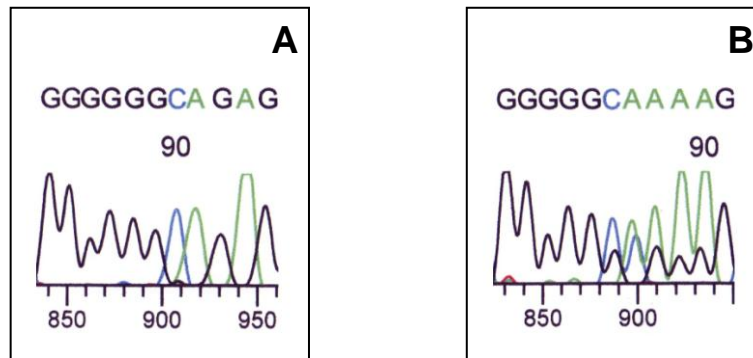


Abb. 20: Ausschnitt der Sequenz des Exon 18 wt (A) und der Sequenzanalyse Exon 18 des Patienten Nr. 12 (B)

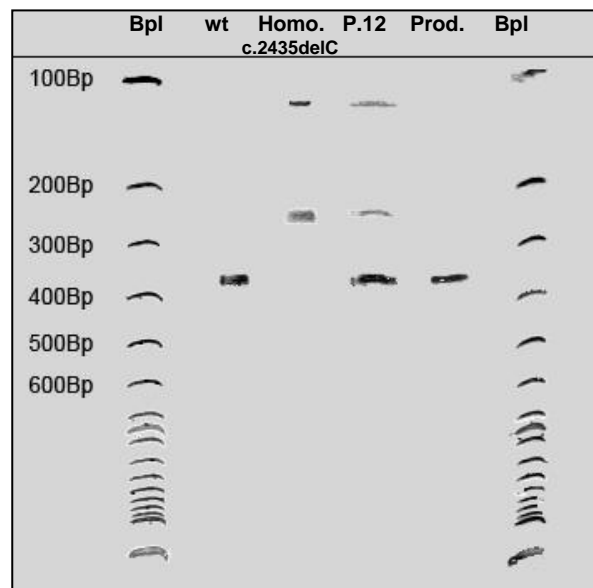


Abb. 21: PAGE mit Restriktionsfragment-Längen des Exons 18 nach *BglI*-Verdau: Von links nach rechts: Wildtyp (wt), c.2435CdelC homozygot (homo. c.2435delC), Patient Nr. 12 entsprechend c.2453delC heterozygot (P.12). Ganz rechts unverdautes PCR-Produkt (Prod.). Flankierend 100 Bp Leitern (Bpl).

3.1.13 c.6769T>C p.C2257R Familie F2

Die Parameter für VWF:Ag und VWF:CB der Familie F2 waren nur bei der Mutter (F2/P2) niedrig normal und somit auffällig (Tabelle 15, Abb 22), aus diesem Grund wurde nur sie molekulargenetisch untersucht. Die Werte für VWF:Ag und VWF:CB der übrigen drei untersuchten Familienmitglieder waren normal, jedoch beim Sohn (F2/P3) am niedrigsten (Tabelle 17). Die Multimeranalyse (Abb. 22) zeigte bei den Patienten F2/P2 und F2/P3 alle Multimere des NP, jedoch ist die Tripletstruktur nicht zu erkennen. Lediglich amorphes Material umgibt die Zentralbanden. Es finden sich zudem supranormale Multimere. Die Multimere des Vaters (F2/P1) und des zweiten Kindes (F2/P4) sind ohne pathologischen Befund.

Der Patient F2/P2 ist heterozygot für die Mutation TGC>CGC im Codon 2257 (c.6769T>C), die zum Einbau der AS Arginin anstelle der AS Cystein führt (p.C2257R) (Abb. 23). Aufgrund der Multimeranalyse des Sohnes (F2/P3) besteht der Verdacht, dass bei ihm die gleiche Mutation vorliegt (Abb 24).

Tabelle 15: Laborwerte des Patienten F2/P3

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	87%	50-160%
VWF:CB	84%	50-250%

Tabelle 16: Laborwerte des Patienten F2/P2

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	52%	50-160%
VWF:CB	55%	50-250%

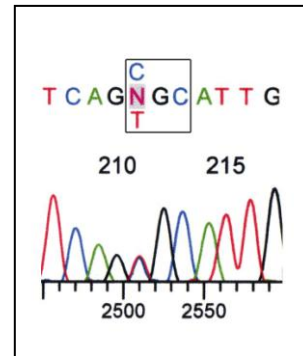
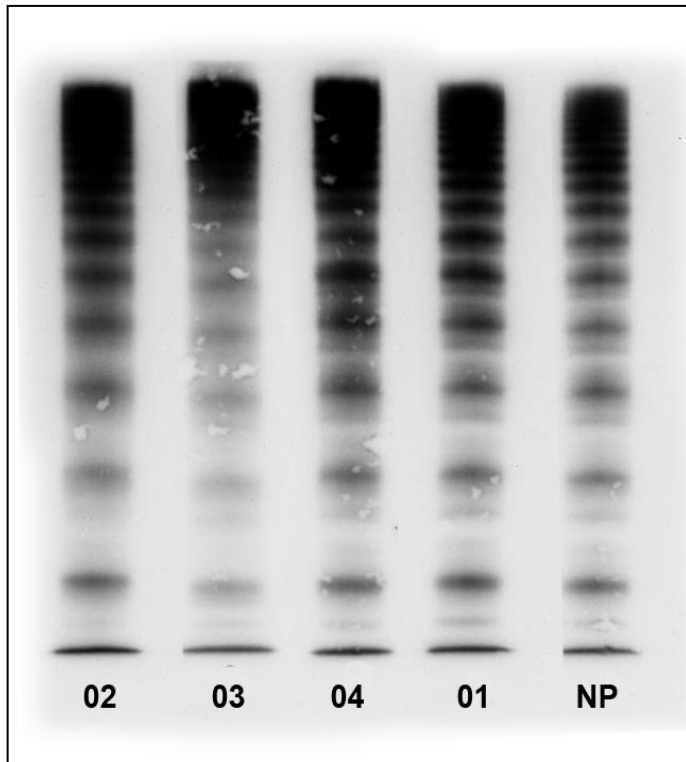


Abb. 23: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Patienten F2/P2

Abb. 22: Multimeranalyse der Familie F2

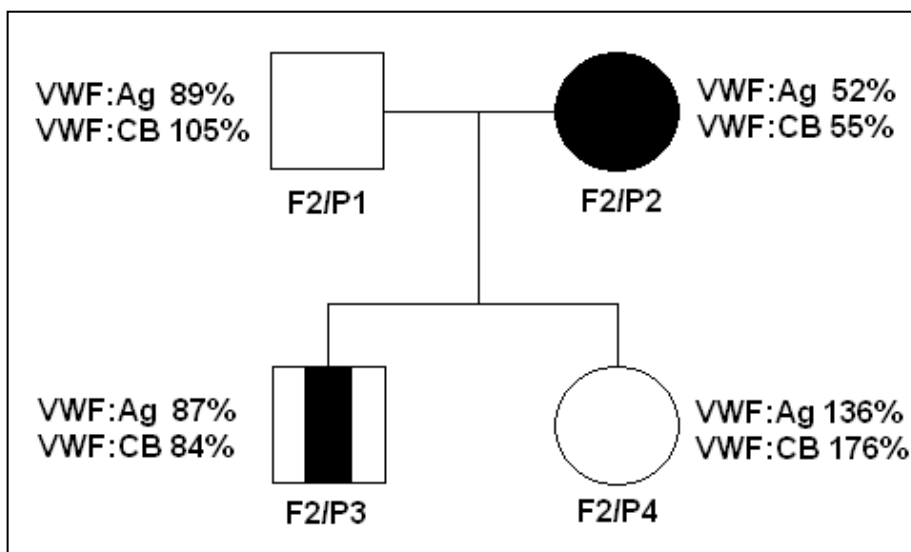


Abb. 24: Stammbaum der Familie F2.

F2/P2 zeigt den auffälligsten Phänotyp, ist heterozygote Mutationsträgerin und das einzige Familienmitglied bei dem eine Sequenzanalyse durchgeführt wurde. F2/P3 könnte dem Befund der Multimeranalyse nach, trotz seines unauffälligeren Phänotyps, Träger der gleichen Mutation sein. Die übrigen beiden untersuchten Familienmitglieder sind phänotypisch unauffällig und wahrscheinlich auch genotypisch gesund.

3.1.14 c.6911G>A p.C2304Y Patient Nr. 13

Von Patienten Nr. 13 liegen zwei umfangreiche Laborbefunde vor (Tabelle 18,19); erst der zweite ist pathologisch: VWF:Ag und VWF:CB sowie die FVIII Aktivität sind leicht erniedrigt. Ein Gplb-Bindungsdefekt lässt sich trotz umfangreicher Untersuchungen nicht mit Sicherheit bestätigen, da die Thrombozytenaggregation im Gegensatz zum ersten Befund bei der Zweituntersuchung unauffällig war. Die Thrombozytenaggregationen mit Kollagen, Arachidonsäure, Ristocetin sowie Adrenalin+ADP waren bei beiden Untersuchungen unauffällig. Die Multimeranalyse zeigte bei der Erstuntersuchung ein normales Multimermuster (Abb. 25A). Erst bei der Zweituntersuchung (Abb. 25B) war die Tripletstruktur nur schwach ausgeprägt und durch amorphes Material überlagert. Es wurde ein Typ 2M mit verwaschener Multimerstruktur diagnostiziert. Zusätzlich spricht eine deutliche Verminderung der Subbanden für einen Gplb-Bindungsdefekt.

Der Patient ist heterozygot für die Mutation TGT>TAT, im Codon 2304 (c.6911G>A) (Abb. 26), die zum Einbau der AS Tyrosin anstelle der AS Cystein führt (p.C2304Y).

Tabelle 17: Laborwerte des Patienten Nr. 13

Laborparameter	Befund 7.06.05	Befund 18.08.05	Referenzbereich
VWF:Ag	54%	46%	50-160%
VWF:CB	61%	47%	50-250%
F VIII Aktivität	82%	59%	60-130%
Thrombozyten in Citrat- ; Edta- Blut	243/nl	280; 310/nl	130-350/nl

Tabelle 18: Laboruntersuchung der Thrombozyten des Patienten Nr. 13.

Thrombozytenaggregation:	Befund 7.06.05	Befund 18.08.05
Adrenalin (8µM)	nicht auslösbar	Unauffällig
ADP (2µM/)	schwach u. reversibel	Unauffällig
ATP Sekretion nach Stimulation	Befund 7.06.05	Befund 18.08.05
Thrombin (1E/ml)		21,1nmol/10e9 Thrombozyten
Kollagen (2µg/ml)		10,1 nmol/10e11 Thrombozyten

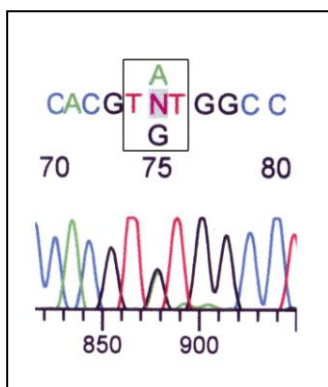


Abb. 25: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Patient Nr. 13

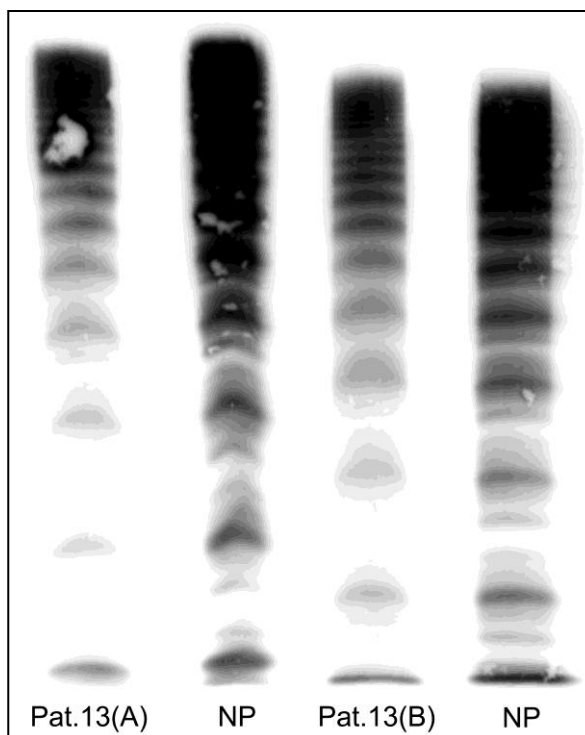


Abb. 26: Zwei Multimeranalysen des Patienten Nr. 13

3.1.15 c.7135C>T p.R2379C Patient Nr. 14

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 14 sind erniedrigt (Tabelle 19). Die Multimeranalyse (Abb. 27A+B) zeigt alle Multimere des NP, es findet sich jedoch eine leichte Abnahme zu den großen Multimeren hin. Zusätzlich finden sich supranormale Multimere, welche im Gel niedriger Auflösung besonders gut zu erkennen sind. Ebenfalls am besten im LRG zu erkennen ist die erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit der p.R2379C Multimere (Markierung), deren Tripletstruktur zwar schwach erkennbar, jedoch von amorphem Material überlagert ist. Der Patient ist homozygot oder hemizygot für die Mutation CGT>TGT im Codon 2379 (c.7135>CT) (Abb. 28B), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Arginin (p.R2379C) führt.

