

---

# **MOLEKULARGENETIK DES HEREDITÄREN ANGIOÖDEMS**

---

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON  
**TANJA FÖRSTER**  
AUS HAMMELBURG

WÜRZBURG 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Schulz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2002 bis Juni 2006 am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Müller-Reible angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Doktorarbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Die Dissertation hat bisher weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Es wurde zuvor kein anderer akademischer Grad erworben.

Würzburg, Juni 2006

---

Tanja Förster

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Das Hereditäre Angioödem (HAE) - Historischer Überblick .....	5
1.2 Das klinische Syndrom HAE .....	6
1.2.1 Klassifizierung des HAE.....	6
1.2.2 Klinische Symptome des HAE.....	6
1.2.3 Auslösende Faktoren .....	8
1.2.4 Erstmanifestation und Frequenz der Attacken .....	8
1.2.5 Diagnose des HAE .....	9
1.2.6 Therapie des HAE .....	10
1.2.6.1 Therapie mit C1-INH-Konzentrat und „fresh frozen“-Plasma .....	10
1.2.6.2 Therapie mit Androgenen.....	11
1.2.6.3 Therapie mit neuen Wirkstoffen .....	11
1.2.7 Einsatzgebiete des C1-INHs jenseits der klassischen Ödemtherapie.....	11
1.3 Weitere Formen des Angioödems .....	13
1.4 Pathophysiologie des C1-INH.....	16
1.4.1 Regulation der Aktivierung des Komplementsystems .....	17
1.4.2 Regulation der Aktivierung des Kontaktsystems .....	19
1.4.3 Regulation der Aktivierung des intrinsischen Wegs der Blutgerinnung.....	20
1.5 Auslöser der erhöhten Gefäßpermeabilität.....	21
1.5.1 Komplementzentrische Theorie .....	21
1.5.2 Kontaktzentrische Theorie .....	22
1.6 Das C1-Inhibitor-Gen.....	23
1.6.1 Nummerierung und Nomenklatur .....	23
1.6.1.1 Nummerierung der Nukleotide.....	23
1.6.1.2 Nummerierung der Aminosäuren.....	24
1.6.2 Mutationen im <i>C1-INH</i> -Gen .....	24
1.6.3 Bekannte Polymorphismen im <i>C1-INH</i> -Gen .....	25
1.6.4 HAE-Datenbank .....	26
1.6.5 Motivation der genetischen Analyse .....	27



---

1.7	Das C1-Inhibitor Protein .....	27
1.7.1	Serpine.....	27
1.7.1.1	Struktur der Serpine .....	27
1.7.1.2	Inhibierungsmechanismus der Serpine.....	28
1.7.1.2.1	Funktionelle Eigenschaften einer Serinprotease .....	28
1.7.1.2.2	„Branched-Pathway“-Modell .....	29
1.7.1.3	Mutationen bei Serpinen .....	31
1.7.2	Aufbau des C1-Inhibitor Proteins .....	31
1.7.3	Die N-terminale Domäne des C1-Inhibitors .....	32
1.8	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	34
2.2	Geräte .....	34
2.3	Sonstige Materialien.....	35
2.4	Enzyme und Kits .....	36
2.4.1	Restriktionsendonukleasen.....	36
2.4.2	DNA/RNA modifizierende Enzyme .....	36
2.4.3	Antikörper .....	36
2.4.4	Größenstandards.....	36
2.4.5	Kits .....	36
2.4.6	Antibiotika.....	37
2.5	Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien .....	37
2.6	Plasmide und Expressionsvektoren .....	37
2.7	Pufferlösungen und Nährmedien.....	37
2.7.1	DNA-Extraktion .....	37
2.7.2	PCR .....	38
2.7.3	Southern-Blot .....	39
2.7.4	dHPLC.....	40
2.7.5	Medien zur Anzucht von Bakterien .....	40
2.7.6	Medien zur Kultivierung eukaryontischer Zelllinien .....	41
2.7.7	Transfektion .....	41
2.7.8	Western-Blot .....	41
2.8	Oligonukleotide .....	43
2.8.1	Primer der C1-Inhibitor Diagnostik .....	43

---

2.8.2	Primer zur Klonierung des C1-Inhibitors.....	44
2.8.3	Primer für Mutagenese am C1-Inhibitor .....	45
2.9	Bioinformatische Methoden.....	46
2.9.1	Verwendete Software .....	46
2.9.2	Verwendete Internetprogramme.....	46
2.10	Patienten .....	47
2.11	Methoden zur C1-Inhibitor Gendiagnostik .....	47
2.11.1	Isolierung genomischer DNA aus Blut .....	47
2.11.2	PCR .....	47
2.11.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	48
2.11.4	Sequenzierung .....	49
2.11.5	Southern-Blot .....	50
2.11.5.1	Restriktionsverdau der genomischen DNA.....	50
2.11.5.2	Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente .....	51
2.11.5.3	Kapillarblot.....	51
2.11.5.4	Radioaktive Markierung der Sonde und Hybridisierung .....	51
2.11.5.5	Waschen und Entwickeln der Nylonmembran.....	52
2.11.6	dHPLC-Methode zur Detektion großer Deletionen .....	52
2.11.6.1	Amplifikation der Fragmente .....	52
2.11.6.2	Auftrennung der Fragmente und Auswertung.....	53
2.12	Methoden zur Expression und Mutagenese des C1-Inhibitors.....	54
2.12.1	Klonierung des C1-Inhibitors.....	54
2.12.1.1	Amplifikation der <i>CI-INH</i> -cDNA .....	54
2.12.1.2	TA-Klonierung, Elektrotransformation und DNA-Präparation .....	54
2.12.1.3	Umklonierung des C1-Inhibitors in den Expressionsvektor pCEP4.....	55
2.12.1.3.1	Spaltung des Inserts mit HindIII/NotI.....	55
2.12.1.3.2	Spaltung des Expressionsvektors pCEP4 mit HindIII/NotI .....	56
2.12.1.3.3	Ligation der <i>CI-INH</i> -cDNA mit dem Expressionsvektor .....	56
2.12.1.3.4	Elektrotransformation.....	56
2.12.1.3.5	Überprüfung der Ligation mittels PCR und Sequenzierung .....	56
2.12.1.4	Zielgerichtete Mutagenese .....	57
2.12.2	Kultivierung und Transfektion von HEK-293 Zellen .....	58
2.12.3	Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode .....	59

2.12.4	Kultivierung der transfizierten Zellen und Ernte des rekombinanten Proteins.....	59
2.12.5	Messung der C1-INH-Aktivität mittels Technochrom <sup>®</sup> C1-INH-Kit .....	60
2.12.5.1	Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien.....	60
2.12.5.2	Durchführung der Messung.....	60
2.12.5.3	Berechnung der Ergebnisse .....	60
2.12.6	Western-Blot zum Nachweis der erfolgreichen rekombinanten Expression .	61
2.12.6.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	61
2.12.6.2	Elektroblot.....	62
2.12.6.3	NuPage Fertiggele .....	62
2.12.6.4	Entwickeln der Membran .....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
3.1	Mutationsscreening des <i>CI-INH</i> -Gens.....	63
3.1.1	Detektion großer Deletionen mittels Southern-Blot.....	64
3.1.2	Detektion großer Deletionen mittels dHPLC .....	65
3.1.3	Detektion von Punktmutationen und kleinen Deletionen mittels Sequenzierung .....	67
3.1.3.1	Missense-Mutationen .....	69
3.1.3.2	Nonsense-Mutationen.....	70
3.1.3.3	Kleine Deletionen, Insertionen und Duplikationen.....	71
3.1.3.4	Splice-Site-Mutationen.....	72
3.1.3.5	Polymorphismen.....	74
3.1.3.6	Keine Mutation im <i>CI-INH</i> -Gen.....	75
3.1.4	Zusammenfassung der C1-Inhibitor Gendiagnostik .....	76
3.2	Expressionsanalyse rekombinanter C1-INH-Varianten .....	77
3.2.1	Homologie-Alignment .....	77
3.2.2	Rekombinante Expression in HEK-293 Zellen .....	79
3.2.2.1	Klonierung des C1-Inhibitors.....	79
3.2.2.2	Zielgerichtete Mutagenese .....	79
3.2.2.3	Transfektion in HEK-293 Zellen.....	79
3.2.3	Messung der C1-INH-Aktivität der rekombinant exprimierten Varianten ....	80
3.2.4	Western-Blot Analyse .....	87
3.2.5	3D-Modellierung.....	89

---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1	<i>C1-INH</i> -Gendiagnostik .....	90
4.1.1	Einteilung der neu entdeckten Mutationen aufgrund ihrer Kausalität .....	92
4.1.2	Kategorie I, Kausalität gesichert .....	92
4.1.2.1	Große Deletionen .....	92
4.1.2.2	Mutationen, die zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führen .....	93
4.1.2.3	Mutationen am aktiven Zentrum des C1-INH .....	94
4.1.3	Kategorie II, Kausalität wahrscheinlich .....	94
4.1.3.1	Splice-Site-Mutationen .....	94
4.1.3.2	Cys406Arg führt zum Verlust einer Disulfidbrücke .....	96
4.1.3.3	Mutation am Initiations-Codon M-22 .....	96
4.1.4	Kategorie III, Kausalität nicht gesichert .....	97
4.1.4.1	Kleine Deletionen, die den Leserahmen nicht verschieben .....	97
4.1.4.2	Aminosäuresubstitutionen .....	97
4.1.5	Fazit der genetischen Diagnostik des C1-Inhibitors .....	99
4.2	Expressionsstudien verschiedener C1-INH-Proteinvarianten .....	100
4.2.1	Mutationen mit einer Restaktivität < 20 % .....	101
4.2.1.1	Mutation M-22V .....	101
4.2.1.2	Mutation N330I .....	101
4.2.1.3	Mutation G323R .....	102
4.2.1.4	Mutationen in der Region 374-377 .....	103
4.2.1.5	Mutation L388P .....	105
4.2.1.6	Mutation P476L .....	106
4.2.1.7	Mutation V458G und Polymorphismus V458M .....	106
4.2.1.8	Mutation R444G .....	108
4.2.2	Mutationen mit reduzierter C1-INH-Aktivität .....	109
4.2.2.1	Mutation A-21V .....	109
4.2.2.2	Mutation R378C .....	110
4.2.2.3	Mutationen C406R und E426Q .....	111
4.2.3	C1-INH-Varianten mit Aktivität vergleichbar mit dem WT .....	113
4.2.3.1	Varianten N1D und H114D .....	113
4.2.3.2	Mutation P64A .....	113
4.2.3.3	Mutation S233T und S233G .....	114

---

4.2.4	Bewertung des 3D-Modells zur Vorhersage der Auswirkung von Aminosäuresubstitutionen .....	115
4.2.5	Zusammenfassung und Ausblick .....	116
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>125</b>
6.1	Sequenz des C1-INH mit Nummerierung .....	125
6.2	Homologie-Vergleiche .....	138
6.3	3D-Modelle der verschiedenen C1-INH-Mutationen .....	140
<b>7</b>	<b>Posterpräsentationen und Vorträge.....</b>	<b>165</b>
7.1	Posterpräsentationen.....	165
7.2	Vorträge.....	167
<b>8</b>	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>168</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Übersicht der klinischen Symptome des HAE.....	7
Abbildung 1.2	Übersicht über die Pathomechanismen des hereditären Angioödems und Angriffspunkte des C1-Inhibitors .....	16
Abbildung 1.3	Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg und den Lektin Weg.....	17
Abbildung 1.4	Aktivierung des Kontaktphasensystems .....	19
Abbildung 1.5	Aktivierung des intrinsischen Weges der Blutgerinnung .....	20
Abbildung 1.6	Schematischer Aufbau des C1-Inhibitor Gens.....	23
Abbildung 1.7	Verteilung der bekannten Mutationen in der HAE-Datenbank .....	26
Abbildung 1.8	3D-Modell des C1-Inhibitors (1M6Q.pdb).....	28
Abbildung 1.9	Inhibierungsmechanismus der Serpine nach dem „Branched-Pathway“-Modell.....	29
Abbildung 3.1	Ablaufschema der Genanalyse des C1-Inhibitors.....	63
Abbildung 3.2	Southern-Blot und Hybridisierung mit einer <i>C1-INH</i> -cDNA Sonde bei verschiedenen HAE-Patienten .....	64
Abbildung 3.3	Detektion großer Deletionen mittels dHPLC.....	65
Abbildung 3.4	Amplifikation der Exons des C1-Inhibitor Gens .....	67
Abbildung 3.5	Sequenzierung eines HAE-Patienten .....	67
Abbildung 3.6	Übersicht der verschiedenen Mutationen in der untersuchten Kohorte.....	68
Abbildung 3.7	Detektionsrate des genetischen Analyseprotokolls.....	75
Abbildung 3.8	Prozentuale Verteilung der 96 neuen Mutationen der untersuchten Kohorte .....	76
Abbildung 3.9	Sequenzvergleich des C1-INH verschiedener Spezies .....	77
Abbildung 3.10	Sequenzvergleich verschiedener humaner Serpine.....	78
Abbildung 3.11	Sequenzierung des Inserts nach zielgerichteter Mutagenese .....	79
Abbildung 3.12	Testprinzip des Aktivitäts-Assays.....	81
Abbildung 3.13	Extinktion bei 405 nm verschiedener C1-INH-Proteinvarianten.....	81
Abbildung 3.14	Berechnete C1-INH-Aktivität verschiedener C1-INH-Proteinvarianten.....	83
Abbildung 3.15	Western-Blot: Auftrennung verschiedener rekombinanter C1-INH-Varianten auf einem Bis-Tris 3-8 % Fertiggel.....	88
Abbildung 3.16	Western-Blot: Auftrennung verschiedener rekombinanter C1-INH-Varianten auf einem 10 % PAA-Gel .....	88
Abbildung 4.1	Prozentualer Vergleich der neu gefunden Mutationen mit Mutationen aus der Literatur .....	91
Abbildung 4.2	Verteilung der 279 bekannten Mutationen im <i>C1-INH</i> -Gen .....	91
Abbildung 4.3	C1-INH-Varianten mit einer Aktivität < 20 % .....	101
Abbildung 4.4	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und G323R.....	102
Abbildung 4.5	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L374P.....	103

---

Abbildung 4.6	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L376P.....	104
Abbildung 4.7	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L376Q.....	104
Abbildung 4.8	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und P377L.....	105
Abbildung 4.9	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L388P.....	106
Abbildung 4.10	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT, V458G und V458M.....	107
Abbildung 4.11	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und R444G.....	108
Abbildung 4.12	C1-INH-Varianten mit einer reduzierten Aktivität.....	109
Abbildung 4.13	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und R378C.....	110
Abbildung 4.14	3D-Modell des C1-INH-Varianten WT und C406R.....	111
Abbildung 4.15	Übersichtsansicht des 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und C406R+E426Q.....	112
Abbildung 4.16	C1-INH-Varianten mit einer Aktivität vergleichbar mit dem WT-Protein	113
Abbildung 4.17	3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und S233T.....	114

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Kriterien zur Diagnosestellung des HAE.....	10
Tabelle 1.2	Übersicht der verschiedenen Angioödeme .....	15
Tabelle 1.3	Nummerierung des C1-Inhibitors .....	24
Tabelle 1.4	Bekannte Polymorphismen des C1-Inhibitor Gens.....	25
Tabelle 1.5	Grundlegende Charakteristika des C1-Inhibitors.....	33
Tabelle 2.1	Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der Exons des <i>CI-INH</i> .....	43
Tabelle 2.2	Primer zur Amplifikation der dHPLC Fragmente.....	43
Tabelle 2.3	Primer zur Amplifikation der <i>CI-INH</i> -cDNA .....	44
Tabelle 2.4	Primer zur Verifizierung der C1-INH-Klone.....	44
Tabelle 2.5	Primer für zielgerichtete Mutagenese .....	45
Tabelle 2.6	Standardansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs .....	48
Tabelle 2.7	Temperaturprofil einer Standard-PCR.....	48
Tabelle 2.8	Aufreinigung des PCR-Produktes vor der Sequenzierreaktion.....	50
Tabelle 2.9	Reaktionsansatz der „Cycle Sequencing“ Reaktion.....	50
Tabelle 2.10	Temperaturprofil einer „Cycle-Sequencing“- Reaktion .....	50
Tabelle 2.11	Reaktionsansatz des Restriktionsverdau mit BclI für den Southern-Blot.....	51
Tabelle 2.12	Radioaktive Markierung der Sonden-DNA .....	52
Tabelle 2.13	Multiplex-PCR Ansatz zur Amplifikation der Fragmente .....	53
Tabelle 2.14	„Touch down“ - Temperaturprofil der Multiplex Reaktion.....	53
Tabelle 2.15	Temperaturprofil der Amplifikation der <i>CI-INH</i> -cDNA.....	54
Tabelle 2.16	Reaktionsansatz zur Spaltung des Inserts aus dem TA-Vektor .....	55
Tabelle 2.17	Reaktionsansatz zur Spaltung des Expressionsvektors pCEP4.....	56
Tabelle 2.18	Reaktionsansatz zur Ligation des Inserts mit dem Expressionsplasmid.....	56
Tabelle 2.19	Reaktionsansatz für die zielgerichtete Mutagenese .....	57
Tabelle 2.20	Temperaturprofil der Mutagenese-PCR.....	58
Tabelle 2.21	Reaktionsansatz der C1-INH-Aktivitätsmessung .....	60
Tabelle 3.1	Große Deletionen und ihre Position bei HAE-Patienten .....	66
Tabelle 3.2	Missense-Mutationen .....	69
Tabelle 3.3	Nonsense-Mutationen .....	71
Tabelle 3.4	Kleine Deletionen, Insertionen und Duplikationen.....	71
Tabelle 3.5	Splice-Site-Mutationen .....	73
Tabelle 3.6	Polymorphismen und Variationen in den Introns .....	75
Tabelle 3.7	Zusammenfassung der verschiedenen Mutationsarten in der Kohorte .....	76
Tabelle 3.8	Aktivitätsmessung verschiedener C1-INH-Proteinvarianten.....	82
Tabelle 3.9	Klinische Daten einer englischen Familie mit der Mutation M348R.....	86
Tabelle 4.1	Übersicht der Einteilung der neuen Mutationen in verschiedene Kategorien ....	92
Tabelle 4.2	Gegenüberstellung der Expressionsdaten und Auswirkungen im 3D-Modell..	115



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
AAE	<i>engl.</i> <u>a</u> quired <u>a</u> ngio <u>e</u> dema, Erworbenes Angioödem
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
B2BKR	Bradykinin-2-Rezeptor
bp	Basenpaar
C	Cytosin
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
cDNA	codierende DNA
CLS	<i>Engl.</i> <u>C</u> apillary <u>L</u> eak <u>S</u> yndrom
C-terminal	Carboxy-terminal
dHPLC	<i>Engl.</i> <u>d</u> enaturing <u>h</u> igh pressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et altera (und andere)
FKS	fötales Kälberserum
FXI	Faktor XI
FXIa	aktivierter Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIIa	aktivierter Faktor XII
G	Guanin
h	Stunde
HAE	<i>engl.</i> <u>h</u> ereditary <u>a</u> ngio <u>e</u> dema, Hereditäres Angioödem
HEK	<i>engl.</i> human embryonic kidney cells
HK	hochmolekulares Kininogen
I/R-Schaden	Ischämie/Reperfusionsschaden
IVS	<i>engl.</i> intervening sequence
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KK	Kallikrein
LPS	Lipopolysaccharid
MASP	<i>engl.</i> MBL-associated serine proteases
MBL	<u>M</u> annose <u>b</u> indendes <u>L</u> ektin
min	Minute
mRNA	messenger RNA
N-terminal	Amino-terminal
o.g.	obengenannt
OMIM	<i>engl.</i> Online Mendelian Inheritance in Man
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEDF	<i>engl.</i> pigment epithelium derived factor
PK	Präkallikrein
Plg	Plasminogen
RCL	<i>engl.</i> <u>r</u> eactive <u>c</u> enter <u>l</u> oop, reactive Schleife
RNA	Ribonukleinsäure
ST	Standardabweichung
sec	Sekunde
Serpin	<u>S</u> erin <u>P</u> rotease <u>I</u> nhibitor
T	Thymin
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
3D	dreidimensional

## Zusammenfassung

Das Hereditäre Angioödem (HAE) ist eine seltene autosomal dominante Erkrankung, die durch einen angeborenen quantitativen oder funktionellen Defekt des C1-Inhibitors (C1-INH) verursacht wird. Das C1-INH-Protein, ein Serin Protease Inhibitor (Serpin) ist der einzige Inhibitor der C1s und C1r Komponenten des klassischen Wegs der Komplementaktivierung. Weiterhin reguliert er die Aktivierung der Faktoren XI und XII im intrinsischen Teil der Blutgerinnung und die Generierung von Kallikrein im Kontaktsystem. Durch die fehlende Kontrolle dieser Systeme kommt es zur vermehrten Bildung vasoaktiver Substanzen, die für die charakteristischen Symptome wie rezidivierende, nicht juckende Schwellungen der Haut und Schleimhäute sowie krampfartige Schmerzen im Abdomen verantwortlich sind. HAE-Attacken werden durch psychologischen und/oder physiologischen Stress ausgelöst und manifestieren sich häufig isoliert im Kehlkopfbereich, wobei die Gefahr des Erstickens durch ein Larynx- oder Glottisödem droht.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die *C1-INH*-Genanalyse von 208 Familien mit 359 Mitgliedern, die aufgrund der Differentialdiagnose HAE zwischen 1999 und 2005 von spezialisierten klinischen Zentren eingesandt wurden. Bei 32 Patienten wurden durch Southern-Blot und dHPLC Untersuchungen große Deletionen des *C1-INH*-Gens nachgewiesen. Weiterhin wurden durch Komplett-Sequenzierung der 8 Exons und angrenzenden Intronbereiche des Gens identifiziert. Bei 96 Familien mit 172 Mitgliedern wurden 80 verschiedene Punktmutationen nachgewiesen, die bei Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht in der Literatur beschrieben waren. Die HAE-Datenbank kann als Folge auf insgesamt 279 bekannte Mutationen im *C1-INH*-Gen erweitert werden.

Da viele Patienten Missense-Mutationen unbekannter Kausalität aufwiesen, wurden 29 anhand ihrer Lokalisation oder Homologie ausgewählte Mutationen durch zielgerichtete Mutagenese in einen Expressionvektor eingefügt und anschließend in HEK-293 Zellen exprimiert. Die Funktion der rekombinanten Proteine wurde mittels eines C1-INH-Aktivitäts-Assays überprüft. Während bei den meisten rekombinant exprimierten mutanten Proteinen die Kausalität für das HAE durch sehr geringe C1-INH-Restaktivitäten bestätigt werden konnten, zeigten einige mutante Proteine kaum beeinträchtigte Aktivitäten. Die zugrunde liegenden Punktmutationen dürften deshalb sehr seltene Polymorphismen sein. Um weiteren Aufschluss über die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen zu erhalten, wurden diese in ein 3D-Modell des C1-INH eingebaut und mit einem wildtypischen C1-INH-Modell verglichen. Das verfügbare Modell, das nicht auf Strukturdaten, sondern auf der

Homologie zu anderen Serpinen beruht und nur die Serpindomäne erfasst, erwies sich jedoch bei einigen inaktivierenden Mutationen als unzureichend bzw. unvollständig.

Die *C1-INH*-Gendiagnostik konnte in den meisten Fällen eine Mutation bei den betroffenen Familien nachweisen und auch Mutationsträger vor der Erstmanifestation lebensbedrohender Symptome identifizieren. Die rekombinante Expression und Aktivitätsmessung mutanter C1-INH-Proteine ist ein nützliches Hilfsmittel um die Kausalität von Missense-Mutationen aufzuklären und liefert wertvolle Einblicke in die Funktion individueller Aminosäuren im C1-INH-Protein.

## Summary

Hereditary Angioedema (HAE) is a rare autosomal dominant disease due to quantitative or functional deficiency of the C1 inhibitor (C1-INH) protein. The C1-INH protein, a serine protease inhibitor (serpin), is the sole inhibitor of the C1r and C1s components of the classical complement pathway and the major regulator of factors XI and XII in the intrinsic blood coagulation and of plasma kallikrein in the contact system. With C1-INH deficiency, proper control of these systems is lacking and vasoactive peptides are generated in excess and are responsible for the characteristic symptoms like recurrent non pruritic swellings of the skin or mucosa as well as painful crampi of the abdomen. HAE episodes are triggered by psychological and/or physiological stress and often manifest in the laryngeal region with the risk of suffocation.

This thesis describes the genetic analysis of the *C1-INH* gene in 208 families with 359 members which were suspicious for HAE and were sent from specialised outpatient clinics from 1999 to 2005. In 32 patients large deletions of the *C1-INH* gene were detected by Southern-Blot and dHPLC. Sequencing of all 8 exons and flanking intronic regions revealed 93 point mutations and small deletions/insertions. In 96 families with 172 members 80 different point mutations were detected which have not been published in the literature yet. As a result the HAE-database can be enlarged to 279 known mutations in the *C1-INH* gene.

A large number of patients presented with missense mutations of unknown causality. On the basis of their localisation or homology, 29 mutations were chosen and inserted into an expression vector by site-directed mutagenesis and expressed in HEK-293 cells. The activity of the recombinant proteins was measured by a functional C1-INH assay. While most recombinant proteins resulted in almost no detectable activity thus verifying their causality for HAE, some mutant proteins showed only a reduced activity compared to wildtype. The underlying point mutations are therefore likely to be rare polymorphisms. In order to gain further insight into the effects of different mutations they were modelled into a 3D-model of the C1-INH protein and compared to a wildtype model of the C1-INH. While the model demonstrated remarkable structural alterations for some mutations it failed to do so for other clearly inactivating mutations. Since no 3D-crystallography of C1-INH is available yet, the model is based on sequence similarity of the serpin domain to other serpins with apparent limitations.

Routine genetic analysis of the C1-INH gene has identified mutations in most of the HAE families and has characterised several HAE carriers prior to manifestation of life threatening symptoms.

Recombinant expression and measurement of the activity of mutated C1-INH proteins is a useful tool to elucidate the causality of missense mutations and helps to characterize the role of individual amino acid residues within the C1-INH protein.

# 1 Einleitung

Ein Ödem ist durch den Austritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem und deren Ansammlung im interstitiellen Raum gekennzeichnet. Das Angioödem, ein selbst-limitierendes, transientes lokales Ödem der Subkutis oder Submucosa kann durch verschiedenste Gründe ausgelöst werden:

- Allergie (idiopathisches Angioödem)
- Reaktion auf Medikamente (ACE-Hemmer)
- Erworbener C1-Inhibitor Mangel
- Hereditärer C1-Inhibitor Mangel

In dieser Arbeit sollen die genetischen Ursachen des Hereditären C1-Inhibitor mangels und dessen Auswirkung näher untersucht werden.

## 1.1 Das Hereditäre Angioödem (HAE) - Historischer Überblick

Fast 100 Jahre bevor Donaldson und Evans 1963 zeigen konnten, dass bei Patienten mit Hereditärem Angioödem eine Defizienz des C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH) die pathophysiologische Grundlage ist (Donaldson and Evans, 1963) veröffentlichte Heinrich I. Quincke eine erste detaillierte Beschreibung akut umschriebener Hautödeme mit familiärer Anamnese (Quincke, 1882).

1888 schilderte Osler den autosomal dominanten Erbgang der Erkrankung und führte die traditionelle Bezeichnung „Hereditäres angioneurotisches Ödem“ ein (Osler, 1888). Da aber keine neurologischen Ursachen in der Pathogenese vorliegen, setzte sich die Bezeichnung „Hereditäres Angioödem“ (*engl. hereditary angioedema*, HAE) durch.

Eine erworbene Form des C1-Inhibitor Mangels wurde erstmals zu Beginn der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben (Caldwell et al., 1972)

## 1.2 Das klinische Syndrom HAE

### 1.2.1 Klassifizierung des HAE

Das HAE (OMIM:106100) wird durch einen quantitativen oder funktionellen Defekt des C1-Inhibitors verursacht. Es werden zwei Formen unterschieden, die autosomal dominant mit unterschiedlicher Penetranz vererbt werden (Donaldson and Evans, 1963; Rosen et al., 1965):

#### *HAE Typ I*

Ungefähr 85 % aller Patienten besitzen ein HAE Typ I. Dabei führt eine fehlerhafte Expression des Genprodukts eines Allels zu einer verminderten Konzentration und verminderter Aktivität des C1-INH im Plasma betroffener Patienten.