Tabelle 19: Laborwerte des Patienten Nr. 14

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	43%	50-160%
VWF:CB	42%	50-250%

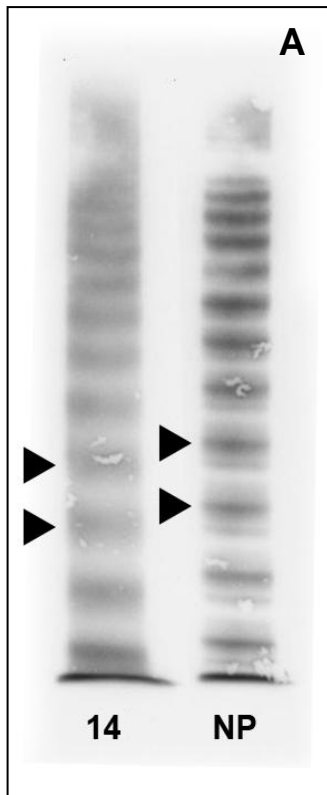


Abb. 27 Multimeranalysen LRG (A) und MRG (B) des Patienten Nr. 14

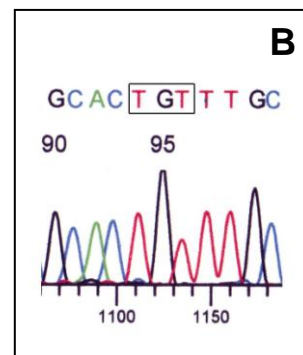
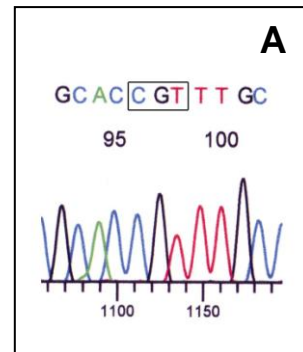
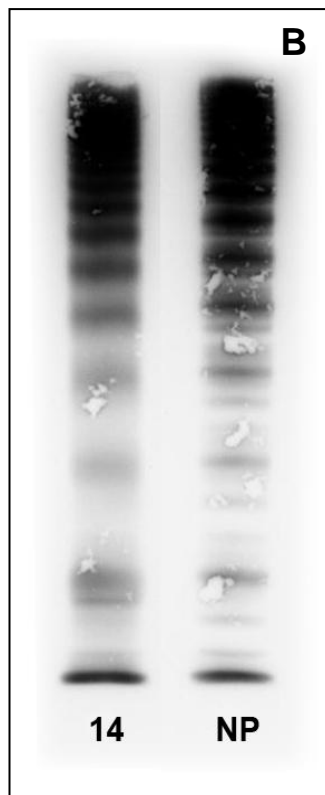


Abb. 28: Ausschnitte der Sequenz des wt (A) und der Sequenzanalyse des Patienten Nr. 14

3.1.16 c.7390C>T p.R2464C F1/P2+P3, Patient Nr. 15

Die Patienten P2 und P3 der Familie 1 wiesen bei der ersten Untersuchung normale Werte für VWF:Ag und VWF:CB auf (Tabelle 20,21). Die Zweituntersuchung, die nur bei der Mutter stattfand, erbrachte niedrig normale Werte für VWF:Ag und VWF:CB. Die Multimeranalyse (Abb 29A) zeigt bei beiden Patienten alle Multimere des NP, die Tripletstruktur fehlt, es findet sich lediglich amorphes Material zwischen den Zentralbanden. Zusätzlich fallen supranormale Multimere auf und das die Wanderungsgeschwindigkeit der individuellen Oligomere erhöht ist (Markierung).

Die Patienten F1/P2+P3 sind heterozygot für die Mutation von CGC>TGC im Codon 2464 (c.7390C>T) (Abb. 29B), die zum Einbau der AS Cystein anstelle der AS Arginin führt (p.R2464C).

Tabelle 20: Laborwerte des Patienten F2/P3

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	83%	50-160%
VWF:CB	113%	50-250%

Tabelle 21: Laborwerte des Patienten F2/P2

Laborparameter	2005	2006	Referenzbereich
VWF:Ag	80%	51%	50-160%
VWF:CB	87%	55%	50-250%

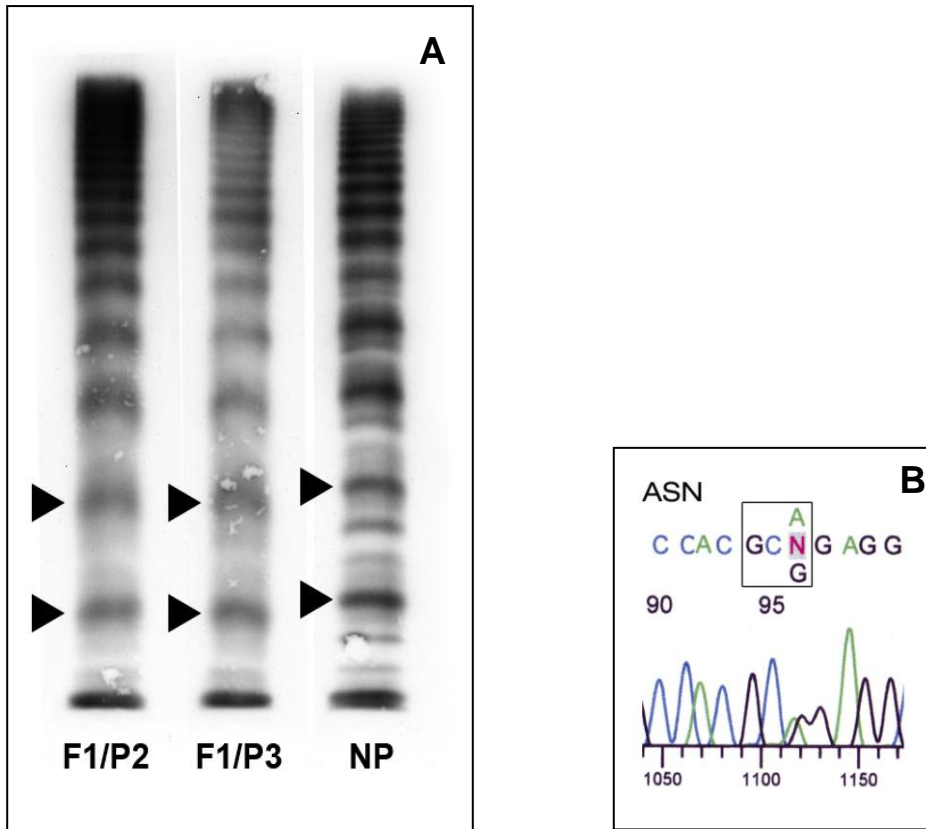


Abb. 29: Multimeranalysen von F2/P2+P3 (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B)

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Bei Patient 15 liegt ebenfalls die Mutation p.R2464C vor (Abb. 30B). Das VWF:Ag und die VWF:CB liegen bei diesem Patienten im Normbereich (Tabelle 22).

Die Multimeranalyse (Abb. 30A) zeigt alle Multimere des NP, die Tripletstruktur ist erkennbar, jedoch durch amorphes Material überlagert. Außerdem ist die Wanderungsgeschwindigkeit der individuellen Oligomere leicht erhöht (Markierung).

Tabelle 22: Laborwerte des Patienten Nr. 15

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	113%	50-160%
VWF:CB	101%	50-250%

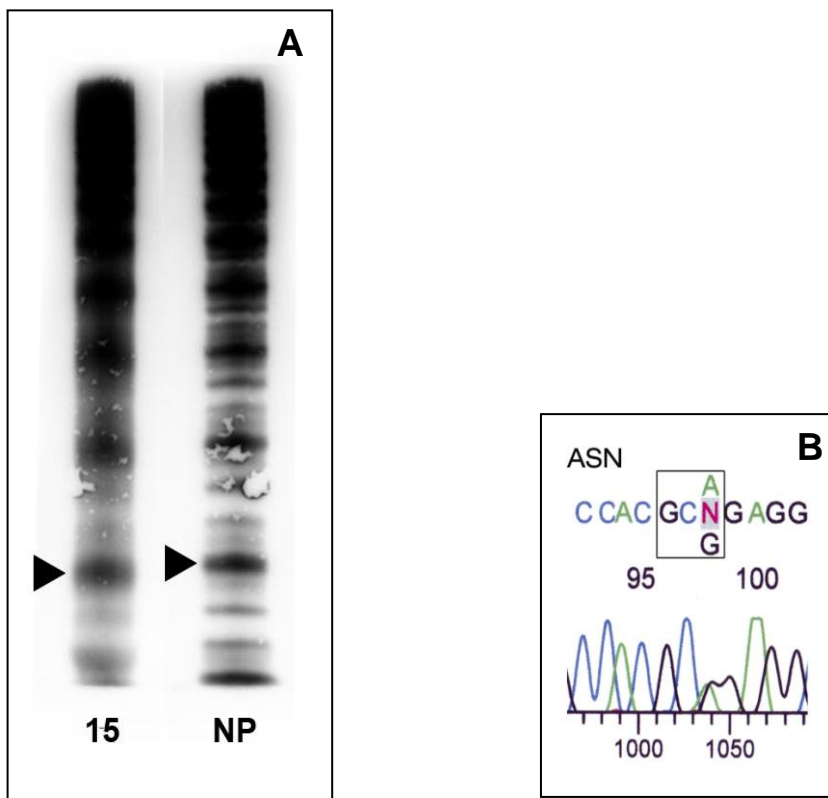


Abb. 30: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 15

3.1.17 c.8012G>A p.C2671Y Patient Nr. 16

Das VWF:Ag und die VWF:CB des Patienten Nr. 16 sind erniedrigt (Tabelle 23). Die zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Multimeranalysen zeigen das gleiche Bild: Alle Multimere des NP sind vorhanden, jedoch mit einer deutlichen Abnahme zu den großen Multimeren hin. Die Tripletstruktur der Oligomere ist sichtbar, aber durch amorphes Material überlagert. Zusätzlich fallen auch supranormale Multimere auf (Abb. 31A). Der Patient ist heterozygot für die Mutation TGT>TAT im Codon 2671 (c.8012G>A) (Abb. 31B), die zum Einbau der AS Tyrosin anstelle der AS Cystein führt (p.C2671Y). Bei der Tochter des Patienten wurde ein mildes VWS Typ 1 diagnostiziert.

Tabelle 23: Laborwerte des Patienten Nr. 16

Laborparameter	1.Wert	2.Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	14%	22%	50-160%
VWF:CB	12%	9%	50-250%

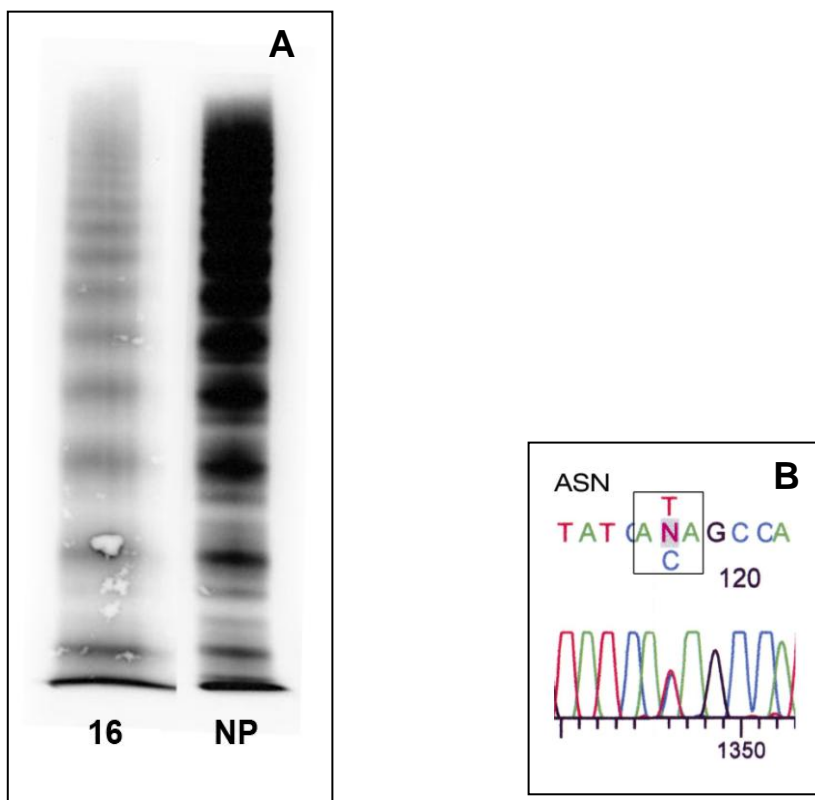


Abb. 31: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 16

3.2 Patienten ohne gefundene Mutationen

Bei allen drei Patienten, bei denen trotz Komplettssequenzierung keine Mutation identifiziert wurde, sind die Werte für VWF:Ag und VWF:CB erniedrigt (Tabelle 24, 25, 26).

Die Multimeranalysen des Patienten Nr. 17 (Abb. 32) zeigen alle Multimere des NP, die Tripletstruktur ist nicht erkennbar, stattdessen findet sich amorphes Material zwischen den Zentralbanden.

Die Multimeranalysen der Patienten Nr. 18 und Nr. 19 (Abb. 32) zeigen alle Multimere des NP, Patient Nr. 18 finden sich sogar supranormale Multimere. Die Tripletstruktur ist erkennbar, jedoch durch amorphes Material überlagert. Ein Typ 2M mit verwaschener Multimerstruktur wurde diagnostiziert. Allerdings waren die Veränderungen nur minimal.

Tabelle 24: Laborwerte des Patienten Nr. 17

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	23%	50-160%
VWF:CB	23%	50-250%

Tabelle 25: Laborwerte des Patienten Nr. 18

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	30%	50-160%
VWF:CB	27%	50-250%

Tabelle 26: Laborwerte des Patienten Nr. 19

Laborparameter	Wert	Referenzbereich
VWF:Ag	38%	50-160%
VWF:CB	36%	50-250%

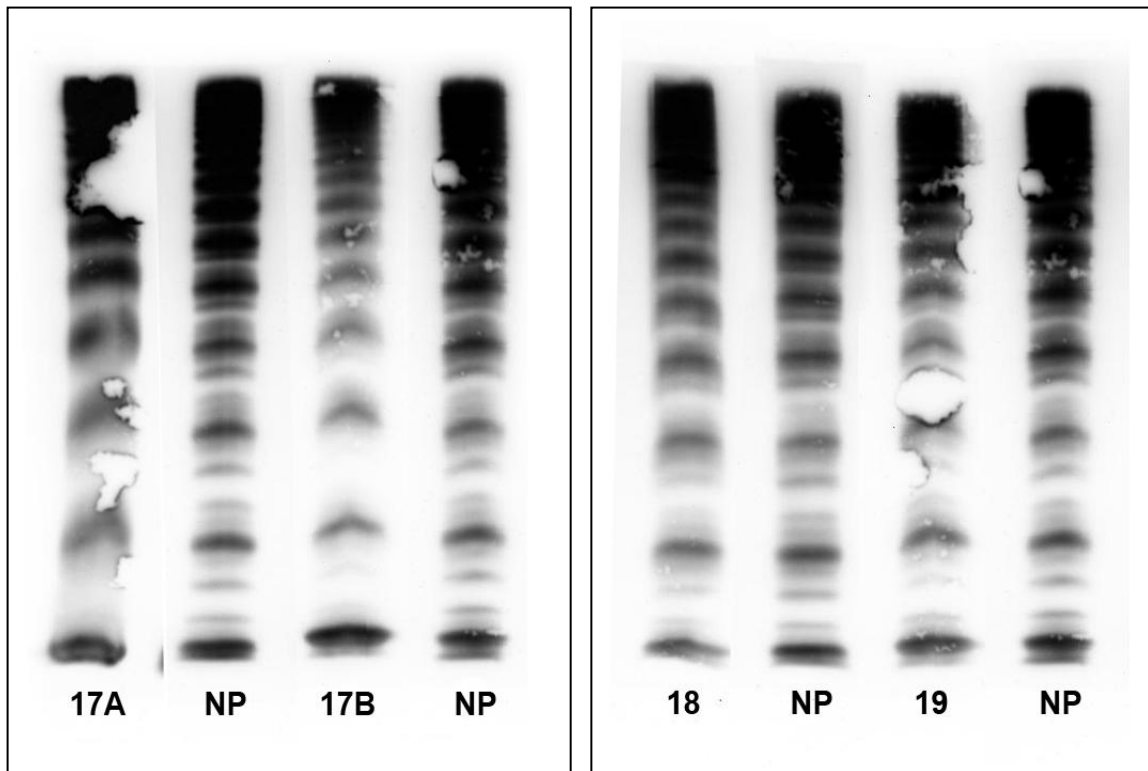


Abb. 32: Multimeranalysen der Patienten Nr 17, Nr. 18 und Nr. 19

3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei 19 von 22 Patienten wurden insgesamt 16 verschiedene Mutationen gefunden. In 18 Fällen handelte es sich dabei um heterozygote, in einem Fall um eine homozygote oder hemizygoten Punktmutation. Zwei Patienten waren compound-heterozygot für jeweils eine Punktmutation und eine Deletion einer Base.