#### *HAE Typ II*

15 % der Patienten weisen ein HAE Typ II auf. Das C1-INH-Protein, das im Plasma betroffener Patienten in normalem oder sogar erhöhtem Spiegel vorliegt, hat bei dieser Form eine verringerte Aktivität.

In beiden Fällen ist die Krankheit mit einer verringerten Aktivität des C1-Inhibitors, verringerten Plasmaspiegeln der Komplementkomponente C4 und normalen Plasmaspiegeln der Komponente C3 assoziiert. Die Konzentration der Komponente C1q ist, abgesehen von akuten Attacken, ebenfalls normal.

Genauere Zahlen zur Inzidenz und Prävalenz des HAE gibt es nicht. Schätzungen gehen von einer Häufigkeit des HAE weltweit von 1 in 10,000 bis 1 in 50,000 Menschen aus. Es wird aber mit einer sehr hohen Dunkelziffer gerechnet.

### 1.2.2 Klinische Symptome des HAE

Das klinische Bild des HAE ist charakterisiert durch akut auftretende tiefe Schwellungen der Haut und Schleimhäute, die sich nach zwei bis fünf Tagen spontan zurückbilden (Frank et al., 1976). Rezidive können nach tage- bis jahrelangen beschwerdefreien Intervallen auftreten.

Typischerweise sind die subepidermal gelegenen Ödeme weiß und teigig, nicht schmerzhaft, nicht juckend und nicht mit Urtikaria assoziiert. Häufige Lokalisation sind Gesicht, Hals und Extremitäten aber auch Genitalien und Gesäß. Angioödeme der Haut können zu schweren Deformationen führen, die das soziale Leben sehr beeinträchtigen können, aber keine bleibenden körperlichen Schäden hinterlassen.

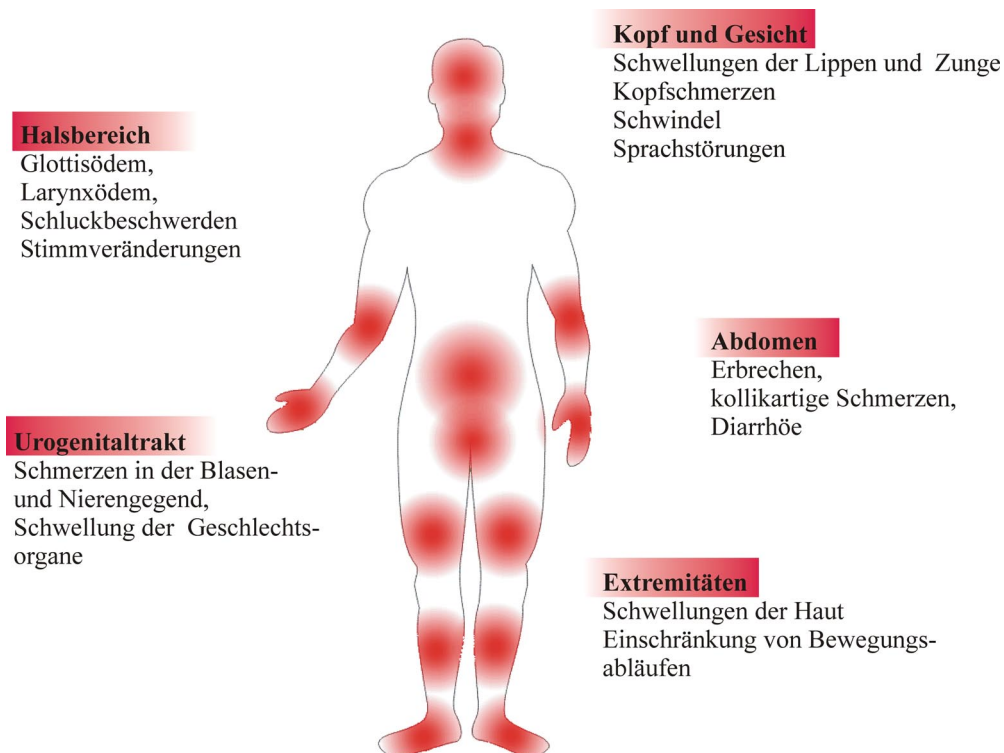


Abbildung 1.1 Übersicht der klinischen Symptome des HAE

*Beim Krankheitsbild HAE können Schwellungen in allen Bereichen des Körpers auftreten.*

In über 70 % der Fälle treten Schleimhautödeme an inneren Organen auf, die sich in kolikartigen Krämpfen, Erbrechen und Diarrhoe äußern (Frank et al., 1976). Nicht selten wird die gastrointestinale Symptomatik als „akutes Abdomen“ mit der Folge einer explorativen Laparotomie fehlinterpretiert. Ungefähr ein Drittel aller Patienten mit fehlender HAE-Diagnose werden nach einer gastrointestinalen Attacke unnötigerweise operiert (Agostoni and Cicardi, 1992; Carugati et al., 2001). In Einzelfällen kann es durch den extravasalen Flüssigkeitsverlust zum hypovolämischen Schock kommen.

Das Auftreten von Ödemen im Gastrointestinaltrakt durch C1-INH-Mangel ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu Ödemen anderen Ursprungs, da hier abdominelle Attacken nur sehr selten auftreten.

Häufig manifestiert sich eine HAE-Attacke isoliert im Kehlkopfbereich, wobei die Gefahr des Erstickens durch ein Larynx- oder Glottisödem droht. Die Häufigkeit von Schleimhautödemen der oberen Luftwege wird mit ca. 50 % angegeben. Frühe Symptome sind Schluckbeschwerden und insbesondere das Auftreten von Heiserkeit und Stimmveränderungen, welche auf die akute, progrediente Atemwegsverlegung hinweisen (Bork and Barnstedt, 2001).



Im Gegensatz zu einem Ödem im Rahmen eines anaphylaktischen Geschehens (z.B. durch Bienengift) bildet sich das Larynx- oder Glottisödem bei der HAE-Attacke meist nicht so rasch, sondern in einem Zeitraum von etwa 30 Minuten aus (Kreuz et al., 1998).

Neurologische Manifestationen und mögliche zerebrale Ödeme mit Krampfanfällen sind sehr seltene Symptome einer HAE-Attacke (Agostoni et al., 2004).

### **1.2.3 Auslösende Faktoren**

HAE-Attacken können durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Nicht nur Traumen wie Operationen (z.B. Tonsillektomien) oder Zahnextraktionen, sondern auch Mikrotraumen, Insektenstiche, Stress, vermehrte körperliche Anstrengung, Menstruation, Einnahme von Medikamenten (z.B. östrogenhaltige Kontrazeptiva) oder bestimmte Nahrungsmittel sind als Triggerfaktoren beschrieben worden.

Oft treten die Attacken aber auch ohne jegliche erkennbare Auslöser auf (Agostoni et al., 2004).

### **1.2.4 Erstmanifestation und Frequenz der Attacken**

Etwa die Hälfte der Patienten entwickelt die ersten Symptome im ersten Lebensjahrzehnt, ein weiteres Drittel der Patienten wird vor dem 20. Lebensjahr auffällig. Eine Erstmanifestation im späteren Erwachsenenalter ist eher selten und tritt nur bei ca. 5 % aller HAE-Patienten auf (Agostoni et al., 2004).

Die Anzahl und Schwere der Attacken variiert nicht nur inter- sondern auch intraindividuell und korreliert nicht mit der Restaktivität des C1-INH.

Ein Drittel der unbehandelten Patienten hat durchschnittlich mehr als eine Attacke pro Monat, wobei ein weiteres Drittel der Patienten eine milde Verlaufsform der Krankheit mit nur wenigen Attacken pro Jahr aufzeigt. Nichtsdestotrotz können auch Patienten mit einer leichteren Form des HAE lebensbedrohende Kehlkopfattacken entwickeln (Bork and Ressel, 2003). Die Anzahl und Schwere nimmt häufig im Erwachsenenalter zu. Eine geringe Anzahl der Patienten, die im Rahmen einer Familienanamnese als HAE-Patienten detektiert wurden, bleibt klinisch jedoch symptomfrei.

Eine Korrelation spezifischer Mutationen mit phänotypischen Aspekten wie Alter bei Erstmanifestation oder Häufigkeit und Schwere der Anfälle blieb bislang erfolglos. Das weist

darauf hin, dass beim HAE, wie bei vielen anderen genetischen Erkrankungen, zusätzliche genetische Faktoren, aber auch die Umwelt wichtige modulierende Faktoren darstellen (Cicardi et al., 2005).

Die Hypothese, dass die Häufigkeit der Attacken mit einem Polymorphismus im Bradykinin-Rezeptor zusammenhänge, konnte nicht bestätigt werden (Lung et al., 1997).

Die Gruppe um Farkas konnte jedoch zeigen, dass HAE-Patienten, die mit *Helicobacter pylori* infiziert sind, anfälliger für Attacken sind (Farkas et al., 2001). Die Behandlung der Infektion reduzierte signifikant die Anfallshäufigkeit von Attacken des Magen-Darm-Traktes.

### 1.2.5 Diagnose des HAE

Die Diagnose des HAE wird durch die Anamnese sowie anhand der klinischen Befunde und labordiagnostischen Daten gestellt. Bei der Abklärung eines Verdachtsfalles sollten die Konzentration und Aktivität des C1-Inhibitors bestimmt werden. Da der Komplementfaktor C4 sowohl bei HAE Typ I als auch Typ II häufig erniedrigt ist, sollte er zur Diagnosesicherung mitbestimmt werden.

Ein hereditäres Angioödem kann als labordiagnostisch gesichert angesehen werden, wenn eine C1-INH-Aktivität unter 30 % der Norm, sowie ein C4-Spiegel unter 50 % gemessen werden.

Differentialdiagnostisch sind erworbene Mangelzustände des C1-INH, die ohne positive Familienanamnese meist nach dem 40. Lebensjahr im Rahmen lymphoproliferativer Erkrankungen oder infolge von Autoantikörperbildung entstehen, sowie allergisch bedingte, Histamin-vermittelte Angioödeme, die häufig mit Juckreiz und Urtikaria assoziiert sind, vom HAE abzugrenzen.

Die Tabelle 1.1 gibt eine Zusammenfassung über die Kriterien zur Diagnosestellung.

Tabelle 1.1 Kriterien zur Diagnosestellung des HAE

<b>Klinische Kriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selbstlimitierende, nicht-entzündliche subkutane Schwellungen, die oft mehr als 12 Stunden andauern und rezidivieren</li> <li>• Schmerzen des Abdomens ohne klare Einbeziehung der inneren Organe, die rezidivieren und oft mehr als 6 Stunden andauern</li> <li>• Wiederkehrende Ödeme des Larynx- oder Glottisbereiches</li> <li>• Positive Familienanamnese wiederkehrender Angioödeme, abdominale Schmerzen und/oder Larynxödeme</li> </ul>
<b>Labordiagnostische Kriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C1-Inhibitor-Antigen-Spiegel &lt; 50 % der Norm bei 2 unabhängigen Bestimmungen</li> <li>• C1-Inhibitor-Aktivität &lt; 30-50 % der Norm bei 2 unabhängigen Bestimmungen</li> <li>• Mutation im <i>C1-INH</i>-Gen, die zu einer veränderten Proteinsynthese und/oder -funktion führt</li> </ul>

## 1.2.6 Therapie des HAE

Die medikamentöse Behandlung des HAE ist wegen des Erstickenrisikos aber auch wegen der erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität unabdingbar. Die klassische Vorgehensweise besteht aus:

- a) Behandlung akuter Attacken
- b) Kurzzeit-Prophylaxe für Patienten, die potentiellen Triggerfaktoren ausgesetzt sind (z.B. medizinische Eingriffe im Oropharynx)
- c) Langzeit-Prophylaxe für Patienten mit häufig auftretenden schweren Attacken

### 1.2.6.1 Therapie mit C1-INH-Konzentrat und „fresh frozen“-Plasma

Akute Attacken werden durch die intravenöse Gabe von C1-INH-Konzentrat (Berinert<sup>®</sup>) behandelt. Diese Behandlungsmöglichkeit ist seit mehr als 20 Jahren in den meisten europäischen Staaten etabliert (Agostoni et al., 1980), jedoch in den USA noch nicht anerkannt. Da C1-INH-Konzentrat aus humanem Plasma aufgereinigt wird, ist eine Virusinaktivierung zwingend erforderlich.

C1-INH-Konzentrat kann ebenfalls für die Kurzzeit- und Langzeit-Prophylaxe eingesetzt werden.

In Fällen, in denen das C1-INH-Konzentrat nicht verfügbar ist, kann zur Behandlung akuter Attacken ebenfalls „fresh frozen“-Plasma eingesetzt werden, wobei eine Virussicherheit nicht gewährleistet ist und Nebenwirkungen auftreten können.

### 1.2.6.2 Therapie mit Androgenen

Vor 40 Jahren wurde die Entdeckung gemacht, dass attenuierte Androgene die Häufigkeit der Ödemattacken beim HAE reduzieren und so als Prophylaxe dienen können. Die tägliche Einnahme von 2 mg Stanazol oder 50-200 mg Danazol unterdrückt die Ödem-Attacken. Diese Medikamente haben aber Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Akne und Ausbleiben der Menstruation, weshalb gerade weiblichen Patienten der Einnahme kritisch gegenüberstehen.

### 1.2.6.3 Therapie mit neuen Wirkstoffen

*Icatibant*<sup>®</sup> (Jerini AG, Berlin) ist ein wirksamer Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonist, d.h. es bindet an B2-Rezeptoren und verdrängt das Peptid Bradykinin, das als Hauptverursacher der Ödementstehung gilt (siehe Abschnitt 1.5).

*DX88*<sup>®</sup> (Dyax Corporation, Cambridge, MA) ist ein neues rekombinantes Protein mit spezifischer inhibitorischer Aktivität gegen Kallikrein im menschlichen Plasma (siehe Abschnitt 1.4.2). Eine randomisierte, Placebo-kontrollierte und zwei „open label“-Studien wurden bis jetzt an mehr als 130 Patienten erfolgreich durchgeführt.

*Rekombinanter C1-INH* isoliert aus der Milch transgener Kaninchen (Pharming Technologies BV, Leiden) wurde bei 9 Attacken im Verlauf einer Phase II „open label“ Studie erfolgreich verabreicht.

## 1.2.7 Einsatzgebiete des C1-INHs jenseits der klassischen Ödemtherapie

Die Gabe von C1-INH zur Therapie und Prophylaxe gehört seit geraumer Zeit zur Behandlung des HAE. Viele andere Erkrankungen werden auch von einer Aktivierung des Komplement- und Kontaktsystems begleitet, wobei vasoaktive Peptide freigesetzt werden, die einen Entzündungsprozess weiter verstärken (Hack and Eisele, 1998). Die anti-inflammatorische Eigenschaften des C1-INH können hier ein wichtiges therapeutisches Hilfsmittel darstellen.

Schwere **Sepsis und septischer Schock** sind entzündliche Prozesse, die durch bakterielle Infektionen ausgelöst werden. Trotz des Einsatzes verschiedener Antibiotika ist die

Mortalitätsrate mit 20-50 % sehr hoch. Im Plasma septischer Patienten wird C1-INH durch die neutrophile Elastase inaktiviert und liegt deshalb in geringerer Konzentration vor (Nuijens et al., 1989; Nuijens et al., 1988). Bei einer Sepsis ist die Aktivierung des Komplementsystems für den Patienten nicht immer von Nutzen. Zwar ist eine Aktivierung für die Bekämpfung der Bakterien unerlässlich, kann aber, wenn sie zu stark ausfällt, die Erkrankung verschlimmern. Durch die Gabe von C1-INH kann der klassische Weg des Komplementsystems reguliert werden, wobei der unbeeinträchtigte alternative Weg nach wie vor zur Opsonisierung der Bakterien führt (siehe Abschnitt 1.4.1). In einem Sepsismodell, bei dem Pavianen lebende *E.coli*-Bakterien intravenös verabreicht wurden, verringerte die Gabe von C1-INH die Komplementaktivierung (besonders des Komplementfaktors C4) und verbesserte die Überlebensrate der Tiere erheblich (Jansen et al., 1998).

Häufig wird eine Sepsis von einem **Capillary-Leak-Syndrom (CLS)** begleitet, wobei es infolge einer Aktivierung des Komplement- und Kontaktsystems zu einer Endothelschädigung und zum Verlust von intravasaler Flüssigkeit und Serumproteinen in das Interstitium kommt. Als Folge können ein hypovolämischer Schock und ein irreversibles Multiorganversagen auftreten. Aber auch bei starken Verbrennungen, im Rahmen einer Interleukin-2-Therapie von Tumoren oder einer Knochenmarkstransplantation kann als Komplikation das CLS auftreten. Der positive Effekt einer hohen Gabe von C1-INH wurde in mehreren Fallbeispielen beschrieben (Kirschfink and Nurnberger, 1999; Nurnberger et al., 1997; Radke et al., 2000), eine generelle Therapieempfehlung wird sich aber auf die Ergebnisse noch ausstehender kontrollierter Studien stützen müssen.

Ein Blutverlust (Ischämie) zerstört metabolisch aktives Gewebe nicht nur durch den akuten Sauerstoffmangel, sondern auch durch sekundäre Entzündungsreaktionen als Folge einer lokalen Aktivierung des Komplementsystems. Eine Reperfusion führt paradoxerweise zu einer weiteren Schädigung des Gewebes, da durch den Rückfluss des Blutes das Komplementsystem durch den Kontakt mit Komponenten des zerstörten Gewebes (Mitochondrienmembranen, Intermediärfilamente usw.) zusätzlich aktiviert werden kann (Monsinjon et al., 2001). In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Organe transgener Mäuse, die C1-INH überexprimieren, bei einem herbeigeführtem **Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R)** besser vor einer Zellschädigung geschützt sind (Inderbitzin et al., 2004).

Nach einem Myokardinfarkt ist die frühzeitige Reperfusion des betroffenen Gewebes von entscheidender Bedeutung für die bleibende Pumpfunktion des geschädigten Herzens, kann

aber auch zu einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes führen. Tierexperimentelle Studien (Horstick et al., 2001) und auch erste humane Studien (de Zwaan et al., 2002) geben Hinweise darauf, dass der frühzeitigen Anwendung von C1-INH eine kardioprotektive Rolle bei der Behandlung zukommt. I/R-Schäden können auch bei Organtransplantationen auftreten. Durch die intravenöse Gabe des C1-INH vor der Implantation oder durch Zugabe des Inhibitors in die Transportflüssigkeit des Organs können die Schäden verhindert werden (Bergamaschini et al., 2001).

### 1.3 Weitere Formen des Angioödems

#### *AAE (engl. aquired angioedema), erworbenes Angioödem*

Caldwell beschrieb zum ersten Mal erworbene Angioödeme (AAE) durch einen Mangel an C1-Inhibitor (Caldwell et al., 1972). Charakteristisch ist der verstärkte Verbrauch des C1-INH und eine Hyperaktivierung des klassischen Wegs des Komplementsystems (Melamed et al., 1986). Als Konsequenz haben AAE-Patienten kaum nachweisbare Serumspiegel und/oder Aktivitäten von C1-INH, C4, C2 und C1q, r, s.

Die klinischen Symptome ähneln denen eines HAE und beinhalten subkutane Schwellungen, kolikartige Schmerzen im Abdomen und Schwellungen des Respirationstraktes.

AAE unterscheidet sich von HAE durch eine fehlende Familiengeschichte und ein spätes Auftreten der Symptome oft erst nach dem vierten Lebensjahrzehnt (Agostoni and Cicardi, 1992).

Man unterscheidet verschiedene Formen des AAE :

- **AAE Typ I:**

AAE Typ I tritt häufig als Begleiterkrankung einer lymphoproliferativen Erkrankung auf. Es konnte gezeigt werden, dass neoplastische Gewebe C1-INH und andere Komponenten des Komplementsystems übermäßig verbrauchen können (Schreiber et al., 1976). Nach Ausheilen der Haupterkrankung können die Symptome wieder verschwinden.

- **AAE Typ II**

1986 wurden zum ersten Mal Autoantikörper gegen C1-INH bei Patienten mit AAE entdeckt (Jackson et al., 1986). Im Plasma der AAE Typ II Patienten wurden erhöhte Spiegel an gespaltenem C1-INH festgestellt, was zur Annahme führte, dass die Autoantikörper die Spaltung des C1-INH durch seine Zielproteasen verstärken und deren Inaktivierung verhindern (Jackson et al., 1989).

### ***Medikamenten-induzierte Angioödeme***

ACE-Inhibitor-induzierte Angioödeme entstehen bei ca. 0,1-0,5 % aller Patienten, die dieses Medikament zur Senkung des Blutdrucks einnehmen. ACE (Angiotensin Converting Enzyme) ist eine Peptidase, die im Renin-Angiotensin-System bei der Aufrechterhaltung des Blutdruckes und der Regulierung des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes von großer Bedeutung ist. ACE aktiviert dabei sowohl Angiotensin I als auch Bradykinin.

Ödeme als Nebenwirkung einer Behandlung mit ACE-Inhibitoren können auch noch Jahre nach Absetzen der Therapie auftreten, wodurch sich die Diagnose erheblich erschwert (Agostoni et al., 2004).

In seltenen Fällen wurden Angioödeme auch nach der Einnahme von AngiotensinII (ATII)-Rezeptor-Antagonisten berichtet (Irons and Kumar, 2003). Es ist jedoch noch unklar, ob diese beiden Reaktionen dem gleichen Mechanismus folgen.

### ***Allergisches Angioödem***

Die häufigste Ursache eines Angioödems ist eine allergische Reaktion auf Nahrungsmittel, Insektenstiche, etc. Dabei wird nach Kontakt mit einem Allergen die Ausschüttung von Histaminen und anderen Mediatoren aus Mastzellen durch IgE-Antikörper induziert. Die Behandlung erfolgt mit Antiallergika, in schweren Fällen auch mit Cortison.

### ***Idiopathisches Angioödem***

Beim idiopathischen Angioödem können die Schwellung und/oder Urtikaria bis zu 6 Wochen bestehen. Die Behandlung erfolgt mit Antihistaminika.

### ***Östrogen-abhängiges Angioödem (früher HAE Typ III)***

Bork et al. beschrieben eine neue Art des Angioödems, das nur bei Frauen auftritt (Bork et al., 2000). Die Symptome spiegelten die eines funktionalen C1-INH-Mangels wieder, wobei Konzentration und Aktivität des Proteins jedoch im Normalbereich lagen. Bei den Frauen der Indexfamilie kam es nur während Zeiten erhöhter Östrogen-Spiegel (Schwangerschaft, Einnahme oraler Kontrazeptiva, Östrogen-Ersatz-Therapie) zu HAE-ähnlichen Attacken. Eine genetische Analyse konnte keine Veränderungen im *C1-INH*-Gen oder der regulierenden 5'-Region nachweisen.

Eine Beschreibung dieser neuen Art des Angioödems als HAE Typ III wurde als irreführend abgelehnt, da der genetische Defekt, der für die Erkrankung ausschlaggebend ist, noch nicht aufgeklärt werden konnte und nicht mit den klassischen Typen I und II in Verbindung

gebracht werden sollte. Vielmehr wurde der Vorschlag gemacht, die Patientinnen aufgrund ihrer Phänotypen zu klassifizieren und die Bezeichnungen „Östrogen-abhängiges hereditäres Angioödem“ und „Östrogen-assoziiertes hereditäres Angioödem“ zu verwenden.

Tabelle 1.2 Übersicht der verschiedenen Angioödeme  
(Verändert nach (Gupta et al., 2004)) k.V.: keine Vererbung

Typ	Ätiologie	Vererbung	C1-INH-Spiegel	C1-INH-Aktivität	C4-Spiegel	C1q-Spiegel	Behandlung
<b>HAE Typ I</b>	Quantitativer Mangel des C1-INH	Autosomal dominant	5-30 % der Norm	Verringert	Niedrig	Normal	C1-INH-Konzentrat
<b>HAE Typ II</b>	Qualitativer Mangel des C1-INH	Autosomal dominant	Normal oder Erhöht	Verringert	Niedrig	Normal	C1-INH-Konzentrat
<b>AAE Typ I</b>	Erhöhter Verbrauch des C1-INH	k.V	Erniedrigt	Erniedrigt	Niedrig	Erniedrigt	C1-INH-Konzentrat
<b>AAE Typ II</b>	Autoantikörper gegen C1-INH	k.V	Normal oder erniedrigt	Erniedrigt	Niedrig	Erniedrigt	Unterdrückung des Immunsystems
<b>Medikamenten induziertes Angioödem</b>	Überproduktion des Bradykinins	k.V	Normal	Normal	Normal	Normal	Absetzen des ACE-Hemmers
<b>allergisches Angioödem</b>	Produktion von Histaminen	k.V	Normal	Normal	Normal	Normal	Antiallergika, Cortison
<b>idiopathisches Angioödem</b>	Produktion von Histaminen	k.V	Normal	Normal	Normal	Normal	Antihistaminika
<b>Östrogen-abhängiges Angioödem</b>	HAE-ähnliche Attacken bei erhöhtem Östrogenspiegel	??	Normal	Normal	Normal	Normal	



## 1.4 Pathophysiologie des C1-INH

C1-Inhibitor reguliert die Aktivierung von drei so genannten „Plasma-Kaskaden-Systemen“ (Nielsen et al., 1996):

- den klassischen Weg und den MBL (Mannose-bindendes Lektin) Weg des Komplementsystems durch den Effekt auf C1r, C1s und die MASPs (engl. *MBL-associated serine proteases*)
- das Kontaktsystem durch den Effekt auf Kallikrein und aktivierten Faktor XII
- den intrinsischen Weg der Blutgerinnung durch den Effekt auf aktivierten Faktor XI

Die klinische Symptomatik des HAE entsteht durch eine unkontrollierte Aktivierung der genannten Systeme, welche aufgrund des Mangels oder vollständigen Fehlens des C1-INH auftritt. Dabei kommt es zur vermehrten Bildung vasoaktiver Substanzen, die eine Ödembildung bewirken.

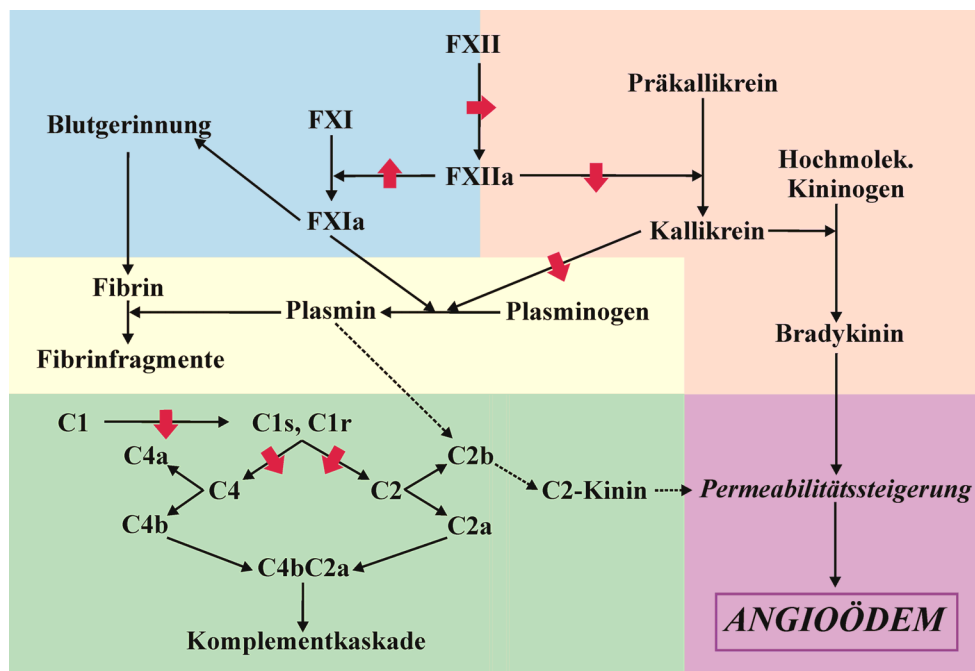


Abbildung 1.2 Übersicht über die Pathomechanismen des hereditären Angioödems und Angriffspunkte des C1-Inhibitors

Der C1-Inhibitor ist der Hauptinhibitor der Eingangsreaktion des Komplementsystems, des Kontaktsystems und der intrinsischen Blutgerinnung. Seine Angriffspunkte sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

### 1.4.1 Regulation der Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist neben den Phagozyten ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Die mehr als 30 Proteine des menschlichen Komplementsystems sind im Blutplasma gelöst oder zellgebunden und dienen der Abwehr von Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze, Parasiten).