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Tabelle 27: Pänotyp und Genotyp der Patienten

Die mit Nukleotid- und Aminosäureaustausch aufgeführten Mutationen sind ihrer Position im VWF Gen nach aufsteigend geordnet. Bei unterschiedlichen phänotypischen Parametern desselben Patienten sind Mindest- und Höchstwerte durch einen Bindestrich getrennt. In der vorletzten Spalte steht die im Labor von Prof. Dr. Budde anhand des Phänotyps vorgenommene Klassifikation. In der letzten Spalte sind Verweise auf bereits erschienene Publikationen zu der jeweiligen Mutation aufgelistet. Homozygote bzw. hemizygoten Mutationen sind unterstrichen. Die einzelnen nicht verwandten Patienten sind von 1 bis 19 durchnummeriert. Familien sind mit der Familiennummer, Familienmitglieder mit den Nummern eins für den Vater, zwei für die Mutter und einer fortlaufender Nummerierung in der Geburtsreihenfolge der Kinder gekennzeichnet. Thrombozytärer VWF und Thrombozytenzahl waren bei allen Patienten unauffällig.

Patient Nr.	VWF:Ag %	VWF:CB %	Nukleotid austausch	AS-Austausch	Dom.	Exon	Typ	Literatur
1	72	71	c.2278C>A	p.R760C	D2	17	2A	[92]
2	48	57	c.2279G>A	p.R760H	D2	17	2M	
3	16	10	c.3437A>G	p.Y1146C	D3	26	2A	[66]
4	23-30	14-21	c.3516G>A	p.G1172D	D3	26	2A(IIIE)	
5	23	15	c.3614G>H	p.R1205H	D3	27	2M	[96-103]
6	17	10	c.4120C>T	p.R1374C	A1	28.1	2M	[67,106,109,110,111]
7	23	15	c.4120C>T	p.R1374C	A1	28.1	2M	[67,106,109,110,111]
8	5	2	c.4120C>A	p.R1374S	A2	28.1	2A	
			c.5310delC	fs.1781X	A3	30		
9	36-38	34-39	c.4176T>A	p.L1392Q	A1	28.1	2M	
10	94	164	c.4195C>T	p.R1399C	A1	28.1	2M	
11	62	48	c.4195C>T	p.R1399C	A1	28.1	2M	
12	15	11	c.2435delC	fs.842X	D'	18	2M	[93,94,95]
			c.4751A>C	p.Y1584C	A1	28.2		[66,102,112,123]
F2P2	52	55	c.6769C>T	p.C2257R	D4	38	2A	
13	46-54	47-61	c.6911G>A	p.C2304Y	B1	40	2M	[66,116]
14	43	42	<u>c.7135C>T</u>	<u>p.R2379C</u>	B2	42	2A	[72]
F1P2	51-80	55-87	c.7390C>T	p.R2464C	C1	43	2M	[66,120]
F1P3	83	113	c.7390C>T	p.R2464C	C1	43	2M	[66,120]
15	113	101	c.7360C>T	p.R2464C	C1	43	2A	[66,120]
16	14-22	9-12	c.8012G>A	p.C2671Y	CK	49	2A	[77,87,123,124]
17	23	23	x	x	x	x	2A	
18	30	27	x	x	x	x	2M	
19	38	36	x	x	x	x	2M	

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

Ziel der Arbeit war die Suche nach einem generellen molekularen Mechanismus, welcher dem VWS mit verwaschener Multimerstruktur zugrunde liegt. Zuvor hatten die Reproduzierbarkeit der aberranten Multimere und ihre offensichtliche Vererbbarkeit bereits die Vermutung nahe gelegt, dass es sich nicht um ein präanalytisches Problem (Degradation durch Transport, Lagerung, Auftauvorgang bei eingefrorenen Proben) handeln würde. Tatsächlich konnten in 19 von 22 Fällen spezielle bereits publizierte (10 verschiedene) sowie unpublizierte Mutationen (7 verschiedene) identifiziert werden (siehe Tabelle 27). Die gefundenen Mutationen liegen über weite Teile des VWF Gens verstreut und betreffen unterschiedliche Domänen. Auffallend ist die große Zahl von Cysteinmutationen, d. h. Mutationen, bei denen entweder ein Cystein entfällt oder neu hinzukommt. Bei den Patienten in dieser Studie finden sich insgesamt 14 Cystein-Mutationen gegenüber 5 anderen Missense-Mutationen und 2 Einbasendeletionen.

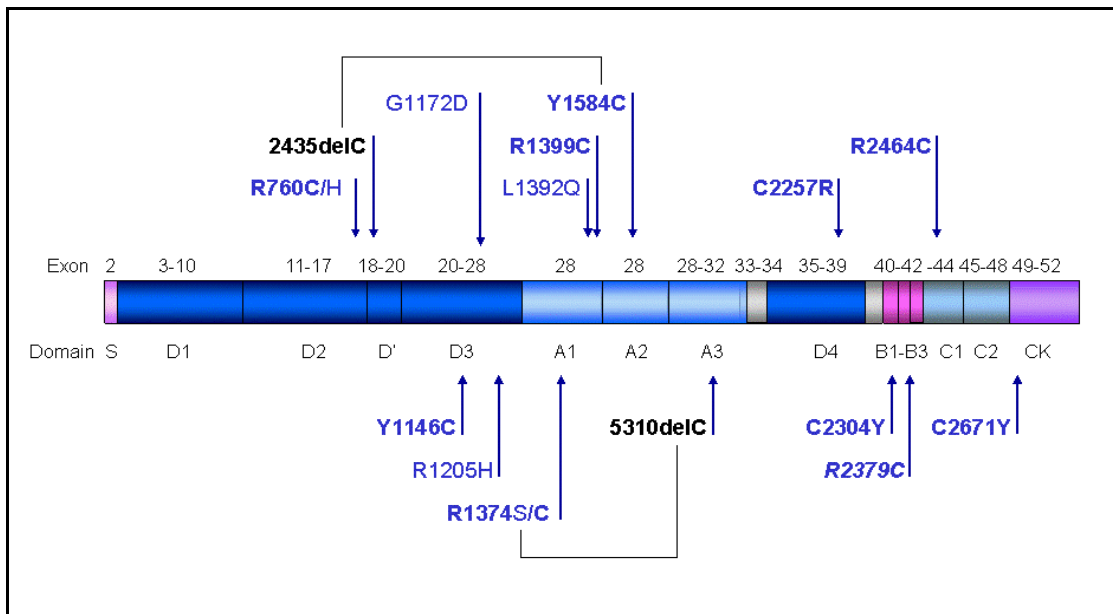


Abb. 33: Position der gefundenen Mutationen im VWF-Gen

In dieser Arbeit identifizierte Missense-Mutationen sind blau beschriftet, Cysteinmutationen sind fett blau beschriftet. Die Beschriftung der homozygoten Mutation ist kursiv. Die zwei gefundenen Einbasendeletionen sind fett schwarz beschriftet. Schwarze Verbindungslinien führen zur beim selben Patienten gefundenen Missense-Mutation.

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Von 15 unterschiedlichen missense Mutationen, handelt es sich bei 13 Mutationen um C-T- oder G-A-Austausche, 8 von ihnen liegen in den als Hotspot für Mutationen bekannten CpG Dinukleotiden [90]. Darunter 5 CG>TG- und 3 CG>CA-Austausche.

Im gesamten Protein befinden sich keine freien Sulfhydrylgruppen, da alle Cysteine des VWF an inter- oder intramolekularen Disulfidbrückenbildungen beteiligt sind [91]. Ein Cysteinverlust geht folglich mit dem Verlust einer physiologischen Disulfidbrückenbildung einher. Ein überzähliges Cystein kann bestehende Disulfidbrückenbindungen destabilisieren und unphysiologische Bindungen entstehen lassen. Vermutlich ergeben sich durch die veränderte Anzahl von Cysteinen eine oder sogar mehrere mögliche, vom Wildtyp (wt) abweichende Konformationen. Diese ergeben im Zusammenspiel mit der Proteolyse eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Fragmente, welche in der Elektrophorese nicht voneinander abgegrenzt werden können und ein verwaschenes Aussehen bewirken. Der Einfluss der Disulfidbrücken und damit der AS Cystein auf die VWF-Multimere konnte besonders deutlich bei den Mutationen p.C2257R und p.R2464C gezeigt werden. Hier führte eine Reduktion der Disulfidbrückenbindungen des rekombinanten mutanten VWF durch β -Mercaptoethanol zu einem mit dem wt übereinstimmenden Laufverhalten im Agarosegel (nicht Bestandteil dieser Arbeit).

Die Struktur des VWF reagiert empfindlich auf jegliche Veränderung von Anzahl und Positionen von Cysteinen. Die Auswirkungen von Strukturveränderungen sind sehr unterschiedlich und gehen u. a. mit einer Störung der Dimerisierung und der Multimerisierung sowie oft mit einer verminderten Sekretion und gelegentlich mit einer verkürzten Halbwertszeit im Blut einher.

Beispiele für Auswirkungen von Cysteinmutationen sind z.B. carboxyterminale Cysteinmutationen, die zu Dimerisierungsdefekten führen und Ursache des VWS Typ 2A Phänotyp IID sind [68, 69]. sowie aminoternale Cysteinmutationen, die zu Multimerisierungsdefekten und damit zu einem VWS 2A Phänotyp IIE [72,74] führen.

Beim VWS mit verwaschenen Multimeren handelt es sich um pathologisch konfigurierten VWF sowie konsekutiv aberrante VWF-Proteolysefragmente. Zusätzlich kommt es meist zu einem leichten bis merklichen Verlust großer Multimere. Je nach Schwere der Störung sind Subbanden und amorphes Material im Verhältnis zueinander unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies hängt mit dem Verhältnis von wt-VWF zu pathologischem VWF zusammen.

Mitverantwortlich für die verwaschene Struktur der Multimere, die offensichtlich nicht durch eine gesteigerte Proteolyse durch ADAMTS 13 hervorgerufen wird, könnten andere den VWF spaltende Enzyme wie z. B. Thrombospondin-1 sein. Thrombospondin-1, dessen genaue Funktion und Relation zu ADAMTS 13 noch ungeklärt ist, bindet in der A3-Domäne des VWF und spaltet Disulfidbrücken zwischen den Dimeren [57].

In unseren Expressionsstudien (nicht Bestandteil dieser Arbeit) zeigte sich, dass die verwaschene Multimerstruktur in den meisten Fällen schon vor der Proteolyse deutlich wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Proteolyse in vivo, vor allem durch ADAMTS13, das verwaschene Aussehen verstärkt.

4.2 Diskussion der Mutationen

4.2.1 Patient 01 c.2278C>T p.R760C

Die Mutation c.2527C>T p.R760C führt durch Veränderung der Furin cleavage site zur Persistenz des Pro-VWF und wurde 2003 in Italien bei zwei verwandten Patienten diagnostiziert [92]. Die Multimeranalyse dieser Patienten zeigte alle Multimere des Plasmapools, zusätzlich lagen hochmolekulare Multimere vor. Die Multimerisierung schien durch die Anwesenheit des Propeptids nicht wesentlich gestört zu sein, das Gesamtbild war jedoch verwaschen und die einzelnen Banden, vor allem die kleineren, schienen langsamer zu laufen als die des Normalplasmas. Daraus schlossen die Autoren auf eine Zunahme des Molekulargewichtes. Nach DDAVP-Infusion verstärkte sich dieser Eindruck. Des Weiteren zeigte sich im SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen die Persistenz von Pro-VWF. Die gemachten Beobachtungen konnten durch eine Expressionsstudie bestätigt werden, die auch zeigte, dass R760C in Coexpression mit

wt-VWF zu einer um 50 % verminderten Sekretion des VWF führt [92].

Casonato et al. [92] diagnostizierten aufgrund der verminderten FVIII-Bindung einen, durch p.R760C verursachten, neuen Typ 2N und schlugen wegen des persistierenden Propeptids die Zusatzbezeichnung 2P vor.

Bei unserem heterozygoten Patienten 01 zeigt sich neben den supranormalen Multimeren eine zweite hintere Subbande, die in Übereinstimmung mit der oben genannten Studie auf die Persistenz des Propeptids hinweist.

Bei Heterozygotie und Fehlen sonstiger Störungen werden mutanter VWF und wt-VWF im Rahmen der Polymerisierung zufällig in die wachsenden Multimere eingebaut. Je nach Anteil von wt und mutantem VWF entsteht eine Reihe unterschiedlicher Multimergrößen, die sich elektrophoretisch nicht mehr ausreichend auftrennen lassen. Dies ergibt das beobachtete Bild einer verwaschenen Multimerstruktur und erklärt den dominanten Erbgang.

Von meiner Kodoktorandin (Frau H. Eckert) durchgeführte Expressionstudien mit HEK239-Zellen (nicht Bestandteil dieser Arbeit) bestätigten die Persistenz des Propeptids. Bei Co-expression mit wt-VWF zeigte sich eine Aufspaltung der Zentralbande in mehrere Einzelbanden. Es ist davon auszugehen, dass nach Proteolyse durch ADAMTS13 oder andere unspezifische Proteasen aus den eng benachbarten Einzelbanden ein verwaschenes Multimermuster entsteht.

4.2.2 c.G2279A p.R760H

Die Mutation p.R760H an der Position -4 vor der Schnittstelle zwischen Propeptid und reifem VWF und konnte bisher nicht einem bereits bekannten Typ des VWS zugeordnet werden. Montgomery et al. haben laut ISTH-SSC VWF Online Database (www.vwf.group.shef.ac.uk/) diese Mutation gefunden und Expressionsstudien durchgeführt, jedoch noch keine Ergebnisse publiziert.

Bei Patient 02 finden sich ebenfalls supranormale Multimere. Die Mutation p.R760H zerstört ebenso wie p.R760C die Furin Cleavage Site. Es ist daher ein analoger molekularer Mechanismus anzunehmen.