Es gibt drei Aktivierungswege:

- den klassischen Weg (Aktivierung über Antikörper)
- den Lektin-Weg über MBL (Mannose-bindendes Lektin)
- den alternativen Weg (spontane Aktivierung, Antikörper-unabhängig).

Dabei werden nur die ersten beiden Wege durch den C1-Inhibitor reguliert.

Alle Aktivierungswege führen letztendlich zur Bildung des so genannten Membranangriffskomplexes und zur Lyse der Zielzellen oder des Mikroorganismus.

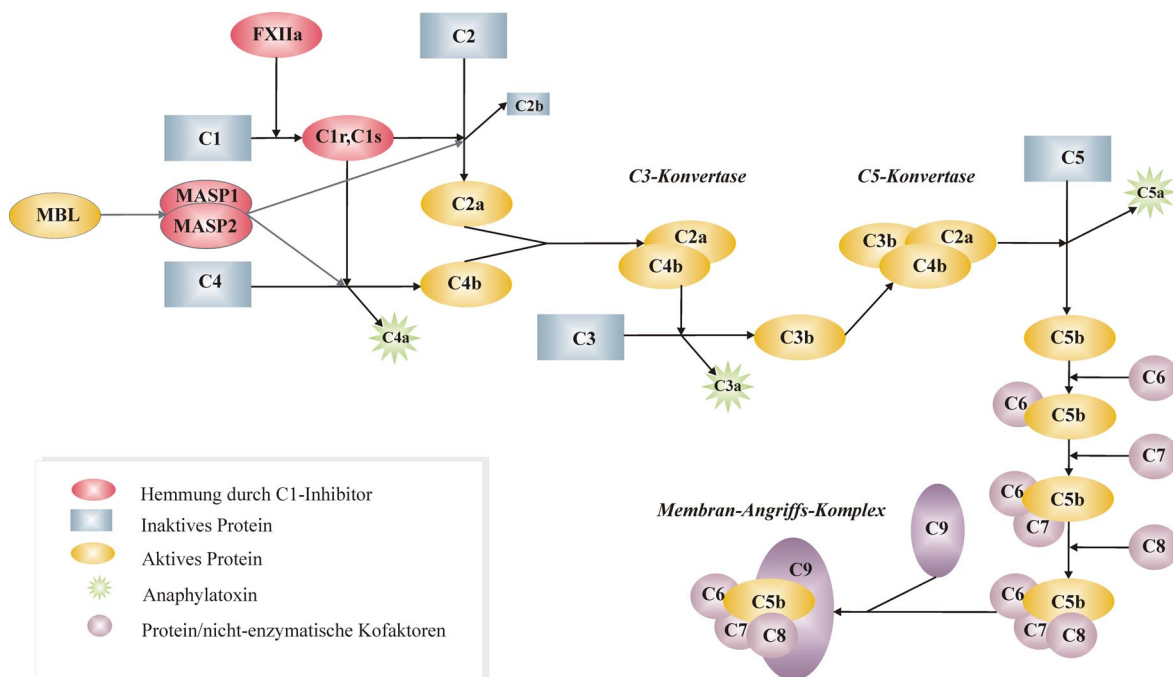


Abbildung 1.3 Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg und den Lektin Weg

Der klassische Weg wird u.a. durch Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert und führt zur Bildung der C3- und C5-Konvertasen und schließlich zur Bildung des Membranangriffskomplexes und zur Zellyse. Der Lektin-Weg wird über Bindung des MBL an antigene Oberflächen und Aktivierung der MASP1 und MASP2 angeschaltet und mündet in der Spaltung der C2 und C4-Komponente in den klassischen Weg.

Die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a vermitteln verschiedene Entzündungsreaktionen wie z.B. Veränderung der Gefäßpermeabilität und Aktivierung der Mastzellen und neutrophilen Granulozyten.

Verändert nach (Zeerleder et al., 1999)

Durch die Aktivierung der Komplementkaskade werden Anaphylatoxine (C3a, C4a, C5a) freigesetzt, die verschiedene Entzündungsreaktionen wie Veränderung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskelzelle, Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten sowie Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten vermitteln.

Im klassischen Weg der Komplementaktivierung katalysiert aktiviertes C1s die Spaltung von C2 in C2a und die aktive Untereinheit C2b, sowie die Spaltung von C4 in das Anaphylatoxin C4a und die aktive Untereinheit C4b. C2b und C4b lagern sich zur C3-Konvertase C4b2b zusammen, die mit hoher Aktivität C3 in C3b und das Anaphylatoxin C3a spalten kann.

In der Generierung von C3b vereinigen sich der klassische und alternative Weg des Komplementsystems und führen durch eine weitere Abfolge verschiedener Zymogenaktivierungen zur Entstehung des Membranangriffskomplexes.

C1-Inhibitor ist der einzige Inhibitor von C1s und C1r, und verhindert die Aktivierung des klassischen Wegs.

Im Lektin-Weg bindet das Mannose-bindende Lektin (MBL) an eine antigene Oberfläche und aktiviert dann die MBL-aktivierten Proteasen MASP1 und MASP2. Diese beiden lagern sich zusammen und katalysieren dieselben Reaktionen wie das aktivierte C1 im klassischen Weg, die Spaltung des C2 in C2a und C2b sowie die Spaltung des C4 in C4a und C4b. Auch hier bilden wieder C4b und C2b ein Heterodimer mit C3-Konvertaseaktivität.

C1-Inhibitor reguliert ebenfalls die Aktivierung der MASPs. Eine mangelnde Kontrolle der Aktivierung sowohl des C1-Komplexes als auch der MASPs führt zu einem erhöhten Verbrauch der Komponenten C2 und C4 und einer verstärkten Generierung des Anaphylatoxins C4a.

Die Komponente C3 liegt im Plasma der HAE-Patienten in normaler Konzentration vor. Sie wird nicht verstärkt aktiviert, da hier eine zusätzliche Regulierung durch das C4-binding Protein und den Faktor I eintritt.

### 1.4.2 Regulation der Aktivierung des Kontaktsystems

Das Kontaktsystem besteht aus Faktor XII (FXII), Präkallikrein (PK), hochmolekularem Kininogen (HK) und Faktor XI (FXI) (Colman, 1984). Nach Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche kommt es zur gegenseitigen Aktivierung von FXII und Präkallikrein mit Bildung von FXIIa und Kallikrein.

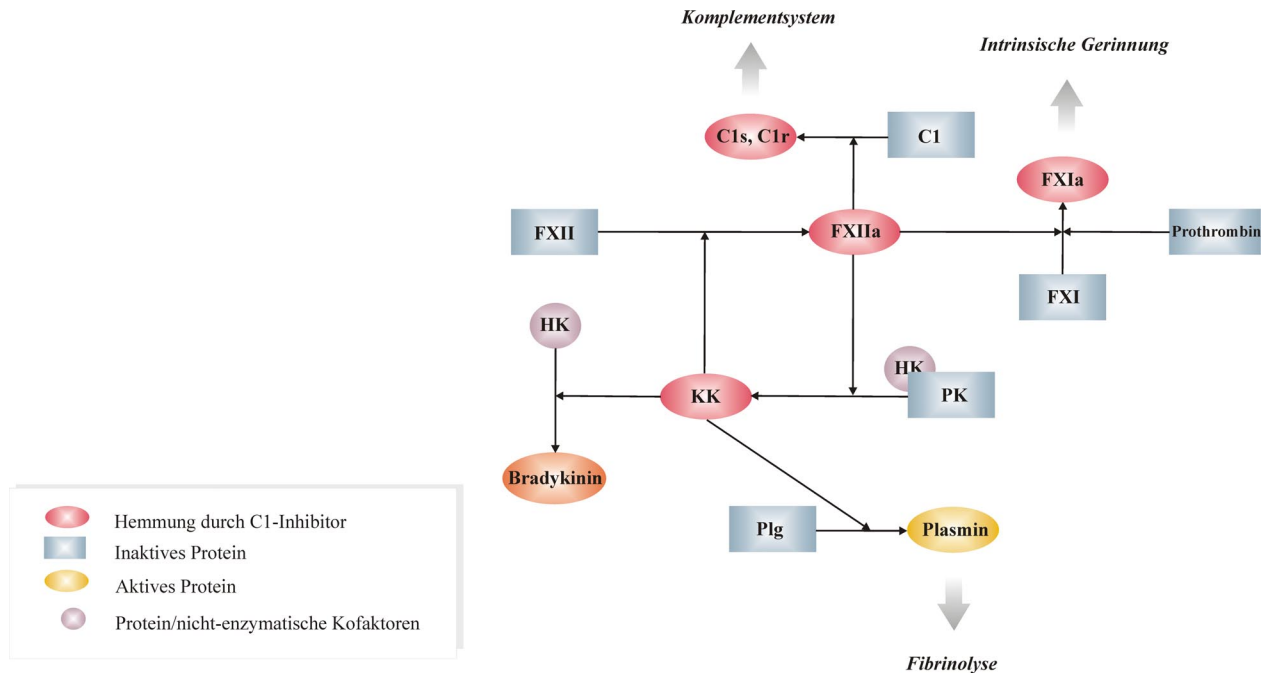


Abbildung 1.4 Aktivierung des Kontaktsystems

Nach Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche kommt es nach Aktivierung von FXII zur Bildung von Kallikrein. Als Folge wird aus hochmolekularem Kininogen das Nonapeptid Bradykinin abgespalten, das als Hauptmediator der Ödementstehung gilt.

PK: Präkallikrein, KK: Kallikrein, HK: hochmolekulares Kininogen, Plg: Plasminogen

Verändert nach (Zeerleder et al., 1999)

FXIIa verbindet über eine Aktivierung der C1-Komponente das Kontakt- mit dem Komplementsystem. Zusätzlich verbindet FXIIa über die Aktivierung von FXI zu FXIa das Kontaktsystem mit dem intrinsischen Teil der Blutgerinnung (Kaplan and Silverberg, 1987).

Kallikrein verbindet durch Konversion von Plasminogen zu Plasmin das Kontakt- mit dem fibrinolytischen System. Darüber hinaus vermittelt Kallikrein die Abspaltung des Nonapeptids Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen. Bradykinin ist ein vasodilatives Peptid und führt nach Bindung an den Bradykinin-Rezeptor-2 zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität sowie indirekt zu einer Hemmung der Thrombozytenfunktion (Wachtfogel et al., 1993) (siehe Abschnitt 1.5).

C1-Inhibitor ist der Hauptinhibitor des Kontaktsystems. Er reguliert die Aktivierung von FXII zu FXIIa und die Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein. Ein Mangel des C1-Inhibitors hat die weitere Verstärkung der Aktivierung des Komplementsystems sowie die



einer ebenfalls unkontrollierten Aktivierung der intrinsischen Blutgerinnungskaskade führt. Dabei wird verstärkt Thrombin gebildet und kann durch seine vasodilatativen Eigenschaften zur Ödembildung beitragen (Cugno et al., 1997).

Klinische Beobachtungen haben aber gezeigt, dass trotz der Bildung von Thrombin HAE-Patienten kein erhöhtes Thromboserisiko besitzen (Cugno et al., 2001).

## 1.5 Auslöser der erhöhten Gefäßpermeabilität

Die Symptome des HAE werden durch das Ausströmen von Plasma in tiefere Hautschichten ausgelöst. Dabei spielen lokal freigesetzte vasoaktive Peptide eine wichtige Rolle. Es besteht ein starker Hinweis darauf, dass Peptide, die zur Kinin-Familie gehören, hauptverantwortlich für die Entstehung der Schwellungen sind.

Zwei Substanzen werden hauptsächlich als Auslöser der Ödem-Entstehung diskutiert:

- ein Peptid, das durch die C2-Komponente des Komplementsystems erzeugt wird,
- oder Bradykinin, welches nach Aktivierung des Kontaktsystems freigesetzt wird.

### 1.5.1 Komplementzentrische Theorie

Plasmin ist in der Lage, aus dem C2b-Fragment des Komplementsystems ein C-terminales vasoaktives C2-Kinin abzuspalten (Donaldson et al., 1977; Strang et al., 1988).

Bei einer HAE-Attacke kommt es zur unkontrollierten Aktivierung des FXII, welcher Plasmin erzeugen und dadurch zur Herstellung des C2-Kinins beitragen kann (Abbildung 1.4). Die biologischen Eigenschaften des C2-Kinins sind bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird aber angenommen, dass C2-Kinin keine Vasodilatation bewirkt, was eine fehlende Hypotonie bei HAE-Patienten erklären könnte. Angioödeme sind im Allgemeinen nicht schmerzhaft. Eine lokale Injektion von Bradykinin führt zu starken Schmerzen, wohingegen die Injektion von C2-Kinin keine Schmerzen verursacht (Agostoni et al., 2004).

Dieser Mechanismus der Ödem-Entstehung durch C2-Kinin bietet aber keine Erklärung für die starke Spaltung hochmolekularen Kininogens und das Vorhandensein des Bradykinins während einer HAE-Attacke. Deshalb wird allgemein angenommen, dass C2-Kinin nur eine untergeordnete Rolle als Auslöser der Ödemattacken spielt.

### 1.5.2 Kontaktzentrische Theorie

Bei einer HAE-Attacke wird durch die unkontrollierte Aktivität des FXIIa und des Kallikreins an betroffenen Stellen das Nonapeptid Bradykinin durch Spaltung aus hochmolekularem Kininogen hergestellt (Nussberger et al., 1999) (Abbildung 1.4).

Bradykinin ist ein potentes vasoaktives Peptid, das nach Bindung an den Bradykinin-2-Rezeptor (B2BKR) die Gefäßpermeabilität erhöhen kann (Fields et al., 1983).