Auch in diesem Fall bewies eine mit HEK 239 Zellen am UKE durchgeführte Expressionsstudie (nicht Bestandteil dieser Arbeit) die Persistenz des Propeptids und das Entstehen multipler Einzelbanden anstelle einer Zentralbande.

4.2.3 c.2435delC fs.842x

Drei Arbeitsgruppen haben die Leseraster-Mutation c.2435delC im Exon 18 im Zusammenhang mit einem schweren VWS Typ 3 beschrieben [93, 94, 95]. Es ist die häufigste Typ 3-Mutation in Schweden, Deutschland, Polen und Ungarn und findet sich nur selten in anderen Ländern. Heterozygote Träger wie dieser Patient weisen erniedrigte VWF-Werte, aber nur sehr selten eine Blutungsneigung auf. c.2435delC führt durch einen vorzeitigen Strangabbruch zu einem Null-Allel. In dieser Untersuchung wurde c.2435delC compound-heterozygot mit der Mutation c.5741A>C p.Y1584C gefunden (siehe dort).

4.2.4 c.3437A>G p.Y1146C

Diese Cysteinmutation liegt in der für die Multimerisierung wichtigen D3-Domäne. Ein Multimerisierungsdefekt durch p.Y1146C könnte zu einer Verminderung großer Multimere führen und den Typ 2A-Phänotyp des Patienten 13 erklären. P.Y1146C wurde in Kombination mit p.S1378F schon zuvor bei einem Patienten mit ähnlich niedrigem VWF:Ag und niedriger VWF:CB sowie pathologischen Multimeren beobachtet [66]. Es ist eine häufige Mutation bei einer Sonderform des VWS Typ 2A (Schneppenheim, unveröffentlicht).

4.2.5 c.3515G>A p.G1172D

Diese in der D3-Domäne gelegene Mutation ist noch unpubliziert, stimmt jedoch bezüglich des Codons mit einer im hiesigen Labor identifizierten weiteren Mutation c.3514G>T p.G1172C bei einem durch Multimerisierungsstörung bedingten Typ 2A überein. Eine Expressionsstudie (nicht Bestandteil dieser Arbeit) zeigte bei Heterozygotie eine VWF:Ag-Konzentration von 61 % des wt, während die Konzentration im Zelllysate 122 % des wt betrug. Dies beweist eine durch p.G1172D bewirkte deutliche intrazelluläre Retention. Interessant ist dabei, dass VWF:GpIb in Medium und Lysat 34 % und 41 % des wt betragen, also

nicht in demselben Maße voneinander abweichen wie die VWF:Ag-Konzentrationen.

Die verminderte Gplb Bindung lässt sich folglich nicht allein durch die Retention der großen Multimere erklären. Ein zusätzlicher Funktionsverlust ist wahrscheinlich.

4.2.6 c.3614G>A p.R1205H

Diese in der D3-Domäne gelegene Mutation wird dem 1988 erstmalig beschriebenen, ehemals als 2M klassifizierten Typ 1 (Vicenza) zugeordnet [96, 97]. Die Diagnose eines Typ 1 (Vicenza) beruht auf dem Nachweis supranormaler Multimere [96], einem dominanten Erbgang [96], beschleunigter Clearance des VWF [98, 99], niedriger bis normaler RIPA [96, 97, 100] und stark erniedrigtem Plasma-VWF bei normalem thrombozytärem VWF [100]. Im Gegensatz zu dem bei diesem Patienten erhobenen Befund steht die Aussage einer Arbeitsgruppe, nach der die Gplb- und die Kollagenbindungskapazität des VWF von dieser Mutation unbeeinträchtigt bleiben [98].

Die Mutation p.R1205H kam bei den Patienten der ursprünglichen italienischen Arbeit in Kombination mit der Mutation p.M740I im Exon 17 [101] vor.

Bei den meisten anderen mit Typ Vicenza diagnostizierten Patienten [102], wie auch in diesem Fall, wurde p.M740I nicht gefunden. Laut NCBI Datenbank dbSNP: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp [Stand 23.03.2010 10:00Uhr] entspricht p.M740I einem Polymorphismus. Die beim Typ Vicenza beobachteten hochmolekularen Multimere konnten mit und ohne p.M740I nicht immer bestätigt werden [101]. Unter anderem dieser Umstand führte, wie bei der ersten Publikation auch, zu einer Klassifizierung als Typ 1 [102, 103, 104, 97].

Die Diagnose anhand der Multimeranalyse wird durch den Umstand verkompliziert, dass auch andere Mutationen mit supranormalen Multimeren einhergehen können. Eine Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass die Multimeranalyse zur Diagnostik des Typ Vicenza ungeeignet und eine molekulargenetische Analyse indiziert sei [103].

Eine durch die Mutation p.R1205H beschleunigte Clearance des VWF in vivo wurde durch ein elegantes Mausmodell nachgewiesen [98]. Von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die beschleunigte Clearance als ursächlich

für die supranormalen Multimere des p.R1205H-VWF anzusehen ist: Die frisch aus Weibel-Palade-Bodies sezernierten und noch weitgehend unproteolysierten hochmolekularen Multimere sind im Vergleich mit dem durch Clearance insgesamt verminderten VWF überproportional stark vertreten und scheinen supranormal zu sein [105].

Letztere These zur Erklärung der supranormalen Multimere beim Typ1 Vicenza setzte sich schließlich durch. Ein verwaschenes Aussehen der Multimere ist bisher noch nicht berichtet worden. Der Mechanismus ist unklar, da die verkürzte VWF-Clearance der Mutante p.R1205H alleine nach den bisherigen Beobachtungen im hiesigen Labor nicht mit einer verwaschenen Multimerstruktur einhergeht.

4.2.7 c.4120C>T p.R1374C; c.4120C>A p.R1374S

Das für die AS R1374 kodierende Basentriplet scheint für Mutationen empfänglich zu sein. Unter den Patienten dieser Studie fanden sich drei Patienten mit zwei verschiedenen Mutationen an dieser Stelle. Beschrieben wurden außerdem Mutationen zu Histidin [106] und zu Leucin [107, 108].

p.R1374C

Diese Mutation wurde erstmals 1993 in Kolumbien mit einem VWS dominanten Erbganges in Zusammenhang gebracht [109].

Eine 1995 publizierte Arbeit [106] berichtet über einen quantitativen Defekt mit verringerter plättchenabhängigen Funktion sowie pathologischen Multimeren mit verwaschener Struktur, aber normalen Proteolysefragmenten. Dabei wurden die verwaschenen Banden durch Expressionsstudien mit rekombinantem p.R1374C-VWF bestätigt.

Auch später wurde über p.R1374C bei Typ 2M [67, 110, 111] mit verwaschener Struktur [67, 111] berichtet.

Da p.R1374C sowohl qualitative als auch quantitative Abweichungen verursacht, wurde diese Mutation auch als Typ 1 klassifiziert [67, 110]. Einige Autoren schlugen vor, Typ 2A und 2M als Typen mit verringerter plättchenabhängiger Funktion zusammenzufassen und nicht zwischen fehlen-

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

den großen Multimeren (Typ 2A) und vorhandenen großen Multimeren (Typ 2M) zu unterscheiden [67]. Die Klassifikation als „Typ 2M“ oder „Typ 2 unklassifiziert“ scheint trotz der pathologischen Multimere im Hinblick auf die veränderte Funktion eher zuzutreffen [110, 67, 111].

Eine durch diese Mutation entstehende ungepaarte Thiolgruppe in der A1-Domäne könnte zu einer Konformationsänderung des VWF führen [110, 106] und als Ursache für die verminderte Gplb-Bindung angesehen werden. Jedoch ist die Gplb-Bindung bei rekombinantem 1374H-, 1374C- [106] und 1374S-VWF ähnlich, was eine Störung durch die ungepaarte Thiolgruppe allein unwahrscheinlich erscheinen lässt [106].

Eine Arbeitsgruppe um Casonato [111] stellte fest, dass sich die verminderte Kollagenbindung zusammen mit dem verstärkten Auftreten der zuvor reduzierten großen Multimere nach DDAVP-Gabe normalisierte, die RIPA hingegen nur leicht angehoben wurde. Die Autoren schlossen daraus, dass pathologisches Multimermuster und verminderte Gplb-Bindung voneinander unabhängig seien. Die an gleicher Stelle gelegene Mutation p.R1374H wurde 1995 bei Patienten mit verringertem Anteil hochmolekularer Multimere beobachtet [106] und auch später zusammen mit typischen Typ 2A-Multimeren bei zuvor als Typ 1 klassifizierten Patienten gefunden [66].

Die in dieser Studie gemachten Beobachtungen stimmen mit denen der Publikationen überein. Voneinander abweichende Multimerbefunde bei gleicher Mutation können auf inter- und intraindividuelle Variationen, sowie auf Unterschiede in Labortechnik und Beurteilung der Multimere zurückgeführt werden. Gleiches gilt für den veränderten thrombozytären VWF, der in einer anderen Studie diagnostiziert wurde [106].

Im UKE durchgeführte Expressionsstudien (nicht Bestandteil dieser Arbeit) zeigten eine Retention des homozygot rekombinanten VWF in der Zelle mit einer VWF:Ag-Konzentration von 55 % des wt im Medium, aber 111% der wt-VWF:Ag Konzentration im Zelllysate. Die niedrige VWF:Gplb-Bindung von 30 %

des wt im Medium bestätigt die Diagnose eines VWS Typ 2 und steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

p.R1374S

Die noch unpublizierte Mutation p.R1374S trat zusammen mit c.5310delC bei einem Patienten dieser Studie auf, bei welchem ein VWS Typ 2A mit verwaschener Multimerstruktur diagnostiziert wurde. In den Expressionsstudien (nicht Bestandteil dieser Arbeit) führte p.R1374S zu noch niedrigerem VWF:Ag und niedrigerer VWF:CB, als andere Mutationen an dieser Stelle, sowie zum Verlust großer Multimere.

p.R1374 ist für die thrombozytäre Funktion des VWF von maßgeblicher Bedeutung. Alle bislang an dieser Stelle gefundenen Mutationen bewirken einen Funktionsverlust. Bei der Expression von 1374S und 1374C fällt auf, dass die VWF:GpIb-Bindung im Zelllysat noch geringer ausfällt als im Medium, was eine bevorzugte Retention des funktionsärmeren und strukturell anormaleren VWF vermuten lässt.

4.2.8 c.4176T>A p.L1392Q

Von Patient Nr. 09 liegen zwei Labor- und Multimeranalysen vor, die beide zu unterschiedlichen Zeitpunkten während einer Schwangerschaft durchgeführt wurden. Die erste Blutentnahme erfolgte in der 32 Schwangerschaftswoche, die zweite ca. zwei Monate später am Ende des dritten Trimenons. Bei annähernd gleichen und sogar etwas vermindertem VWF:Ag und VWF:CB findet sich bei der zweiten Untersuchung weniger amorphes Material und eine eindeutige Tripletstruktur. Der Zusammenhang zwischen der noch unpublizierten und nicht in der ISTH-SSC VWF Online Database geführten Mutation p.L1392Q und dem Phänotyp des Patienten konnte nicht geklärt werden. Trotz der Sequenzierung der gesamten kodierenden DNA konnte keine weitere Mutation gefunden werden.

Es liegen keine Daten, vor aus denen ersichtlich wäre, ob es sich im Falle dieses Patienten um eine physiologische Schwangerschaft handelte oder es zum

Beispiel zu Gestationshypertonie und Präeklampsie kam. Desweiteren wurden keine Untersuchungen zu Veränderung der VWF-Multimere während einer physiologischen Gravidität publiziert.

4.2.9 c.4195C>T p.R1399C

Diese laut ISTH-SSC VWF Online Database in Frankreich gefundene, aber unpublizierte Cysteinmutation liegt in der A1-Domäne und bewirkt eine verringerte Bindung des VWF an Gplb der Thrombozyten.

In Expressionsstudien (nicht Bestandteil dieser Arbeit) wurde der normale VWF:Ag-Plasmaspiegel des Patienten, sowohl für hetero- als auch für homozygot exprimierten p.R1399C VWF, in Medium und Zelllysate bestätigt. Im Gegensatz zur kaum nennenswerten Verminderung des VWF:Ag steht die intrazelluläre Retention funktionell gestörter VWF-Multimere: Die VWF:Gplb-Werte der homozygot exprimierten Mutante liegen im Medium bei 36 % und im Zelllysate bei 1 % des wt. Bei Co-Expression mit dem Wildtyp liegt die VWF:Gplb-Bindung im Medium bei 85 % und im Zelllysate bei 31 % des wt.

4.2.10 c.5741A>C p.Y1584C

Diese Mutation fanden wir bei einem compound-heterozygoten Patienten zusammen mit der häufigsten Typ 3 Mutation c.2435delC.

p.Y1584C [114] wird als häufigste Typ 1-Mutation angesehen [66] und scheint unterschiedlich penetrant zu sein [112, 113]. Ein verwaschenes Aussehen der Multimerstruktur ist noch nicht publiziert worden. Es existiert eine große Zahl von Publikationen zu p.1584C, die sich vor allem mit den Mechanismen beschäftigen, welche zu einer Verminderung des VWF:Ag durch diese Mutation führen.

Die Erstbeschreiber dieser Mutation [114] konnten bei in vitro Expressionsstudien eine durch intrazelluläre Retention verringerte VWF Sekretion von rekombinantem p.Y1584C-VWF im Vergleich zu rekombinantem wt-VWF feststellen.

Ein weiterer Mechanismus, der zu vermindertem VWF:Ag führt, besteht in leicht gesteigerter ADAMTS13-Proteolyse [102, 113] von 13 % bis 23 % gegenüber dem Wildtyp [113]. In diesen Studien blieb die Klassifizierung (Typ 1 oder Typ 2M [113]) allerdings unklar, da die Laborparameter zwischen den verschiedenen heterozygoten Patienten sowie zwischen den Zeitpunkten der Untersuchungen desselben Patienten variierten. Eine dieser Studien zeigte anhand einer Gruppe von 32 Indexpatienten eine Korrelation von 95 % mit der Blutgruppe 0 [102].

Eine britische Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass eine bei p.Y1584C im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Clearance ebenfalls zum verminderten VWF:Ag beiträgt [115].

Das sehr niedrige VWF:Ag des im Rahmen dieser Dissertation genotypisierten Patienten kann sowohl auf eine verringerte Expression des hemizygot vorliegenden p.Y1584C-VWF, als auch zum Teil auf eine gesteigerte Proteolyse oder Clearance zurückzuführen sein. Die fehlende Tripletstruktur sowie das amorphe Material zwischen den Banden entstehen durch strukturell pathologischen VWF und seine Proteolyseprodukte.

4.2.11 c.5310delC fs1781x

Diese Einbasendeletion ist bisher noch unpubliziert, sie führt zu einem Nullallel. Der Patient ist wahrscheinlich compound-heterozygot. Die Expression der bei ihm identifizierten zweiten Mutation p.R1374S (siehe dort) wäre damit analog zu einem Homozygotenstatus. Somit käme es, wie aufgrund des Phänotyps zu vermuten, zur alleinigen Expression des p.R1374S-Allels.

4.2.12 C.6796T>C p.C2257R

Die bislang unpublizierte Mutation p.C2257R liegt in der D4-Domäne. Goedeve et al. [58] fanden die Mutation p.C2257S als einzige Mutation bei einem Patienten mit pathologisch veränderten Multimeren, welche jedoch nicht genauer beschrieben wurden.

Von Frau Eckert durchgeführte Expressionsstudien (nicht Bestandteil dieser Arbeit) zeigten eine intrazelluläre Retention des VWF:Ag sowie eine Verminderung der VWF:GpIb-Bindung. Im Hinblick auf die Multimerstruktur des Patienten und im Gegensatz zu p.R1399C, p.R1774C sowie p.R1374S scheint es sich in diesem Fall um eine bevorzugte intrazelluläre Retention großer Multimere zu handeln. Die VWF:GpIb-Bindung des VWF im Zellysat liegt über der des VWF im Medium, dies ist bei Homozygotie besonders deutlich.

In HEK293-Zellen rekombinant exprimierter p.C2257R-VWF wandert auf dem SDS-Agarosegel schneller als rekombinanter wt-VWF, die Banden sind scharf begrenzt. Bei Co-Expression mit rekombinatem wt-VWF lässt sich die Differenz in der Wanderungsgeschwindigkeit nicht mehr erkennen, die Banden erscheinen verwaschen.

Anhand dieser Mutation lässt sich die Entstehung der verwaschenen Multimerstruktur besonders gut erläutern. Die Banden des rekombinanten p.C2257R-VWF erscheinen wahrscheinlich deshalb so scharf, weil nur eine einzige Konformation für diese Mutation möglich ist. Diese neue Faltung ist derart beschaffen, dass eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit aus ihr resultiert. In Kombination mit dem physiologisch konfigurierten VWF und durch Proteolyse in vivo ergibt sich eine Vielzahl unterschiedlich konfigurierter VWF-Multimere und Fragmente, die elektrophoretisch nicht mehr aufzutrennen sind. Dass die Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit von Disulfidbrückenbindungen abhängt, wurde durch die Reduktion sämtlicher Disulfidbrücken (nicht Bestandteil dieser Arbeit) in rekombinatem VWF bewiesen: Nach Reduktion ließ sich kein Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit mehr feststellen.

4.2.13 c.6911G>A p.C2304Y

p.C2304Y liegt in Exon 40 in der B1-Domäne und wurde bei Typ 1-Patienten beobachtet [66, 116]. Im Fall des Patienten 16 stellte sich die Klassifikation als schwierig heraus. Zwischen den beiden Untersuchungen veränderten sich sowohl die Multimerstruktur als auch das VWF:Ag und die Kollagenbindung, so

dass trotz unauffälliger RIPA nicht mehr wie zuvor ein milder Typ 1, sondern ein Typ 2M mit verringerter Gplb-Bindung und verwaschener Struktur diagnostiziert wurde.

Die Lokalisation dieser Mutation ist jedoch für einen Typ 2M eher untypisch, auch war die Gplb-Bindung des VWF des Patienten nicht eindeutig beeinträchtigt. Neben verminderter Gplb-Bindung käme durchaus eine verminderte Proteolyse aus anderen Gründen in Frage.

In unserem Labor von Herrn T. Obser durchgeführte Expressionsstudien zeigten, dass bei Homozygotie eine VWF:Ag-Konzentration von weniger als 1 % des wt im Medium vorliegt. Der VWF verlässt die Zelle nicht und findet sich entsprechend mit einer Konzentration von 107 % des wt im Lysat. Bei heterozygoter Expression fand sich im Medium eine immer noch deutlich verminderte VWF:Ag Konzentration von 19 % des wt.

Leider liegen weder Untersuchungen zur Gplb-Bindung noch Multimeranalysen vor, so dass sich über die Auswirkung von p.C2304Y nur spekulieren lässt.

Bei Betrachtung der nachbarschaftlichen wt-Aminosäuresequenz, in der das Cys2304 liegt, stellt man fest, dass es sich um das erste Cystein der Sequenz Cys-Gly-Leu-Cys handelt. Diese CGLC-Sequenzen kommen an unterschiedlichen Stellen des VWF vor und ähneln dem aktiven Zentrum von Disulfidisomerasen.

Eine Veränderung der Cysteine in der Prosequenz liegender CGLC-Sequenzen resultiert in einer Verhinderung der Multimerisierung [117]. Selbst wenn dieser Bereich keine enzymatische Aktivität innehaben sollte, so ist durch das ersetzte Cystein zumindest mit einer Konformationsänderung des VWF zu rechnen, die sowohl eine Verminderung großer Multimere als auch eine verminderte Proteolyse bewirken kann.

4.2.14 c.7135C>T p.R2379C Homozygot

Diese 2007 im Rahmen einer großen kanadischen Studie [118] erstbeschriebene Mutation ist in der B2-Domäne lokalisiert, einer Domäne, welcher bislang keine spezifische Funktion zugeordnet werden konnte.

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Ein Patient dieser Studie war homozygot für p.R2379C. Die Multimere seines Plasma-VWF wiesen in der Gelelektrophorese eine verwaschene Struktur auf und liefen schneller als die Multimere des Normalplasmas.

Eine italienische Arbeitsgruppe [119] publizierte einen Artikel zur ebenfalls in der B2 Domäne liegenden Mutation p.C2362Phe. Eine homozygote Patientin wies dramatisch niedrige Laborwerte für VWF:Ag und die VWF-Funktionen auf. Beide heterozygote Elternteile waren weniger stark betroffen. Die Multimeranalysen zeigten in niedrig auflösendem Agarosegel trotz einer Verminderung der großen Multimere eine verwaschene Spur, die sich bei allen Patienten bis zum Beginn des Gels hinzog.

Eine Analyse der durch Proteolyse entstehenden VWF-Bruchstücke, mit monoklonalen Antikörpern, zeigte bei Homozygotie ein Fehlen der ADAMTS13 spezifischen aminoterminalen (140KD) und carboxyterminalen (176 KD) Fragmente, sowie der im NP zu findenden Fragmente unbekannter Herkunft. Es zeigten sich allein das intakte Monomer mit 225 KD und ein 205 KD großes, vermutlich auf die Proteolyse durch ein anderes Enzym zurückzuführendes Fragment, welches im Vergleich zum NP betont war [119].

Bei Heterozygotie zeigte sich ein Mischbild aus NP und der homozygoten Form: Die normalen Proteolysefragmente des NP waren teilweise abgeschwächt, aber vorhanden, zusätzlich war das 205 KD Fragment betont [119].

Alle Angaben zum Molekulargewicht wurden aus der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit errechnet, die Diskrepanz zwischen 225 KD für das intakte Monomer und zwei ADAMTS13-Bruchstücken von 140 und 176 KD könne auf postproteolytische Konformationsänderungen zurückzuführen sein [119].

Dass der Einfluss dieser 17 AS voneinander entfernt liegenden Mutationen auf den VWF stark unterschiedlich ist, ist offensichtlich. Dennoch zeigen die im Zusammenhang mit p.C2362F gemachten Beobachtungen, dass

Cysteinmutationen in der B2-Region möglicherweise Auswirkungen auf die Proteolyse durch ADAMTS13 oder andere Enzyme haben könnten. Zumindest beeinflusst die Cysteinmutation p.R2379C die Konformation und damit das Laufverhalten der VWF-Multimere und ihrer Proteolyseprodukte.

4.2.15 c.7390C>T p.R2464C

Diese Mutation in der C1-Domäne wurde kürzlich im Zusammenhang mit einem unklassifizierten Typ 2 VWS mit verwaschenen Multimeren beschrieben und durch eine Expressionsstudie bestätigt. Ebenso wie im Fall der drei von mir untersuchten Patienten mit dieser Mutation fand sich eine Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Multimere, jedoch mit einem leichten Verlust großer Multimere [120].

Auch Goodeve et al [66] beobachteten p.2464C mit veränderten Multimeren.

Die in dieser Studie genotypisierten Patienten mit p.2464R wurden sowohl als Typ 2A als auch als Typ 2M klassifiziert, dies unterstreicht die Schwierigkeit der genauen Klassifikation des durch diese Mutation hervorgerufenen Bildes im SDS-Agarosegel.

Diese Mutation liegt in der Nachbarschaft der in der C2-Domäne gelegenen GpIb/IIIa-Bindungsstelle auf dem VWF, was eine verminderte thrombozytenabhängige Funktion des VWF vermuten lässt. Die VWF:GpIb ist mit 58.7 % des wt bei homozygotem p.R2464C erniedrigt, bei heterozygotem mit 108.4 % des wt jedoch normal. Im Zellysate findet sich im Vergleich ein starker Anstieg der VWF:GpIb-Bindung des homozygot mutierten VWF, während die VWF:GpIb des heterozygoten VWF sich kaum verändert. Da die VWF:Ag Konzentration in Medium und Lysat normal sind, könnte man auf eine intrazelluläre Retention vor allem der großer Multimere schließen. Diese Hypothese wird durch folgende Umstände gestützt: Zum einen durch die Lage dieser Mutation 349 AS vor dem carboxyterminalen Ende und zum anderen durch die Multimeranalyse, die eine Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit sowie einem Verlust an großen Multimeren zeigt.

Für p.R2464C gilt das Gleiche wie für p.C2257R: Rekombinanter p.R2464C wandert schneller als rekombinanter wt und bildet scharf begrenzte Banden. Bei Co-Expression bietet sich ein verwaschenes Bild. Reduzierte Disulfidbrücken führen zu einem mit dem wt übereinstimmendem Laufverhalten.

4.2.16 c.8012G>A p.C2671Y

Diese in der für die Dimerisierung wichtigen CK-Domäne liegende Mutation wurde 1998 erstbeschrieben [121].

In der Literatur fand sich eine Patientin mit VWS Typ 3, die compound-heterozygot für p.C2671Y und ein Nullallel war. Das VWF:Ag der Patientin lag an der unteren Nachweisbarkeitsgrenze, die Multimeranalyse zeigte eine starke Proteolyse mit Verlust an großen Multimeren. Ihr heterozygoter Vater hingegen hatte annähernd normale Multimere bei auf 47 % verringertem VWF:Ag, bei ihm wurde ein VWS Typ1 diagnostiziert. Zunächst wurde vermutet, dass ein durch die carboxyterminal gelegene Mutation verursachter Dimerisierungsdefekt vorläge und defekte Dimere größtenteils die Zelle nicht verlassen könnten [122]. Expressionsstudien einer weiteren Arbeitsgruppe zeigten jedoch eine 40% des wt entsprechende Konzentration von VWF im Medium rekombinanter Zellen, während bei gleichzeitigem Nullallel in vivo ein VWF:Ag-Wert von 2 % vorgelegen hatte [123].

Daraus folgerten die Autoren, dass diese Mutation eine beschleunigte Proteolyse und Clearance des VWF bewirke, während die Dimerisierung weitgehend unbeeinflusst bliebe. Die beschleunigte Clearance wäre durch eine gesteigerte Angreifbarkeit der entstehenden Dimere, etwa durch Thrombospondin 1 oder andere Disulfidbrücken spaltende Enzyme, zu erklären.

In einer weiteren Studie ging p.C2671Y mit angestiegenem VWF-Propeptid/VWF:Ag-Quotienten einher, zudem ging die VWF-Konzentration nach DDAVP-Gabe vier- bis fünfmal schneller als im normalen Plasma zurück. Wie auch für p.R1205H wurde für p.C2671Y eine beschleunigte Clearance in vivo am Mausmodell bewiesen [124].

Expressionsstudien unseres Labors (nicht Bestandteil dieser Arbeit) zeigten bei homozygot rekombinantem p.C2671Y-VWF eine VWF:Ag-Konzentration von 49 % des wt im Medium, während bei heterozygotem p.C2671Y VWF eine Konzentration von 89 % des wt im Medium vorlag. Die VWF:Ag Werte im Lysat übertrafen mit 111 % und 113 % die des wt. Die im Vergleich zum Medium im Lysat ebenfalls stark ansteigenden VWF:GpIb-Werte lassen im Hinblick auf die

Multimerstruktur des Patienten auf eine Retention vor allem großer Multimere schließen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen stimmen mit denen der oben genannten Gruppen überein. Durch beschleunigte Clearance ist das VWF:Ag im Plasma unseres heterozygoten Patienten stärker vermindert als im Medium homozygot rekombinanter Zellen. Zusätzlich findet eine intrazelluläre Retention statt. Die von uns diagnostizierte verwaschene Struktur der VWF-Multimere, konnte bei rekombinantem p.C2671Y bestätigt werden.

4.2.17 Patienten ohne Mutation

Bei drei Patienten konnte keine Mutation gefunden werden. Zwei mögliche Gründe hierfür sind zum einen das Fehlen einer Mutation auf dem VWF-Gen und zum anderen die technischen Grenzen der verwendeten Diagnostik. Da nur die Exons mit den flankierenden Intronabschnitten amplifiziert und sequenziert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Introns gelegene Mutationen oder größere Deletionen Auswirkungen auf den Transkriptionsvorgang haben.

Bei den drei Patienten könnte es sich jedoch auch um erworbene Veränderungen des VWF handeln, leider liegen bezüglich der Lebensumstände keine weiteren Daten zu diesen Patienten vor.

Auch ein Artefakt durch unsachgemäße Präanalytik käme durchaus auch als Grund für die erfolglose Mutationssuche in Betracht.

Abschließend lässt sich feststellen, dass es sich bei allen drei Patienten, bei denen keine Mutation gefunden werden konnte, um Patienten handelt, die ihrem Namen nach aus der Türkei oder dem westlichen Zentralasien stammen.

4.3 Abschließende Diskussion

Die verwaschene Struktur von VWF-Multimeren bei VWS hat ihre Ursache auf dem VWF-Gen.

Von 22 im Labor von Prof. Dr. med. Budde als Typ 2A oder 2M (sm) diagnostizierten Patienten fand sich nur bei 3 Patienten keine Mutation. Im Fall von Patient Nr. 18 und Nr. 19 ist die verwaschene Struktur jedoch schwach ausgeprägt und kann angezweifelt werden. Unter den 19 Patienten, die eine Mutation aufwiesen, fanden sich zwei Patienten mit Mutationen (p.R1205H, p.L1392Q), bei denen der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp nicht geklärt werden konnte. Bis auf bei zwei der gefundenen Mutationen ist bei allen Mutationen ein Cystein betroffen. Alle Mutationen führen außer zu einem verwaschenen Multimermuster auch zu lokalisationspezifischen Beeinträchtigungen der VWF-Funktion.