Sowohl bei Patienten mit HAE als auch bei Patienten mit einem ACE-Inhibitor-induziertem Angioödem konnten während einer Attacke erhöhte Bradykinin-Spiegel nachgewiesen werden. Bei AAE-Patienten wurden zusätzlich in symptomfreien Zeiten erhöhte Bradykinin-Plasmawerte gemessen, die sich nach Absetzen der ACE-Inhibitor-Therapie wieder normalisierten. Im Gegensatz dazu wurden bei HAE-Patienten erhöhte Bradykinin-Spiegel nur während der Attacken gemessen, die verstärkt in den betroffenen Bereichen auftraten (Nussberger et al., 1998).

C1-INH-Knockout-Mäuse, sowohl homo- als auch heterozygot, entwickeln keine sichtbaren Ödeme, zeigen aber eine erhöhte Gefäßpermeabilität. Werden diese Mäuse entweder mit Kallikrein-Inhibitoren (und somit einem Inhibitor der Bradykininbildung im Kontaktsystem) oder auch mit Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten behandelt, reduziert sich die Gefäßpermeabilität. Eine Behandlung mit einem ACE-Inhibitor erhöhte im Gegenteil die Permeabilität zusätzlich (Han et al., 2002).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass nicht nur erhöhte Plasmaspiegel des Bradykinins sondern zusätzliche Mechanismen wie der verringerte Abbau des Bradykinins in inaktive Spaltprodukte und eine verstärkte Umwandlung des Bradykinins in weitere aktive Substanzen bei der Entstehung der Angioödeme wichtig sind (Agostoni et al., 2004)

Dies weist darauf hin, dass Bradykinin eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Ödeme spielt.

## 1.6 Das C1-Inhibitor-Gen

1986 wurde die *C1-INH*-cDNA von drei Gruppen unabhängig voneinander sequenziert (Bock et al., 1986; Davis et al., 1986; Tosi et al., 1986) und das Gen auf Chromosom 11q11.2-q13 kartiert. Isolierung genomischer Klone erlaubte zuerst die Definition der Exon-Intron Übergänge (Carter et al., 1988) und später die Aufklärung der gesamten Nukleotidsequenz (Carter et al., 1991).

Das Gen ist 17159 bp groß und wird in eine mRNA von 1827 bp transkribiert. Es ist aus 8 Exons und 7 Introns aufgebaut, wobei das erste Exon aus 38 bp nichtcodierender Sequenz besteht und das zweite Exon ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid vor dem ersten Methionin codiert.

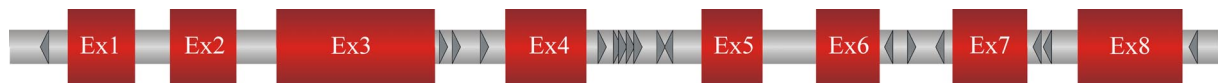


Abbildung 1.6 Schematischer Aufbau des C1-Inhibitor Gens

Das Gen besteht aus 8 Exons (rot) und Introns (grau) und beinhaltet 17 Alu-Repeats (Pfeile) in unterschiedlicher Orientierung.

Das *C1-INH*-Gen besitzt 17 Alu-Repeats, die in verschiedener Orientierung in den Introns des Gens verstreut liegen (Abbildung 1.6) (Stoppa-Lyonnet et al., 1990). Die Alu-Repeats stellen eine Hauptquelle der genetischen Instabilität dar und sind durch homologe Rekombination hauptsächlich für die Entstehung der großen Deletionen verantwortlich (Stoppa-Lyonnet et al., 1991) (siehe Abschnitt 1.6.2).

### 1.6.1 Nummerierung und Nomenklatur

#### 1.6.1.1 Nummerierung der Nukleotide

Das *C1-INH*-Gen kann auf genomischer Ebene oder auf Ebene der cDNA nummeriert werden.

Das traditionelle System der genomischen Nummerierung benennt das erste Nukleotid des Exons 1 als Nukleotid Nummer eins (Carter et al., 1991). Das entspricht der Position 1183 in der GenBank Referenz Sequenz X54486.1.

Die systematische Nummerierung der cDNA bezeichnet das Adenin des Start-Codons ATG als Nukleotid Nummer eins.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden verwendet.



### 1.6.1.2 Nummerierung der Aminosäuren

Die traditionelle Nummerierung beziffert die erste Aminosäure des prozessierten Proteins, also das erste Asparagin, als Nummer eins und zählt die Aminosäuren des Signalpeptids in negativen Zahlen, so dass das Initiator-Methionin die Aminosäure -22 ist.

Die systematische Nummerierung sieht die erste translatierte Aminosäure, also das Methionin des Start-Codons, als Aminosäure Nummer eins an.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich die traditionelle Nummerierung verwendet.

Tabelle 1.3 Nummerierung des C1-Inhibitors

Nummerierung der Nukleotide	Genomisch	g.1 : erstes Nukleotid des Exons 1
	cDNA	c.1: Adenin des Start-Codons, entspricht g. 587
Nummerierung der Aminosäuren	Traditionell	Signalpeptid wird mit negativen Zahlen nummeriert, Aminosäure Nr. 1 ist die erste Aminosäure des prozessierten Proteins; (Start-Codon ATG entspricht M-22)
	Systematisch	Beginn der Nummerierung mit der ersten translatierten Aminosäure; (Start-Codon ATG entspricht M1)

Die Nomenklatur der Mutationen in der vorliegenden Arbeit entspricht den Vorschlägen der „Nomenclature Working Group“ ([http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs/mut\\_nom.html](http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs/mut_nom.html)).

### 1.6.2 Mutationen im C1-INH-Gen

Mutationen im C1-INH-Gen können unterschiedliche Auswirkungen haben:

- Transkription einer abnormalen mRNA
- Blockierung der Transkription
- Translation eines nicht-sekretierten Proteins
- Sekretion eines dysfunktionellen Proteins

Es gibt zwei gut bekannte Mechanismen der Mutations-Entstehung beim C1-Inhibitor:

Große Deletionen und Duplikationen entstehen durch ungleiches Crossover und homologe Rekombination zwischen zwei der zahlreichen Alu-Repeats. Diese repetitiven Elemente sind dicht in den Introns 3, 4, 6 und 7 vertreten (Stoppa-Lyonnet et al., 1990) (Abbildung 1.6). Etwa 20 % aller HAE-Patienten weisen eine große Deletion auf (Tosi, 1998).

Ein zweiter Mechanismus ist eine spontane Deaminierung eines Cytosins zu Thymin in einem CpG Dinukleotid des reaktiven Zentrums. Das kann zum Austausch des Arginin 444 entweder durch ein Cystein (CGC>TGC) oder ein Histidin (CGC>CAC) führen, je nachdem ob die Deaminierung im Codon oder im Anticodon geschehen ist.

Diese Art der Mutation ist immer mit dem HAE Typ II assoziiert (Skriver et al., 1989) wobei das C1-INH-Protein im Plasma der betroffenen Patienten in normaler Konzentration vorliegt, aber keine Funktion mehr besitzt.

80 % aller kausalen Mutationen beim Hereditären Angioödem sind heterogene Punktmutationen wie Missense-Mutationen, Nonsense-Mutationen und Splice-Site-Mutationen oder kleine Deletionen oder Insertionen. Der Mechanismus der Entstehung dieser Veränderungen ist meistens unklar und (wie bereits im Abschnitt 1.2.2 beschrieben wurde) durch die Art der Mutation kann nicht auf den Phänotyp der Patienten geschlossen werden.

### 1.6.3 Bekannte Polymorphismen im C1-INH-Gen

Im C1-INH sind mehrere Polymorphismen bekannt (Tabelle 1.4).

Die Variation g.566 t>c kommt bei 4 % der gesunden Bevölkerung vor und betrifft das zweite Nukleotid des Exon 2. Dieser Teil des Exons wird zwar nicht transkribiert, ist aber Teil der kanonischen Akzeptorspleißstelle des Exons.

Der Polymorphismus Val458Met führt zu einer Aminosäuresubstitution im Exon 8 des C1-INH-Gens und kommt sowohl homo- als auch heterozygot in der gesunden Bevölkerung und bei HAE-Patienten vor.

Tabelle 1.4 Bekannte Polymorphismen des C1-Inhibitor Gens  
(Cumming et al., 2003)

Lokalisation	Veränderung	Effekt	Frequenz in der Normalbevölkerung	Frequenz bei HAE-Patienten
Exon 2	g.566 t>c	untranslatierter Bereich	0,96/0,04	0,92/0,08
Intron 6	g.14011 a>g	Intronbereich	0,28/0,72	0,32/0,68
Exon 8	c.1438 G>A	Val458Met	0,69/0,31	0,56/0,44

Cumming et al. konnten zeigen, dass keiner der oben genannten Polymorphismen bei HAE-Patienten eine nachweisbare Wirkung auf den Phänotyp hat (Cumming et al., 2003).

Es ist jedoch möglich, dass der Polymorphismus V458M sich nicht auf die Inhibierung der Zielproteasen sondern auf eine noch unbekannt Funktion des C1-INH auswirkt. Ebenso ist es

denkbar, dass andere Sequenzvariationen die Penetranz einer C1-INH-Mutation bei betroffenen Individuen verändern können.

#### 1.6.4 HAE-Datenbank

Bekannte Mutationen im *C1-INH*-Gen wurden in regelmäßigen Abständen in Übersichtsartikeln zusammengefasst (Bowen et al., 2001; Tosi, 1998). Diese Sammlungen sind aber durch die wachsende Anzahl neuer Mutationen sehr schnell veraltet.

Unter der Internet-Adresse <http://hae.biomembrane.hu> kann auf die „HAEdb C1 Inhibitor gene mutation database“ zugegriffen werden (Kalmar et al., 2005).

Die Datenbank wurde gegründet, um

- das Erfassen der genetischen Variationen des *C1-INH*-Gens
- das Sammeln wichtiger klinischer Daten
- die Suche nach bekannten Mutationen und deren Charakteristika

zu erleichtern.

Die Datenbank ist allgemein zugänglich; nur die Hinterlegung neuer Mutationen erfordert eine einmalige Anmeldung und den Zugang über ein Kennwort.

Zum Zeitpunkt des Entstehens dieser Arbeit waren 149 Punkt-Mutationen (Missense-Mutationen, Nonsense-Mutationen, kleine Deletionen und Insertionen, Splice-Site-Mutationen) und 34 große Deletionen von vier verschiedenen Laboratorien eingetragen.

Missense-Mutationen stellten mit 68 Einträgen (37 %) den Hauptteil der Veränderungen dar, gefolgt von 50 kleinen Deletionen und Insertionen (28 %). Den geringsten Anteil machen 16 Splice-Site-Mutationen (9 %) bzw. 12 Nonsense-Mutationen (7 %) aus. 34 große Deletionen sind für 19 % aller bekannten Mutationen verantwortlich.

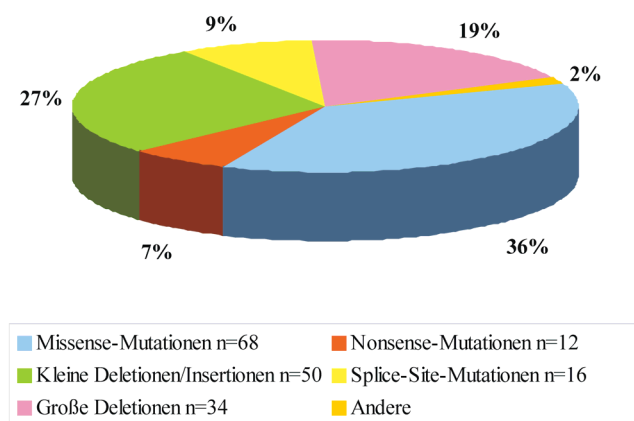


Abbildung 1.7 Verteilung der bekannten Mutationen in der HAE-Datenbank

### 1.6.5 Motivation der genetischen Analyse

Die korrekte Diagnose des HAE ist selbst für erfahrene Kliniker nicht immer einfach. Die klinischen Symptome zeigen ein überaus variables Bild und auch die laborchemisch gewonnenen Parameter liefern nicht immer den eindeutigen Beweis eines Hereditären Angioödems (Agostoni et al., 2004) (Tarzi et al., unpublished data).

Die Neumutationsrate von 10-25 % (Rosen and Davis, 2005; Verpy et al., 1996) und die damit verbundene fehlende Familienanamnese unterstreichen zudem die Wichtigkeit einer DNA-Analyse um die Diagnose HAE bestätigen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die C1-Inhibitor-Gen Diagnostik am Institut für Humangenetik verbessert und weiter ausgebaut.

## 1.7 Das C1-Inhibitor Protein

### 1.7.1 Serpine

Der C1-Inhibitor gehört zur Protein-Super-Familie der Serpine (Serin Protease Inhibitor), die ihre Zielproteasen durch einen einzigartigen „Suizid-Mechanismus“ inhibieren.

Serpine kommen in fast allen Organismen vor und haben ein breites Wirkungsspektrum. Humane Serpine wie Antithrombin,  $\alpha$ 2-Antiplasmin, PEDF (*engl.* pigment epithelium derived factor), Heparin-Cofaktor II und C1-Inhibitor spielen eine wichtige Rolle in der Regulation physiologischer Prozesse wie Blutgerinnung, Fibrinolyse, Zelldifferenzierung und Modulation von Entzündungsprozessen. Nicht-inhibitorische Serpine können als Hormonvorläufer, Hormontransporter oder intrazelluläre Chaperone dienen (Potempa et al., 1994).

#### 1.7.1.1 Struktur der Serpine

Serpine sind einkettige Proteine mit einer gemeinsamen Kernstruktur von ca. 360 AS, an die sich unterschiedliche amino- und carboxyterminale Bereiche anschließen. Obwohl die einzelnen Mitglieder der Serpin-Familie nur eine Sequenzhomologie von 30-60 % aufweisen, ist die Tertiärstruktur der verschiedenen Serpine hoch konserviert.

Die Grundstruktur der Serpine besteht aus drei  $\beta$ -Faltblättern A, B und C und meist neun  $\alpha$ -Helices (Gettins, 2002). Das reaktive Zentrum befindet sich in einer exponierten, flexiblen Region, die aus dem Molekül heraussteht. Diese reaktive Schleife (*engl.* reactive center loop,

RCL) ist zwischen 15 und 17 AS lang und verbindet die  $\beta$ -Faltblätter A und C (Abbildung 1.8).

Im C1-INH wird das reaktive Zentrum durch die Aminosäure Arg 444 gebildet und wie bei allen Serpinen als P1-Rest bezeichnet. Die N-terminal gelegenen Aminosäuren werden mit P2, P3, P4 usw. bezeichnet, die C-terminalen mit P2', P3', P4' usw. (Schechter and Berger, 1967).

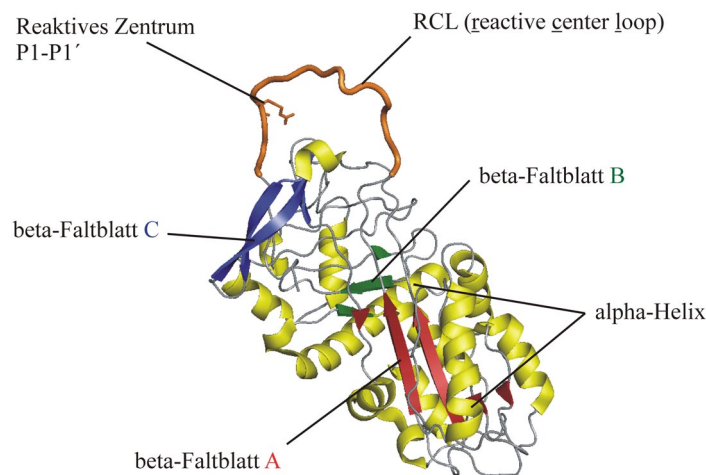


Abbildung 1.8 3D-Modell des C1-Inhibitors (1M6Q.pdb)

Alle Mitglieder der Serpinsuperfamilie weisen eine gleiche Grundstruktur auf. Die drei  $\beta$ -Faltblätter A, B und C sind in rot, grün und blau dargestellt. Der RCL (orange) bildet eine exponierte Schleife, die aus dem Molekül hervorsteht. Das aktive Zentrum P1, im Falle des C1-INH Arg444, ist für die Erkennung der Zielprotease essentiell.

## 1.7.1.2 Inhibierungsmechanismus der Serpine

### 1.7.1.2.1 Funktionelle Eigenschaften einer Serinprotease

Eine Serinprotease zeichnet sich durch ihre katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Asparagin, Histidin und Serin aus. Nach Bindung an ein zu spaltendes Molekül kommt es zu einer Konformationsänderung der Protease. Dabei gelangen die drei AS der katalytischen Triade, die normalerweise entfernt voneinander liegen, in unmittelbare Nähe zueinander und das Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe im Serin-Molekül kann auf das Histidin übertragen werden, so dass dessen Imidazolring positiv geladen ist. Die negative Ladung der Carboxylgruppe im Aspartat stabilisiert diese positive Ladung. Durch das reaktive Sauerstoffatom des Serins kann die hydrolytische Spaltung des Substrates stattfinden, wobei in einem ersten Schritt ein stabiler Acyl-Enzym-Komplex entsteht. Durch eine Deacylierung kann sich das gespaltene Substrat vom aktiven Zentrum der Protease lösen und das Enzym kann mit einem neuen Substrat reagieren (Stryer, 1996).

### 1.7.1.2.2 „Branched-Pathway“-Modell

Native Serpine liegen in einem kinetisch ungünstig gespannten Zustand vor. Durch eine Konformationsänderung bei der Inhibierung ihrer Zielproteasen gelangen sie in eine thermodynamisch günstig entspannte Form, werden dabei aber selbst zerstört („Suizid-Mechanismus“ der Serinprotease Inhibierung).

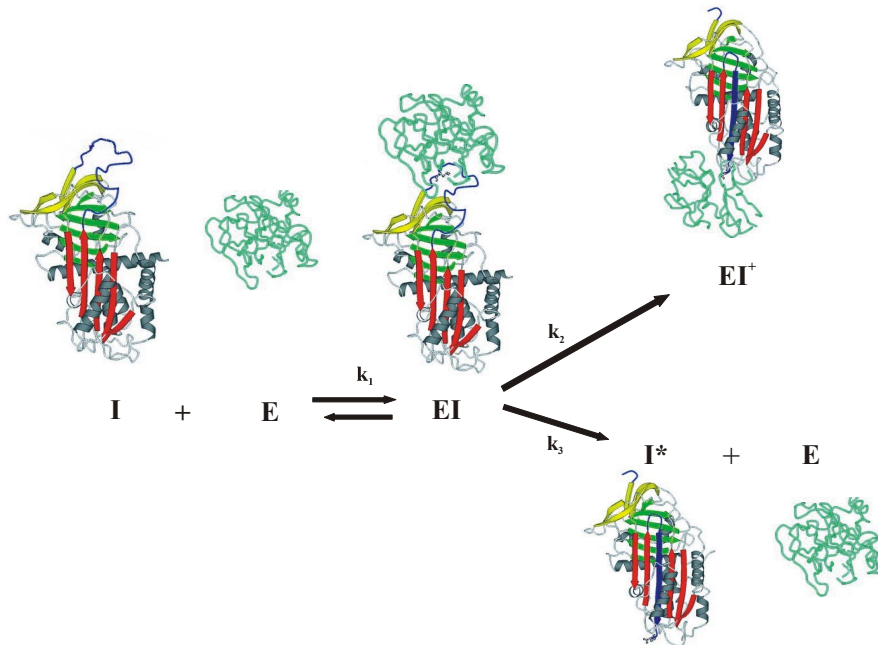


Abbildung 1.9 Inhibierungsmechanismus der Serpine nach dem „Branched-Pathway“-Modell

Der exponierte RCL des Serpins (I) wird von einer geeigneten Serinprotease (E) als Pseudosubstrat erkannt und gebunden (EI). Die Zielprotease spaltet die P1-P1'-Bindung des Serpins nach dem Mechanismus der katalytischen Triade und setzt dabei den carboxyterminalen Teil der reaktiven Schleife frei. Der aminoterminalen Teil des nun verkürzten RCL lagert sich antiparallel zwischen die Stränge des  $\beta$ -Faltblatt A ein (EI\*).  
abgeändert nach (Silverman et al., 2001)

Die Serinprotease (E) bindet im ersten Schritt reversibel an den RCL des Serpins (I) und bildet einen so genannten „Michaelis-Komplex“ (EI). An dieser nicht-kovalenten Bindung sind unter anderem flankierende Regionen der Peptidbindung um das reaktive Zentrum P1-P1' beteiligt, die mit der Substratbindetasche der Protease interagieren. Der „Michaelis-Komplex“ kann entweder unter Regenerierung des freien Enzyms und des aktiven Inhibitors dissoziieren oder die Spaltung der reaktiven Schleife führt zur Bildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates (EI). Bis zu diesem Schritt entspricht der Branched-Pathway der Acylierungsreaktion des katalytischen Triade-Mechanismus.

Im Branched-Pathway-Modell gibt es für das Acyl-Enzym-Intermediat zwei mögliche Wege: Bei der Protease-Inaktivierung inseriert die gespaltene reaktive Schleife des Serpins in das  $\beta$ -Faltblatt A unter Bildung eines irreversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI<sup>+</sup>). Im Rahmen

dieser Konformationsänderung wird die Protease um mehr als 70 Å verschoben und die katalytische Triade deformiert. Durch eine verhinderte Deacylierungsreaktion bleibt die Protease mit dem Inhibitor verbunden und wird biologisch inaktiviert. Dieser Enzym-Inhibitor-Komplex ( $EI^+$ ) wird *in vivo* innerhalb von wenigen Minuten abgebaut.

Das Acyl-Enzym-Intermediat (EI) kann aber auch einen nicht-inhibitorischen Reaktionsweg einschlagen, der zur Spaltung des Serpins ( $I^*$ ) und zur Regeneration der Protease (E) führt. Ausschlaggebend für die Wahl des Reaktionsweges ist das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Insertion des RCL ( $k_2$ ) im Vergleich zur Deacylierungsreaktion ( $k_3$ ) (Silverman et al., 2001).

Mehrere Regionen des Serpins sind für den „Suizid-Mechanismus“ der Protease-Inhibierung von entscheidender Funktion (Pappalardo et al., 2002):

- Die Hinge-Region (Scharnier)

Die AS P15-P9 vermitteln die Beweglichkeit, damit sich nach Spaltung der N-terminale Bereich des RCL als Strang in das  $\beta$ -Faltblatt A einlagern kann.

- Die Breach-Region (Lücke)

Die Region im oberen Teil des  $\beta$ -Faltblatt A ist der initiale Punkt der Insertion des RCL

- Die Gate-Region (Tor)

Damit der RCL inserieren kann, muss er das  $\beta$ -Faltblatt C umrunden.

- Die Shutter-Region (Verschluss)

Diese Region liegt im Zentrum des  $\beta$ -Faltblatts A und unterstützt die Insertion des RCL, indem sie das  $\beta$ -Faltblatt öffnet.

Die Insertionsfähigkeit des RCL ist auch von seiner Größe und der Aminosäuresequenz abhängig. Ein großer RCL kann bereits ungespalten eine latente Zustandsform einnehmen (partielle Insertion des RCL ins  $\beta$ -Faltblatt A), wodurch die Fähigkeit zur Inhibierung der Serinprotease gesenkt wird (Bos et al., 2004).

### 1.7.1.3 Mutationen bei Serpinen

Mutationen in konservierten Regionen können die Exposition und Beweglichkeit des RCL verändern und zu einem Verlust oder Veränderung der Proteinfunktion führen. Mutationen des Antithrombins führen zu einer erhöhten Thrombosegefahr, Mutationen des Antiplasmins prädisponieren für schwere Blutungen und Mutationen im C1-Inhibitor führen zur Ödembildung.

Mutationen können aber nicht nur durch Verlust oder Veränderung der Proteinfunktion zu Krankheiten beitragen. Vielmehr werden unter dem Begriff „Serpinoopathien“ Erkrankungen zusammengefasst, die durch neue Konformationen des betroffenen Proteins ausgelöst werden (Lomas and Carrell, 2002).

Alpha-1-Antitrypsin lieferte das erste Beispiel einer solchen Erkrankung. Die Z-Mutante des Proteins polymerisiert und reichert sich im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten an, wo ein Großteil der Aggregate unlösliche Einschlusskörper (*engl. inclusion bodies*) bildet. Diese Einschlusskörper sind mit Leberschäden assoziiert; 10% aller Neugeborenen mit einer homozygoten Z-Mutante entwickeln eine Leberschädigung, die oft zu einer tödlichen Zirrhose führt (Lomas et al., 1992). Eine weitere Aminosäure-Substitution (Alpha-1-Antitrypsin Pittsburgh) ändert die Spezifität der Protease von Elastase zu Thrombin, was zu starken Blutungsneigungen führt (Owen et al., 1983).

## 1.7.2 Aufbau des C1-Inhibitor Proteins

Die Translation des *C1-INH*-Gens führt zu einem 478 Aminosäuren großen Protein, dessen gemessenes Molekulargewicht von 105 kDa etwa zu einem Drittel durch eine starke Glykosylierung zustande kommt. C1-INH besitzt sechs N-glykosylierte und sieben O-glykosylierte Aminosäuren, die sich hauptsächlich im N-terminalen Bereich des Proteins befinden (Bock et al., 1986). Der N-terminale Bereich (AS -22-115) ist zudem einzigartig in der Familie der Serpine. Nur die Serpindomäne (AS 116-478) zeigt eine hohe Homologie zu anderen Familienmitgliedern.



### 1.7.3 Die N-terminale Domäne des C1-Inhibitors

Die N-terminale Domäne des C1-INH besitzt keine Homologie mit anderen Serpinen und ist mit 120 AS die längste N-terminale Domäne unter ihnen (Gettins, 2002).

Zwei Disulfidbrücken, Cys101-Cys406 und Cys108-Cys183, verbinden den N-Terminus mit der Serpindomäne (Bock et al., 1986).

Das native C1-Inhibitor-Molekül liegt nicht in der kinetisch stabilsten Form, sondern in einem metastabilen intermediären Zustand vor. Serpine haben immer das Bestreben, von ihrer gespannten Form (*engl.* „*stressed*“) in eine entspannte Form (*engl.* „*relaxed*“) zu gelangen. Die Disulfidbrücken stabilisieren die metastabile Faltung des C1-Inhibitors und verhindern den Übergang in die entspannte Form durch eine Insertion des RCL in das zentrale  $\beta$ -Faltblatt A (siehe Abschnitt 1.7.1.2.2) (Simonovic and Patston, 2000).

Die Funktion der N-terminalen Domäne ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Varianten des Proteins, die nach Deletion von Teilen der N-terminalen Domäne mit AS 76 oder 98 starten und weiterhin die stabilisierenden Disulfidbrücken ausbilden, können noch Komplexe mit den Zielproteasen C1s, C1r, FXIIa und Kallikrein bilden. Die N-terminale Domäne ist demnach nicht essentiell für die Bildung des Protease-Inhibitor-Komplexes (Coutinho et al., 1994).

Neue Studien bestätigen die anti-inflammatorischen Eigenschaften des C1-INH (Cicardi et al., 2005). Dafür ist jedoch nicht das intakte reaktive Zentrum verantwortlich, sondern vielmehr spielen die Glykosylreste, die hauptsächlich an Aminosäuren der N-terminalen Domäne gebunden sind, eine zentrale Rolle (Liu et al., 2003). Nach einem Kontakt von Endothelzellen mit inflammatorischen Mediatoren wie bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) kann es zu einem septischen Schock kommen. Gleichzeitig werden aber auch Selektine innerhalb von wenigen Minuten an den Oberflächen dieser Zellen exprimiert. Die Selektine erkennen Kohlenhydratepitope sog. Sialyl-Lewis-Epitope, die in der N-terminalen Domäne auf N-glykosidischen Resten des C1-Inhibitors vorkommen (Cai and Davis, 2003). Durch diese Interaktion wird der C1-Inhibitor an entzündlichen Stellen konzentriert und kann die Adhäsion der Leukozyten regulieren, die die Entzündung bekämpfen und einen septischen Schock verhindern (Cai et al., 2005).

Die N-terminale Domäne kann darüber hinaus eine wichtige Rolle beim Abbau des C1-Inhibitors spielen. Studien haben gezeigt, dass eine Variation der Glykosylierung die Abbaurate des Inhibitors verändert (Minta, 1981).