Die in dieser Arbeit eruierten genetischen Ursachen für die verwaschene Multimerstruktur können in drei Hauptgruppen unterteilt werden:

- Erste Gruppe: Die zwei im Codon 760 in der D2-Region liegenden Mutationen führen zur Persistenz des Propeptids. Die unphysiologischen Subbanden und ihre Proteolysefragmente verursachen zusammen mit dem vom normalen Allel kodierten VWF ein verwaschenes Bild.
- Zweite Gruppe: Cysteinmutationen, die zu mehreren verschiedenen Konfigurationen führen können und auf diese Weise auch bei Homozygoten ein verwaschenes Bild erzeugen.

Untergruppe: Cysteinmutationen, die nur zu einer abweichenden Konformation führen (p.C2257R, p.R2464C), bewirken heterozygot eine verwaschene Multimerstruktur.

- Dritte Gruppe: Auch einige wenige andere Missense-Mutationen scheinen in Ausnahmefällen zu pathologisch konfiguriertem VWF und somit zu einem verwaschenen Multimermuster zu führen. Dieser Gruppe gehörten unter den Patienten dieser Arbeit nur zwei Patienten an.

4.4 Zusammenfassung

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, welche Beziehungen zwischen VWF-Genotyp und der zunehmend beobachteten, verwaschenen Struktur der VWF-Multimere bei Patienten mit VWS Typ 2 bestehen.

Dies geschah durch ein Mutationsscreening des VWF-Gens von 22 Patienten, bei welchen ein VWS Typ 2 A oder 2 M mit verwaschener Multimerstruktur vorlag. Nach der Extraktion von DNA aus Leukozyten in Patientenblut wurde mittels PCR, PAGE und anschließender Sequenzierung nach Mutationen gesucht. Als kausale Mutationen fanden sich vor allem Cysteinmutationen, welche bei 15 von 22 Patienten vorkamen. Teilweise lagen bereits Publikationen vor, welche den Zusammenhang zwischen einigen in dieser Studie gefundenen Mutationen und verwaschenen VWF-Multimeren bestätigten.

Cysteinmutationen führen durch Veränderungen von Disulfidbrückenbindungen zu einer oder mehreren verschiedenen Konfigurationen des VWF, dies führt zu einem abweichenden Laufverhalten in der Gelelektrophorese. In Kombination mit wt-VWF und den in vivo entstehenden Proteolysefragmenten entsteht ein verwaschenes Aussehen der VWF-Multimere.

Zwei im Codon 760 in der D2-Region lokalisierte Mutationen führen zur Persistenz des Propeptids und über diesen Mechanismus zu einem verwaschenen Multimermuster.

In Ausnahmefällen scheinen auch andere Mutationen ein verwaschenes Multimermuster zu bedingen.

4.5 Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS13	A Disintegrin A nd M etalloproteinase with T hrombo S pondin 1 like elements 13
Ag	Antigen
AS	Aminosäure
ASN	Antisense
AT	Annealing temperature
Bp	Basepairs (Basenpaare)
Bpl	Basepair ladder
cAMP	cyclo Adenosin Monophosphat
CB	Collagen Binding
ccdB	Control of cell death B
CGLC	Disulfidisomerase-Konsensussequenz: Cystein-Glycin-Leucin-Cystein
CK-Domäne	Cystin Knot like Domäne
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (ADH-Analogon)
ddntp	2',3'Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFP	Fresh Frozen Plasma
FV	Gerinnungsfaktor V
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII
VWF:FVIII B	Gerinnungsfaktor VIII Bindungsaktivität (des von Willebrand-Faktors)
GpIb	Glykoprotein Ib (Rezeptor der Thrombozytenoberfläche)

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

GpIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa (Rezeptor der Thrombozytenoberfläche)
HLPC	High performance liquid chromatography
Kb	Kilo basepairs
KD	Kilo Dalton
LGT Agarose	Low gelling temperature Agarose
LRG	Low resolution gel
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
mRNA	messenger RNA
MRG	Medium resolution gel
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RIPA	Ristocetin-induzierte Plättchenagglutination
SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	Sense
SP	Signalpeptid
TAE	Trishydroxymethylaminomethan-Acatat-Ethylendiamidtetraessigsäure-Puffer
VWF	von Willebrand-Faktor
VWS	von Willebrand-Syndrom
VWF:Ag	VWF-Antigen
VWF:CB	Kollagen-Bindungsaktivität des VWF
VWF:GpIb	GpIb-Bindungsaktivität des VWF
VWF:RCo	Ristocetin-Cofaktor-Aktivität des VWF
VWD	von Willebrand Disease
WPB	Weibel-Palade bodies
wt	Wildtyp

5 Literaturverzeichnis

1. Rodeghiero F, Castaman G, Dinini E (1987) Epidemiological Investigation of the Prevalence of von Willebrand's Disease. *Blood* 69/2: 454-459
2. Holmberg L, Nilsson IM (1985) Von Willebrand disease. *Clin Haematol* 14: 461-488
3. von Willebrand EA (1926) Hereditär Pseudothrombophilie. *Finska Lakarsällskapetets Handl* 67: 7-112
4. Kehrer FA (1876) Die Hämophilie beim weiblichen Geschlechte. *Arch Gynäkol* 10: 14-237
5. von Willebrand E A, Jürgens R (1933) Über ein neues vererbbares Blutungsübel: die konstitutionelle Thrombopathie. *Dtsch Arch Klin Med* 175: 453-483
6. Alexander B, Goldstein R (1953) Dual hemostatic defect in pseudothrombophilia. *J Clin Invest* 32: 551
7. Quick AJ, Hussey CV (1953) Hemophilic condition in a girl. *Am j Dis Child* 85/6: 698-705
8. Cornu P, Larrieu MJ, Caen J, Bernard J (1963) Transfusion studies in von Willebrand's disease: Effect on bleeding time and factor VIII. *Br J Haematol* 9: 189-202
9. Nilsson IM, Blomback M, Jorpes E, Blomback B, Johansson SA (1957) Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction 1-0. *Acta med Scand* 159/3: 179-188
10. Nilsson IM, Cronberg S (1968) A severe haemorrhagic disorder with prolonged bleeding time due to a plasma defect but with normal factor VIII. *Acta med Scand* 184/3: 181-186
11. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE (1971) Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J Clin Invest* 50: 244-254

12. Hoyer LW (1981) The Factor VIII Complex: Structure and Function. *Blood* 58/1: 1-13
13. 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. *Biochem* 82: 6394-6398
14. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, Brown M, Morin MJ, Ling EH, Livingston DM (1985) Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: Authentication by a new method. *Cell* 41: 49-56
15. Ginsburg 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 localization. *Science* 228: 1401-1406
16. 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
17. Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Sahida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K (1986) Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochem* 25/11: 3171-3184
18. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD (1986) Involvement of Large Plasma von Willebrand Factor (vWF) Multimers and Unusually Large vWF Forms Derived from Endothelial Cells in Shear Stress-induced Platelet Aggregation. *J Clin Invest.* 78: 1456-1461
19. Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW (1977) Stabilization of Factor VIII in Plasma by the von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 60: 390-404
20. Mazzucato M, Spessotto P, Masotti A, De Appollonia L, Cozzi MR, Yoshioka A, Perrisi R, Colombatti A, De Marco L (1999) Identification of Domains Responsible for von Willebrand Factor Type VI Collagen Interaction Mediating Platelet Adhesion under High Flow. *J Biol Chem* 274/5: 3033–3041

21. Schneppenheim R, Budde U (Hrsg.) (2006) Von Willebrand-Syndrom und von Willebrand-Faktor. Aktuelle Aspekte der Diagnostik und Therapie. 2. Aufl. UNI-MED Verlag, Int Med Pub (Bremen, London, Boston)
22. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH (1985) Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228/4706: 1401-1406
23. 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
24. Shelton-Inloes BB, Titani K, Sadler JE (1986) cDNA Sequences for Human von Willebrand Factor Reveal Five Types of Repeated Domains and Five Possible Protein Sequence Polymorphism. *Biochem* 25/11: 3164-3173
25. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL (1974) Synthesis of von Willebrand Factor by Cultured Human Endothelial Cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 71/ 5: 1906-1909
26. Sporn LA, Chavin S, Marder VJ, Wagner DD (1985) Biosynthesis of von Willebrand Protein by Human Megakaryocytes. *J Clin Invest* 76/3: 1102–1106
27. Wagner DD, Marder VJ (1984) Biosynthesis of von Willebrand Protein by Human Endothelial Cells: Processing Steps and Their Intracellular Localization. *The journal of cell biology* 99: 2123-2130
28. Ohmori K, Fretto LJ, Harrison RL, Switzer ME, Erickson HP, McKee PA J (1982) Electron microscopy of human factor VIII/Von Willebrand glycoprotein: effect of reducing reagents on structure and function. *Cell Biol* 95/2 Pt 1: 632-640
29. Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee AM (1985) Substructure of Human von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 76:1491-1500
30. Verweij CL, Diergaarde PJ, Hart M, Pannekoek H (1986) Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J* 5/8: 1839-1847

31. A Rehemtulla, Kaufmann RJ (1992) Preferred sequence requirements for cleaving of pro-von Willebrand factor by propeptide-processing enzymes. *Blood* 79: 2349-2355
32. Loesberg C, Gonsalves MD, Zandbergen J, Willems C, van Aken WG, Stel HV, Van Mourik JA, De Groot PG (1983) The effect of calcium on the secretion of factor VIII-related antigen by cultured human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 763: 160-168
33. Weibel ER, Palade GE (1964) New cytoplasmic components in arterial endothelia. *The Journal of Cell Biology* 23: 101-112
34. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ (1982) Immunolocalization of von Willebrand Protein in Weibel-Palade Bodies of Human Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology* 95: 355-360
35. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD (1987) Von Willebrand factor released from Weibel-Palade Bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood* 69/5: 1531-1534
36. Ribes JA, Francis CW, Wagner DD (1987) Fibrin Induces release of von Willebrand Factor from endothelial cells. *J Clin Invest* 79: 117-123
37. Hamilton KK, Sims PJ (1987) Changes in cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine study of microcarrier cell monolayers using the Fluorescent Probe Indo-1. *J Clin Invest* 79/2: 600-608
38. Levine JD, Harlan JM, Harker LA, Counts J, Counts RB (1982) Thrombin-Mediated Release of Factor VIII Antigen From Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Culture. *Blood* 60/2 :531-534
39. Schlüter T, Bohnensack R (1999) Serotonin-Induced secretion of von Willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic AMP-signaling systems independent of Increased cytoplasmic calcium concentration. *Biochem Pharmacol* 57: 1191–1197
40. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Günther G, Rosenthal W, Vischer UM (2000) Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest* 106: 107–116

41. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J (2006) Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1002-1007
42. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD (1989) Differing Polarity of the Constitutive and Regulated Secretory Pathways for von Willebrand Factor in Endothelial Cells. *J Cell Biol* 108: 1283-1289
43. Bowie EJ, Solberg LA, Fass DN, Johnson CM, Knutson GJ, Stewart ML, Zoecklein LJ (1986) Transplantation of Normal Bone Marrow into a Pig with Severe von Willebrand's Disease. *J Clin Invest* 78: 26-30
44. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE (1996) Shear-Dependent Changes in the Three-Dimensional Structure of Human von Willebrand Factor. *Blood* 88/8: 2939-2950
45. Dong J, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, López JA, Cruz MA. (2003) ADAMTS-13 Metalloprotease Interacts with the Endothelial Cell-derived Ultra-large von Willebrand Factor. *J Biol Chem* 278/32: 29633-29639
46. Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, Ruggeri ZM (1995) Characterization of the Unique Mechanism Mediating the Shear-dependent Binding of Soluble von Willebrand Factor to Platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 270/40: 23352–23361
47. Ruggeri ZM (2000) Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. *J Clin Invest* 105/6: 699-701
48. Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titmi K, Zimmerman TS (1987) A Major Factor VIII Binding Domain Resides within the Amino-terminal 272 Amino Acid Residues of von Willebrand Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 262/18: 8443-4446
49. Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ (1990) The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem.* 189: 229-234
50. Koedam JA, Meijers JCM, Sixma JJ, Bouma BN (1988) Inactivation of Human Factor VIl by Activated Protein C Cofactor Activity of Protein S and Protective Effect of von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 82: 1236-1243

51. Fischer BE, Kramer G, Mitterer A, Grillberger L, Reiter M, Mundt W, Dorner F, Eibl J (1996) Effect of Multimerization of Human and Recombinant von Willebrand Factor on Platelet Aggregation, Binding to Collagen and Binding of Coagulation Factor VIII. *Thrombosis Research* 84: 55-66
52. Vlot AJ, Koppelman SJ, van den Berg MH, Bouma BN, Sixma JJ (1995) The Affinity and Stoichiometry of Binding of Human Factor VIII to von Willebrand Factor. *Blood* 85/11: 3150-3157
53. Furlan M, Robles R, Lämmle B (1996) Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 87:4223–4234
54. Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE (2005) Binding of ADAMTS 13 to von Willebrand Factor. *J Biol Chem* 280/23: 21773-21778
55. Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, Chung D (2006) Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *PNAS USA* 103/49: 18470–18474
56. Sadler JE (2008) Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 112/1 :11-8
57. Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ (2001) Control of von Willebrand Factor Multimer Size by Thrombospondin-1. *J Exp Med* 193/12: 1341–1349
58. Hamilton KK, Fretto LJ, Grierson DS, McKee PA (1985) Effects of Plasmin on von Willebrand Factor Multimers Degradation In Vitro and Stimulation of Release In Vivo. *J Clin Invest* 76: 261-270
59. Ivy AC, Shapiro PF, Melnick P (1935) The bleeding tendency in jaundice. *Serg Gynec Obstet* 60: 781-784
60. Schneppenheim R, Budde U, Ruggeri ZM (2001) A molecular approach to the classification of von Willebrand disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14/2: 281-298
61. Holmberg L, Nilsson IM (1972) Genetic variants of von Willebrand's disease. *BMJ* 3: 317-320
62. Ruggeri ZM, Verstraete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnout J (1987) Classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 58: 419-445

63. Sadler JE (1994) for the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 71: 520-525
64. Sadler JE, Gralnick HR (1994) A new classification for von Willebrand disease. *Blood* 84: 676-679
65. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB; Working Party on von Willebrand Disease Classification (2006) Update on the Pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *JTH* 4: 2103-2114
66. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi M, Soteh, Baronciani L, Hallden C, Guilliatt A, Lester W, Peake I (2007) Phenotype and genotype of cohort of families historically diagnosed with type von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type von Willebrand Disease (MCMMDM-1VWD). *Blood* 109/1: 112-121
67. Penas N, Perez-Rodriguez A, Torea JH, Loure's E, Noya MS, Lopez-Fernandez MF, Batlle J (2005) Von Willebrand Disease R1374C: Type 2A or 2M? A Challenge to the Revised Classification. High Frequency in the Northwest of Spain (Galicia). *American Journal of Hematology* 80: 188–196
68. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U, Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM (1996) Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys > Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *PNAS* 93: 3581-3586

69. Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Mainusch K, Ruggeri ZM, Schneppenheim S, Schwaab R, Oldenburg J (2001) Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood* 97/7: 2059-2066
70. Gaucher C, Dieval J, Mazurier C (1994) Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. *Blood* 84: 1024-1030
71. Schneppenheim R, Thomas KB, Krey S, Budde U, Jessat U, Sutor AH, Zieger B (1995) Identification of a candidate missense mutation in a family with von Willebrand disease type IIC. *Hum Genet* 96/6: 681-686
72. Schneppenheim R, Obser T, Schneppenheim S et al. (2000) Von Willebrand disease type 2A with aberrant structure of individual oligomers is caused by mutations clustering in the von Willebrand factor D3 domain. *Blood* 96:566a.
73. Lyons SE, Bruck ME, Bowtell EJW, Ginsburg D (1992) Impaired Intracellular Transport Produced by a Subset of Type IIA von Willebrand Disease Mutations. *The Journal of Biological Chemistry* 261/1: 4424-4430
74. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH (1986) Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). *J Clin Invest* 77/3: 947-951
75. Hassenpflug WA, Budde U, Obser T, Angerhaus D, Drewke E, Schneppenheim S, Schneppenheim R (2006) Impact of mutations in the von Willebrand factorA2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. *Blood* 107/6: 2339-2345
76. Schneppenheim R (2005) The evolving classification of von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 16 Suppl.1: 3-10
77. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM (1990) Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 6306-10.

78. Ruggeri ZM, Pareti PM, Mannucci N, Ciavarella N, Zimmerman TS. (1980) Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 302: 1047-1051
79. Rabinowitz I, Tuley EA, Mancuso DJ, Randi AM, Firkin BG, Howard MA, Sadler JE (1992) von Willebrand disease type B: a missense mutation selectively abolishes ristocetin-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *PNAS* 89/20:9846-9849
80. Mazurier C, Ditval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M (1990) A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood* 75: 20-26
81. Simone JF, Cornet JA, Abildgaard CF (1968) Acquired von Willebrand's Syndrome in Systemic Lupus Erythematosus. *Blood* 31: 806-812
82. Federici AB, Budde U, Rand JH. Acquired von Willebrand-syndrome 2004: International registry. *Hämostaseologie* 24: 50–55.
83. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio A (1977) 1-Deamino-8-D-argininevasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrand's diseases. *Lancet* 309/8017: 869-872.
84. Mannucci PM (2001) How I treat Patients with vonWillebrand disease. *Blood* 97/7: 1915-1919
85. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
86. 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* 30/1: 253-269
87. Schneppenheim R, Plendl H, Budde U (1998) Luminography: an alternative assay for detection of von Willebrand factor multimers. *Thromb Haemost* 60/2: 133-136

88. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1997) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry* 74/12: 5463-5467
89. Goodeve AC, Eikenboom JC, Ginsburg D, Hilbert L, Mazurier C, Peake IR, Sadler JE, Rodeghiero F (2001) A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 85/5: 929-931
90. Barker D, Schafer M, White R (1984) Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA. *Cell* 36: 131-138
91. Marti T, Rösselet SJ, Titani K, Walsh KA (1987) Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 26/25: 8099-8109
92. Casonato A, Sartorello F, Cattini MG, Pontara E, Soldera C, Bertomoro A, Girolami A (2003) An Arg760Cys mutation in the consensus sequence of the vonWillebrand factor propeptide cleavage site is responsible for a new vonWillebrand disease variant. *Blood* 101/1: 151-156
93. Zhang ZP, Falk G, Blomback M, Egberg N, Anvret M (1992) A single cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene is the most common mutation in Swedish vWD type III Patients. *Human Molecular Genetics* 1/9: 767-768
94. 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
95. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannuccio P (2003) Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic Patients. *Blood Cells Mol Dis* 30: 264–270 Link momentan defekt
96. Mannucci PM, Lombardi R, Castaman G, Dent JA, Lattuada A, Rodeghiero F, Zimmerman TS (1988) Von Willebrand Disease "Vicenza" With Larger-Than-Normal (Supranormal) von Willebrand Factor Multimers. *Blood* 71/1: 65-70

97. Schneppenheim R, Federici AB, Budde U (2000) Von Willebrand disease type 2M "Vicenza" in Italian and German Patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. *Thromb Haemost* 83: 136-140
98. Lenting PJ, Westein E, Terraube V, Ribba AS, Huizinga EG, Meyer D, de Groot PG, Denis CV (2004) An Experimental Model to Study the in Vivo Survival of von Willebrand factor. *Journal biol chem* 279/3: 12102–12109
99. Casonato A, Pontata E, Sartorello F, Cattini MG, Sartori MT, Padrini R, Girolami A (2002) Reduced von Willebrand factor survival in type Vicenza von Willebrand disease. *Blood* 99: 180-184
100. Casonato A, Pontata E, Sartorello F, Cattini MG, Gallinaro L, Bertomoro A, Rosato A, Padrini R, Pagnan A (2006) Identifying type Vicenza von Willebrand disease. *J Lab Clin Med* 147/2: 96-102
101. Castman G, Missiaglia E, Federici AB, Schneppenheim R, Rodeghiero E (2000) An additional unique candidate mutation (G2470; M740I) in the original families with von Willebrand disease type 2 M Vicenza and the G3864A (R1205H) mutation. *Thromb Haemost* 84: 350–351
102. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliat A, Bowen D, Pasi J, Keeling D, Hill F, Bolton-Maggs PHB, Hay C, Collins P (2006) An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK Patients diagnosed to have type I von willebrand disease. *Thromb Haemost* 96: 630–641
103. Lester WA, Guilliat AM, Surdhar GK, Enayat SM, Wilde JT, Willough S Grundy P, Cumming AM, Collins PW, Hill FGH (2006) Inherited and de novo von Willebrand disease 'Vicenza' in UK families with the R1205H mutation: diagnostic pitfalls and new insights. *Br J Haematol* 135/1: 91-96
104. Veyradier A, Dakik O, Lavergne J.M, Ribba AS, Girma JP, Hilbert L, Mazurier C, Fressinaud E, Meyer D, and the INSERM network (2001) Von Willebrand disease Vicenza with mutation R1205H of von Willebrand factor (VWF): study of 18 French Patients and of recombinant VWF. *Thrombosis and Haemostasis 15th Congress Suppl*

105. Gezsi A, Balazsi G, Sallai K, Mohl A, Nagy E, Szabo T, Sadler JE, Bodo I (2004) Increased clearance explains the ultra-large multimers in von Willebrand disease type 2M Vicenza; lessons from recombinant VWF Vicenza and modeling of multimer catabolism. *Blood* 104/11: 3669 (abstr.)
106. Hilbert L, Gaucher C, Mazurier C (1995) Identification of Two Mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 Loop of von Willebrand Factor (vWF) Responsible for Type 2 von Willebrand Disease With Decreased Platelet-Dependent Function of vWF. *Blood* 86/3: 1010-1018
107. Castaman G, Eikenboom JC, Rodeghio F, Briet E, Reitsma PH (1995) A novel candidate mutation (arg611His) in type I „platelet discordant“ von Willebrand's disease with desmopression induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 89/3: 656-658
108. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, Hilbert L, Ribba AS, Jorieux S, Mazurier C (1997) Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. *Thromb Haemost.* 78/1: 451-456
109. Hakami N, Shibuya H, Johnson GS, Stoy SI, Huang TH, Montgomery RR (1993) A novel von Willebrand factor Arg611Cys or VWF Columbia associated with a dominant von Willebrand disease variant. *Blood* 82: 149 (abstr.)
110. Nitu-Whalley IC, Riddell A, Lee CA, Pasi KL, Owens D, Enayat MS, Perkins SJ, Jenkins PV (2000) Identification of type 2 von Willebrand disease in previously diagnosed type 1 Patients: a reappraisal using phenotypes, genotypes and molecular modelling. *Thromb Haemost* 84: 998–1004
111. Casonato AJ, Pontara E, Sartorello F, Bertomoro A, Durante C, Girolami A (2001) Type 2M von Willebrand disease variant characterized by abnormal von Willebrand factor multimerization. *J Lab Clin Med* 137: 70–76 Link

112. Lanke E, Johansson AM, Hallden C, Lethagen S (2005) Genetic analysis of 31 Swedish type 1 von Willebrand disease families reveals incomplete linkage to the Willebrand factor gene and high frequency of certain disease haplotype. *Thromb Haemost* 3:2656-2663
113. Bowen DJ, Collins PW (2004) An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS13. *Blood* 103: 941-947
114. O'Brien LA, James PD, Othman M, Berber E, Cameron C, Notley CR, Hegadorn CA, Sutherland JJ, Hough C, Rivard GE, O'Shaunessey D, Lillicrap D (2003) Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. *Blood* 102: 549–557
115. Davies JA, Collins PW, Hathaway L, Bowen DJ (2008) Von Willebrand factor: evidence for variable clearance in vivo according to Y/C1584 phenotype and ABO blood group. *JTH* 6: 97–103
116. 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
117. Mayadas TN, Wagner DD (1992) Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Biochem* 89: 3531-3535
118. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D for the Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada (2007) The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood* 109/1: 145-154
119. Casonato A, De Marco L, Gallinaro L, Sztukowska M, Mazzuccato M, Battiston M, Pagnan A, Ruggeri ZM (2007) Altered von Willebrand factor subunit proteolysis and multimerprocessing associated with the Cys2362Phe mutation in the B2 domain. *Thromb Haemost* 97/4: 527-533

120. Lester WA, Guilliatt AM, Enayat MS, Rose P, Hill FGH (2007) The R2464C missense mutation in the von Willebrand factor gene causes a novel abnormality of multimer electrophoretic mobility and falls into the subgroup of type 2 von Willebrand disease 'unclassified'. *Thromb Haemost* 97: 159–160
121. 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: 709–717
122. Castman G, Eikenboom JC, Lattuada A, Rodeghiero F (2000) Grossly Abnormal Proteolysis of von Willebrand Factor (VWF) in a Patient Heterozygous for a Gene Deletion and Mutation in the Dimerization Area of VWF. *Thromb Haemost* 84: 729-730
123. Tjernberg P, Vos HL, Castman G, Bertina RM, Eikenboom JCJ (2004) Dimerization and multimerisation defects of von Willebrand factor due to mutated cysteine residues. *JTH* 2: 257-265
124. Van Schooten CJ, Tjenberg P, Westein E, Terraube V, Castman G, van Mourik JA, Hollestelle MJ, Vos HL, Bertina RM, van den Berg HM, Eikenboom JCJ, Lenting PJ, Denis CV (2005) Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *JTH* 3: 2228–2237

6 Anhang

6.1 Abbildungs und Tabellenverzeichnis

6.1.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktion des VWF in der primären und sekundären Hämostase des arteriellen Systems und der Mikrozirkulation.....	6
Abb. 2: Der VWF vom Gen zum Protein.....	7
Abb. 3: Multimerisierung und Sekretion des VWF	8
Abb. 4: VWS Typ2 Multimere	14
Abb. 5: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 01	26
Abb. 6 Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 02	27
Abb. 7: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 03	28
Abb. 8 Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 04	29
Abb. 9: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 05	30
Abb. 10: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 06	31
Abb. 11: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 07	32
Abb. 12: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 08	33
Abb. 13: Ausschnitte der Sequenzanalyse des Patienten Nr. 08 (A), des klonierten mutierten Allels (B), des klonierten wt Allels (C)	34
Abb. 14: PAGE des Exons 30 des Patienten Nr. 08 (P.08).	34
Abb. 15: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Patienten Nr. 09	35
Abb. 16: Zwei Multimeranalysen (A/B) des Patienten Nr. 09 in Agarose Gelen mittlerer Auflösung (MRG) (Links) und niedriger Auflösung (LRG) (Rechts)	36

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Abb. 17: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr 10	37
Abb. 18: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 11	38
Abb. 19: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 12	39
Abb. 20: Ausschnitt der Sequenz des Exon 18 wt (A) und der Sequenzanalyse Exon 18 des Patienten Nr. 12 (B).....	40
Abb. 21: PAGE mit Restriktionsfragment-Längen des Exons 18 nach <i>BglI</i> -Verdau.....	40
Abb. 22: Multimeranalyse der Familie F2	42
Abb. 23: Ausschnitt der Sequenzanalyse der Patientin F2/P2	42
Abb. 24: Stammbaum der Familie F2.....	42
Abb. 25: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Patient Nr. 13	44
Abb. 26: Zwei Multimeranalysen des Patienten Nr. 13.....	44
Abb. 27 Multimeranalysen LRG (A) und MRG (B) des Patienten Nr. 14	45
Abb. 28: Ausschnitte der Sequenz des wt (A) und der Sequenzanalyse des Patienten Nr. 14 (B).....	45
Abb. 29: Multimeranalysen von F2/P2+P3 (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B)	47
Abb. 30: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 15	48
Abb. 31: Multimeranalyse (A) und Ausschnitt der Sequenzanalyse (B) des Patienten Nr. 16	49
Abb. 32: Multimeranalysen der Patienten Nr 17, Nr. 18 und Nr. 19.....	51
Abb. 33: Position der gefundenen Mutationen im VWF-Gen.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neue und alte Klassifikation des VWS.....	12
Tabelle 2: Zusammenfassende Auflistung der Patientendaten	18
Tabelle 3: Laborwerte des Patienten Nr. 01	26
Tabelle 4: Laborwerte des Patienten Nr. 02.	27
Tabelle 5: Laborwerte des Patienten Nr. 03	28
Tabelle 6: Laborwerte des Patienten Nr. 04	29
Tabelle 7: Laborwerte des Patienten Nr. 05	30
Tabelle 8: Laborwerte des Patienten Nr. 06	31
Tabelle 9: Laborwerte des Patienten Nr. 07	32
Tabelle 10: Laborwerte des Patienten Nr. 08	33
Tabelle 11: Laborwerte des Patienten Nr. 09	35
Tabelle 12: Laborwerte des Patienten Nr. 10	37
Tabelle 13: Laborwerte des Patienten Nr. 11	38
Tabelle 14: Laborwerte des Patienten Nr. 12	39
Tabelle 15: Laborwerte des Patienten F2/P3	41
Tabelle 16: Laborwerte des Patienten F2/P2	41
Tabelle 17: Laborwerte des Patienten Nr. 13	43
Tabelle 18: Laboruntersuchung der Thrombozyten des Patienten Nr. 13.	44
Tabelle 19: Laborwerte des Patienten Nr. 14	45
Tabelle 20: Laborwerte des Patienten F2/P3	46
Tabelle 21: Laborwerte des Patienten F2/P2	46
Tabelle 22: Laborwerte des Patienten Nr. 15	48
Tabelle 23: Laborwerte des Patienten Nr. 16	49
Tabelle 24: Laborwerte des Patienten Nr. 17	50
Tabelle 25: Laborwerte des Patienten Nr. 18	50
Tabelle 26: Laborwerte des Patienten Nr. 19	50
Tabelle 27: Pänotyp und Genotyp der Patienten.....	52

7 Materialliste

7.1.1 DNA-Extraktion

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
DNA-Extraktionsset	QIAamp DNA mini ® Kit	Qiagen	Hilden
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf	Hamburg
Ethanol		Merck	
Zentrifuge	EBA 12R	Hettrich	Tuttlingen

7.1.2 PCR

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
dNTP's		Peqlab	Erlangen
Thermo Fast 96 PCR Plates	0,2ml Tube Plate	Peqlab	Erlangen
Deckel	8er Domed Cap Strips	Peqlab	Erlangen
DNA-Polymerase	Taq DNA Polymerase	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Polymerase	Advantage GC2-Polymerase	Clonetech	
Destilliertes Wasser	Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen
Thermocycler	T-Gradient	Biometra	Göttingen
Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra	Göttingen
Thermocycler	T1-Thermocycler	Biometra	Göttingen
Thermocycler	PE 2400		

7.1.3 PAGE

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
Trägerfolie	Gelbond PAG	FMC	Rockland, ME, USA
Spacer	0,4mm	Gibco-BRL	Eggenstein
Glasplatten	26x12x0,5cm	Hampe	Kiel
Ethanol	0,8	Apotheke UKE	Hamburg
Stromquelle	Desatronic 3000/200	Desaga	Heidelberg

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
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 Küh- ner AG	Basel, CH

7.1.4 Agarosegelelektrophorese

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
Trägerplatte		Pharmacia	Ratingen
Kämme		Pharmacia	Ratingen
Elektrophoresekammer	Gel Electrophoresis Apparatus GNA200	Pharmacia Fine Che- micals	Schweden
Aufreinigungssäulen	Ultrafree-DA	Millipore	Schwalbach
Stromquelle	Powerpack P25	Biometra	Göttingen
UV-Lichttisch	Transilluminator TR 302 302 nm UV	Spectroline	
Zweiter UV-Tisch	ECX-20M	Peqlab	
Zentrifuge	EBA 12R	Hettich- Zentrifugen	Tuttlingen
Geldokumentationssys- tem	Universal UV/WL cabinet	Appligene oncor	
Kamerarechner	The Imager	Appligene	
Fotokammer	Universal UV/WL Cabinet	Appligene oncor	

7.1.5 Sequenzierung

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
SEQ Kit	ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Vers 1.1	Applied Biosystems	Foster City, USA
SEQ-Puffer	5xSequencing Buffer	Applied Biosystems	Foster City, USA
SEQ-Tubes	Softtubes 0,5ml	Biozym,	Hess. Oldendorf
Aufreinigung der SEQ-Rkt	DyeEx 96 Kit	Qiagen	Hilden
Zentrifuge	Rotana 96R	Hettrich	Tüttlingen
Sequencer	ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Foster City, USA
Master-Mix Exon 28	High Fidelity Master Mix	Invitrogen	Karlsruhe

7.1.6 Klonierung

Materialname	Typ	Hersteller	Ort
Cloning Kit	TOPO TA Cloning® Kit Version O	Invitrogen	Karlsruhe
Brutschrank		Heraeus Instruments	
Wasserbad		Wilke med technik	Hamburg
LB-Agar		Invitrogen	Karlsruhe
Schüttler für die Inkubation	Orbital incubator SI60	Stuart	
Ampicillin		Sigma	Steinheim
Restriktionsenzym:	BglI	New England Biolabs	Frankfurt am Main

7.2 Rezepte

7.2.1 Cetus 10X

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Tris	100 mM	Sigma
MgCl ₂	15 mM	Merck
KCl	500 mM	Merck
Gelatine	0,01 % (w/v)	BioRad
pH 8,3 mit 1n HCl	ad 100 ml	
Sterilfiltration 0,2 mm		Millipore

7.2.2 PCR-Ansatz auf 50 µl

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Cetus	10x	s.o.
MgCl ₂	1 mM	Invitrogen
dNTP's	0,2 mM	Peqlab
Primer-Sense	2 ng/µl	Metabion Martins-ried
Primer-Antisense	2 ng/µl	
TAQ-Polymerase	1 unit	Invitrogen
DNA-Probe	10 ng-400 ng/µl	
Aqua dest.	ad 50µl	Braun

7.2.3 PAGE

APS 10%

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Ammoniumpersulfat	10%	Sigma

Polyacrylamidgel

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

Tris-Borat Ph 9

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Tris	0,14 M	Merck
Borat	0,07 M	Merck

Silberfärbung

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Ethanol (vergällt)	10% (v/v)	Merck
HNO ₃ 65%	1% (v/v)	Merck
AgNO ₃	10 mM	Merck
Essigsäure 100% p.a.	10% (v/v)	Merck
Reduktionslösung:		
NaHCO ₃ wasserfrei	280 mM	Merck
Formaldehyd	0,02% (v/v)	Merck

7.2.4 Agarosegel

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

7.2.5 Mastermix Sequenzierung

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Big Dye V.1.1	1 µl	Applied Biosystems
5x SEQ-Buffer	3 µl	Applied Biosystems
Primer 1,5 µl	100ng/µl	Metabion
PCR Produkt	4 µl	
Aqua dest.	Ad. 20 µl	Braun

7.2.6 Klonierung

Ligieren

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
PCR Produkt	3 µl	
Salz-Lösung	1 µl	Invitrogen
Aqua dest	Ad 5 µl	Invitrogen
TOPO® vector	1 µl	Invitrogen
Ligationsansatzes (s.o.)	2 µl	Invitrogen
Chemisch Kompetente E.coli	1 Ampulle	Invitrogen
S.O.C Medium	250 µl	Invitrogen

S.O.C Medium

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Trypton	2 %	
Hefeextrakt	0,5 %	
NaCl	10 mM	
KCL	10 mM	
MgCl ₂	10 mM	
MgSO ₄	10 mM	
Glukose	20 mM	

Ampicillin versetzer LB-Agar

Reagenz	Menge/Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml LB-Agar	Sigma
LB-Agar		Invitrogen

7.3 Cyclor Programme

7.3.1 PCR-Programm

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Schleifen
1.Vorheizen	95°C	Pause	
2.Denaturierung	95°C	5 Minuten	
3.Denaturierung	95°C	40 Sekunden	
4.Annealing	(52°C-68°C)	30 Sekunden	
5.Elongation	72°C	1 Minute	35x
6.Elongation	72°C	5 Minuten	
7.Reaktionsende	4°C	Pause	

7.3.1 PCR Programm für Exon 28

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Schleifen
1.Vorheizen	95°C	Pause	
2.Denaturierung	95°C	5 Minuten	
3.Denaturierung	95°C	40 Sekunden	
4.Hybridisierung	65,4°C	30 Sekunden	
5.Elongation	72°C	80 Sekunden	50x
6.Elongation	72°C	5 Minuten	
7.Reaktionsende	4°C	Pause	

7.3.2 PCR Programm für Exon 15

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Schleifen
1.Vorheizen	96°C	Pause	
2.Denaturierung	99°C	3 Minuten	
3.Denaturierung	96°C	30 Sekunden	
4.Hybridisierung	60,0°C	30 Sekunden	
5.Elongation	68°C	3 Minuten	35x
6.Elongation	68°C	7 Minuten	
7.Reaktionsende	4°C	Pause	

7.3.3 Sequenzierungsprogramm

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Schleifen
1.Vorheizen	95°C	Pause	
2.Denaturierung	95°C	5 Minuten	
3.Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
4.Hybridisierung	(52-63°C)	30 Sekunden	
5.Elongation	60°C	4 Minuten	50-60x
6.Reaktionsende	4°C	Pause	

7.4 Primer

Exon	1. Primer: sense, 2. Primer: antisense	Exongröße (Bp)	AT °C	SEQ Temp °C
2	gca gca atg acc agc tca cg gaa agg tgt cac tcc aga tgg c	156	60,9	60
3	cta att tct acg agg cca gag agg cag ccc tcc ctc tga agt cc	296	59	60
4+5	ctg ctg aga aaa ggt tac g gca aag aga taa ggt tgg c	841	53,4	55
6	aac aca caa aac cac cag c gat cca gaa atc aca cac c	271	55,2	52
7	cac act cag gga gac act aac g ttt gta gtc act ggc tgg ctg g	406	59	60
8	cat ggc tgg tga gat gat gc tct gat ctg taa ata aag tgg g	204	55,2	55
9	Gaa gaa acc caa cca ttg tcc c agt ccc cca ggc agg tct cc	259	62,8	63
10	ttt ggg gac tgt gat aac tac c gga agg agg aag aga atg agc g	178	57,1	55
11	gtc cat gca gtt ttg ggg aag g agc agc cgg gct ggc aaa gc	273	62,8	60
12	ttt ctc tga tta aga ggg tcc tgg g ttg aga agg agg gtg cta agg g	290	62,8	60
13	cca aat aca tct gcc tgc cac c tct tct ccc acc aca caa agc c	269	66,5	60

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Exon	1. Primer: sense, 2. Primer: antisense	Exongröße (Bp)	AT °C	SEQ Temp °C
14	cca gag tgg cct ggt ctc tc tgg aga cct cga gat tct gcg	274	62,8	60
15	ctc ctc ccc acc aca tcc cag g cag gaa aca acg cag aga aag g	350	60	63
16	tcc ttg ctg tcc aac att ccc g gct ctg ctg ttt tag agg tcc c	340	66,5	60
17	gtg gag gca gcg agt ata gac g gtg agg aat ctg ggc agg atg g	210	68	60
18	aaa gga cag tgt gga agg tag g aca aga aaa ctg aag ggc agg c	278	64,7	63
19	agg gct tta gat cag tca ctg tgg ccc t tgg ccg cgt gca ccc tca ctc cac c	228	68	63
20	tct gtg ttc ctt cat tgc ctc c acc cct cct aga aag aaa cag c	277	62,8	60
21	aat ctt ctg gtc tgg tga gag c cat cct ctt taa tgg ctg tgc g	324	57,1	60
22	gta gag tgg agg gag gat ctg g agc aag tcc tta gag acc tac g	308	66,5	60
23	tgt tcc cct ttc ccc tga gcc g aga ggg aca ttc cag gaa gca agc tct a	274	64,7	60
24	taa ccc cag ttt gac cag ctg act ctg tgt cca tac cac ca	234	55,2	55
25	cca gac taa gag cca gag ttc cat ctg aga aca tga ggg c	255	57,1	55
26	gtc ctg gag gct ttg cct g tga ctc tga tga aag aac cca c	368	53,2	55
27	tag tta aaa atg agg ctt cct caa taa gat tca tca ctt caa aca ac	249	55,2	52
28 I	tca ctt gga tgt gga atg gtc c aac tcc ttg ctc ctg ttg aag tc	1036	65	60
28 II	atg gtt ctg gat gtg gcg ttc gta tct tgg cag atg cat gta gc	653	65	60

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Exon	1. Primer: sense, 2. Primer: anti-sense	Exongröße (Bp)	AT °C	SEQ Temp °C
29	tgt gct cac ctt cct ggt tg ttt tga atc aag tag agc ca	216	55,2	52
30	aaa ata atc cgc att ttc tc tag ccc ctc act ttc cag ga	304	52	60
31	acc gtt aag aca ggg tgt cg acc agg aca gag gtt ggt at	325	59	55
32	cct ttc ttg tct ctt tgc ta cca tga aca gaa act taa ag	357	53,4	52
33	cca cct cag cct cat gtc cct at gcc cca aac aca tct cta ac	264	59	55
34	ttc ctg tct cat gta cag gg cag aaa agc aat tct tcc ttc ca	584	57,1	52
35	cat ggg ggt ttg gat aac gtc g act aaa agc aac tgc cac cag g	354	60,9	60
36	att gct agg act acg gat gag c aag agc ctc aga gta gag c	310	57,1	55
37	caa tgt ttt tgt acc cag gg tgg tct cca gga ttt tca gag g	440	57,1	52
38	agc tgt gcc cat ttc act ctg g agc ccc atg gga agt gaa agg c	298	60,9	60
39	tcg tac cta gaa tgt cct gtg agt gtt tga gtc tgc tct gcc a	254	60,9	55
40	agc aag aac att tca aat ccc t gta tcc aat cgg tcc tta ccc a	289	59	52
41	gag taa cct ttc tga act ctg c atc ttg gaa gag gtc cct gag g	242	62,8	52
42	gca tag ctg aat act tac gag c agt taa tag cca agc agt cc	296	59	55
43	gcg gct tct gtg tag tag gtg c tac cct tcc taa gat gcc ctc c	307	66,5	60
44	gta aga gcc cct gtg tct ttg c aaa cca agg tca acg ctg gtc c	245	60,9	60
45	acc acc ttc ctg aga gaa gag c agc caa aag tgg aaa gag agg c	340	64,7	55

Molekulargenetische Grundlage einer Variante des von Willebrand-Syndroms

Exon	1. Primer: sense, 2. Primer: anti-sense	Exongröße (Bp)	AT °C	SEQ Temp °C
46	cgg agg agg agc ccc aaa gag agc gtc cca cag gca gtg gaa agc tgg	292	57,1	63
47	tga gtg ggg ggt tgg ggg atg ct gtc cag tcc atg ccc tcg gtc c	212	64,7	63
48	act gga taa gag aga tga gag g aga tgg tga tat gtg agg gag c	243	59	55
49	aca ctg tct ctg act tta cc gag aca gta aag agg aaa gc	203	53,4	52
50	gag ttc gga gct aaa aat tgg c ttg cta atg ggt ttc aag gag	221	55,2	60
51	acc tat ttc cag ccc agt gag g cac cca gcc ctt att gaa gc	222	57,1	55
52	gac ttc cca cca ttg tga agc gtg ctt cct tcc tca gaa ccg g	460	59	55

7.5 Danksagung

Ich danke Professor Dr. rer. nat. R. Schneppenheim für das mir entgegengebrachte Vertrauen, das Überlassen des Themas und das Bereitstellen des Materials.

Bei Florian Oyen und Tobias Obser bedanke ich mich für ihre freundliche Anleitung und Hilfsbereitschaft. Die Arbeit im Labor der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie war stets angenehm, dafür gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern dieses Labors.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. med Budde und seinen Mitarbeitern, darunter insbesondere Frau Dr. med. Sonja Schneppenheim, für die Bereitstellung der Multimeranalysen und des Patientenmaterials.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre großzügige Unterstützung mein Studium frei von finanziellen Sorgen ermöglicht haben.

7.6 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.