Tabelle 1.5 Grundlegende Charakteristika des C1-Inhibitors

---

Chromosomale Lokalisation	11q11.2-q130
Länge des Gens	17159 bp
Länge der mRNA	1827 bp
Anzahl der Exons und Introns	8 Exons, 7 Introns
Länge des Proteins	478 AS
Molekulargewicht des Proteins	105 kDa
Länge des Signalpeptids	22 AS
Anzahl N-glykosylierter AS	6
Anzahl O-glykosylierter AS	7
Disulfidbrücken	Cys 101-406; Cys 108-183

---

## 1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *C1-INH*-Gendiagnostik am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg verbessert und weiter ausgebaut werden.

Dazu wurden aus spezialisierten Zentren, der Kinderklinik Frankfurt und der Hautklinik Mainz, Proben von Patienten mit der Diagnose HAE zur Genanalyse eingesandt.

Um Punktmutationen und kleine Deletionen und Insertionen im *C1-INH* der Patienten nachzuweisen, sollte eine Komplet-Seqenzierung der Exons und angrenzenden Intronbereiche des Gens durchgeführt werden.

Große Deletionen sind bei etwa 20% aller HAE-Patienten für die Erkrankung verantwortlich. In dieser Arbeit sollten sowohl die Methoden „Southern-Blot“ als auch „dHPLC“ zum Nachweis dieser Mutationsart etabliert und eingesetzt werden.

Mit Hilfe der eingesetzten Methoden sollten die Patienten auf alle bis jetzt beschriebenen Mutationsarten des C1-INH untersucht werden.

Mit der Gendiagnostik werden vielfach Missense-Mutationen detektiert, deren Kausalität nicht ohne weiteres geklärt werden kann.

Deshalb sollten die bei Patienten gefundenen Veränderungen des C1-INH in einem Zellsystem rekombinant exprimiert und die Funktion des veränderten Proteins mittels eines Aktivitäts-Assays überprüft werden.

Ein 3D-Modell des C1-INH sollte weiterhin Aufschluss über die Auswirkung der verschiedenen Mutationen im C1-Inhibitor geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien, DNA-modifizierenden Enzyme und Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:

Adefo	MBI-Fermentas
Amersham Pharmacia	Merck (Darmstadt)
Beckman Coulter	National Diagnostics
Bio-Rad	New England Biolabs
Boehringer	Roth
Biozym	Noras
Delta-Pharma Gmbh	Schleicher & Schüll
Fluka	Serva
Hartma	Sigma-Aldrich
Invitrogen	Stratagene
	Technoclone
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP	Hartmann Analytic

### 2.2 Geräte

Autoklav	Schütt
Brutschrank	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern für horizontale Agarosegele	Gibco BRL
Elektrophoresekammern für Polyacrylamid-Gele (Proteine)	Bio-Rad
Elektrotransformator: Gene Pulser <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Eppendorf-Mikropipetten	Eppendorf
dHPLC system mit Ion pair reverse phase C18 column	WAVE, Transgenomic Ltd, Omaha
Gilson-Mikropipetten	Abimed

Heizblock	Liebisch
Magnetrührer	Ika
Netzgeräte	Consort, Gibco
pH-Meter	WTW
Photometer:	
Spektralphotometer Gene Quant	Pharmacia
Ultrospec III	Pharmacia LKB
Röntgenfilm-Entwicklermaschine :	Protec
Compact 35	
Schüttelinkubator	Braun
Sequenziergerät	Beckman Coulter
T3-Thermocycler	Biometra
UV-Transilluminator	Bachhofer
Video-Kamera	UVP
Video-Printer	Hitachi
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waagen:	
Modell Delta Range PE 3600	Mettler
Modell AE	Mettler
Wasserbäder	GFL, Köttermann
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall

### 2.3 Sonstige Materialien

Autoradiographie-Kassette	Kodak
Glasgefäße	Schott
Minireaktionsgefäße	Eppendorf
Petrischalen	Greiner
Röntgenfilme	Konica
Sterilfilter	Schleicher Schuell
Whatman Filterpapier	Whatman
Zentrifugenröhrchen (Falcon)	Becton Dickinson

## 2.4 Enzyme und Kits

### 2.4.1 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma NEB bezogen. Es wurden die jeweils dazugehörigen Reaktionspuffer verwendet.

	Erkennungssequenz
BclI	5'...T <sup>↓</sup> GATCA...3'
HindIII	5'...A <sup>↓</sup> AGCTT...3'
NotI	5'...GC <sup>↓</sup> GGCCGC...3'
DpnI	5'...GA <sup>CH<sub>3</sub>↓</sup> TC...3'

### 2.4.2 DNA/RNA modifizierende Enzyme

Taq-Polymerase	Invitrogen
Pfu-Polymerase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
RNAse H	Invitrogen

### 2.4.3 Antikörper

Anti-Human C1 Esterase Inhibitor C-8159 (developed in Goat)	Sigma
Anti-Goat IgG (Whole molecule) A-4187	Sigma

### 2.4.4 Größenstandards

100 bp Ladder	Invitrogen
KB-Ladder	Invitrogen
peqGOLDProteinmarker IV	PeqLab

### 2.4.5 Kits

DTCS-Kit	Beckmann Coulter
Nucleobond	Machery und Nagel
pCR2.1-Cloning Kit	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Rediprime <sup>TM</sup> II Random Prime Labelling System	Amersham Biosciences
Technochrom <sup>®</sup> C1-INH	Technoclone, Heidelberg

### 2.4.6 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, Roth
G418 (Geneticin)	Biochrom

## 2.5 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

XL1Blue <i>E.coli</i>	Invitrogen
HEK-293	Invitrogen

## 2.6 Plasmide und Expressionsvektoren

pCR2.1	Invitrogen
pCEP4	Invitrogen

## 2.7 Pufferlösungen und Nährmedien

### 2.7.1 DNA-Extraktion

<b>Lysispuffer</b>	155mM NH <sub>4</sub> Cl	8,29 g
	10 mM KHCO <sub>3</sub>	1,00 g
	0,1mM Na <sub>2</sub> EDTA	0,034 g
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
		pH 7,4
		autoklavieren

<b>SE-Puffer</b>	75 mM NaCl	4,39 g
	25 mM Na <sub>2</sub> EDTA	8,41 g
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
		pH 8,0
		autoklavieren

<b>TE-Puffer</b>	10mM Tris/HCl	1,21 g
	1mM EDTA	0,34 g
		ad 1000 ml
		pH 8,0
		autoklavieren

<b>Proteinase K</b>	10 mg/ml
---------------------	----------

**2.7.2 PCR**

<b>10 x PCR Puffer</b>	Tris	2,42 g
	KCl	3,72 g
		ad 100 ml H <sub>2</sub> O pH 8,4
<b>1 x PCR Puffer</b>	10xPCR-Puffer	100 µl
	Nukleotid- Stammlösung	160 µl
	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	30 µl
		Ad 900 µl H <sub>2</sub> O
<b>Nukleotidstammlösung</b>	dATP (100 mM)	12,5 µl
	dCTP (100 mM)	12,5 µl
	dGTP (100 mM)	12,5 µl
	dTTP (100 mM)	12,5 µl
		ad 1000 µl H <sub>2</sub> O
<b>10 x Pfu Puffer</b>	KCl (Endkonz. 100 mM)	0,746 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Endkonz. 100 mM)	1,32 g
	MgSO <sub>4</sub> (Endkonz. 20 mM)	0,493 g
	1M TRIS-HCl pH8,8 (Endkonz. 200 mM)	20 ml
	TritonX100 (Endkonz. 1%)	1 ml
	BSA (Endkonz. 1 mg/ml)	100 mg
		ad 100 ml aqua dest.
<b>1 x Pfu Puffer</b>	10xPfu-Puffer	100 µl
	Nukleotid- Stammlösung	160 µl
	aqua dest.	640 µl
<b>50 x TAE</b>	Tris	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA	100 ml
		ad 1000 µl H <sub>2</sub> O

<b>10 x Stop-Puffer</b>	EDTA	1,85 g
	Sucrose	25 g
	Bromphenolblau	0,05 g
		ad 50 ml H <sub>2</sub> O

### 2.7.3 Southern-Blot

**Lösung 1**                      0,25 M HCL

**Lösung 2**

NaCl (1,5 M)	438,2 g
NaOH (0,5 M)	100 g
	ad 5000 ml H <sub>2</sub> O

**20 x SSC**

NaCl (3 M)	175,3 g
Na-Citrat * 2 H <sub>2</sub> O (0,3 M)	88,2 g
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,0

**20 x SSPE**

Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O	76,0 g
EDTA	74,5 g
NaCl	210,4 g
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,0

**Church Puffer**

20 % SDS	175 ml
1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,2)	250 ml
EDTA	0,186 g
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O

**Hybridisierungspuffer**

20 x SSPE	2,25 ml
20 % SDS	0,75 ml
Magermilchpulver	17,5 mg
	ad 10 ml H <sub>2</sub> O
20 % Dextransulfat	5 ml

**Waschpuffer I**

2 x SSC	
0,1 % SDS	





### 2.7.6 Medien zur Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die Zellkulturmedien wurden bei den folgenden Firmen gekauft:

MEM with Earle's Salts with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Dulbeccos 1xPBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
FKS (fetales Kälber Serum)	PAN Biotech GmbH

### 2.7.7 Transfektion

<b>2xBBS</b>	50 mM BES	0,533g
	280 mM NaCl	0,818g
	1,4 mM	0,012g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	
		ad 50 ml H <sub>2</sub> O; pH 6,95, sterilfiltrieren

<b>2 M CaCl<sub>2</sub></b>	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	14,7 g
		ad 50 ml H <sub>2</sub> O; sterilfiltrieren

### 2.7.8 Western-Blot

<b>10 x Reservoirpuffer</b>	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	20% SDS	75 ml
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 8,6

<b>Lower Buffer</b>	Tris	91 g
	20 % SDS	10 ml
		ad 500 ml H <sub>2</sub> O; pH 8,8

<b>Upper Buffer</b>	Tris	30,5 g
	20 % SDS	10 ml
		ad 500 ml H <sub>2</sub> O; pH 6,7

<b>4x Laemmli-Puffer</b>	1M DTT	100 µl
	20 % SDS	500µl
	10x Stop-Puffer	400 µl

---

<b>Kathodenpuffer</b>	Tris	3,0 g
	6-Aminohexansäure	5,24 g
	Methanol	200 ml
	SDS	0,01%
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Anode-I-Puffer</b>	Tris	3,63 g
	Methanol	200 ml
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Anode-II-Puffer</b>	Tris	36,34 g
	Methanol	200 ml
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>10 x TBS</b>	1M Tris (pH8)	100 ml
	NaCl	90 g
		ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Blocklösung</b>	1xTBS	50 ml
	0,3% Tween 20	
	1,5% Magermilchpulver	
<b>Alkalische- Phosphatase-Puffer</b>	Tris	6,05 g
	NaCl	2,92 g
	1 M MgCl <sub>2</sub>	2,5 ml
		ad 250 ml H <sub>2</sub> O; pH 9,5
<b>BCIP 50 mg/ml</b>	in Dimethylformamid	
<b>NBT 75 mg/ml</b>	in Dimethylformamid	

## 2.8 Oligonukleotide

### 2.8.1 Primer der C1-Inhibitor Diagnostik

Tabelle 2.1 Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der Exons des *CI-INH*

\* Amplifikation in einer 2-Step-PCR

\*\* nur zur Sequenzierung des Exon 3, Exon 3 reverse wird in 2 separaten Reaktionen sequenziert

\*\*\* Zusatz von 3  $\mu$ l 5 M Betain in die PCR-Reaktion

Primer	Sequenz 5'-3'	Produkt in bp	Tm in °C
<b>Exon1F</b>	GGA TTT GGG CTA AAT TCC TG	392	58
<b>Exon1R</b>	GTA GGA GGA GGC AGAAGT CC		
<b>Exon 2F*</b>	GGG AAT TCG CTA AGA GGG AC	319	55,60*
<b>Exon 2R</b>	TCA ATG ATC CCA AGA GGA GC		
<b>Exon3F</b>	CCA CAC CTT CTC TTC CTG CT	674	58
<b>Exon3R</b>	CCA GAG GCA TGG CTT TGT AA		
<b>Exon3R2**</b>	TGG TTG TTG AGT TGG TTG TC		
<b>Exon4F***</b>	AAT ACC CTC CAT TCC AGC CT	322	58
<b>Exon4R</b>	CCC TCT GTC CTT TCT TTC CC		
<b>Exon5F</b>	GCA TGC TCA CTC TCA AAT CG	377	58
<b>Exon5R</b>	TCC GAT TGT AGA ACT TGG GG		
<b>Exon6F</b>	CCC CAA GTT CTA CAA TCG GA	315	58
<b>Exon6R</b>	ACC CCA AAA TGA TGG GAC TA		
<b>Exon7F</b>	CAG GAC AGC ATT GTG ACA GA	341	58
<b>Exon7R</b>	CTC TGA TGG CCT GGG AGT A		
<b>Exon8F</b>	GAG GAT CCC ACG AAC TGC CAG	655	58
<b>Exon8R</b>	GTG AAC TTG AAC TAG AGA AAG C		

Tabelle 2.2 Primer zur Amplifikation der dHPLC Fragmente

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
<b>HPLC-Exon1F</b>	GAA GAC CAA GCG GTC AGT	
<b>HPLC-Exon1R</b>	TCC CTA GAC CTC TTC ACT CC	268
<b>HPLC-Exon3F</b>	AAT ACC CTC CAT TCC AGC CT	
<b>HPLC-Exon3R</b>	CCC TCT GTC CTT TCT TTC CC	322
<b>HPLC-Exon4F</b>	CTC CAA GAT GCT ATT CGT TG	
<b>HPLC-Exon4R</b>	ATG TTG GTC TCC ACC TTC TT	351
<b>HPLC-Exon5F</b>	GCA TGC TCA CTC TCA AAT CG	
<b>HPLC-Exon5R</b>	TCC GAT TGT AGA ACT TGG GG	377
<b>HPLC-Exon6F</b>	GCT CCT CTT CAT CCT TTT CC	
<b>HPLC-Exon6R</b>	TAC CCC AAA ATG ATG GGA CT	285
<b>HPLC-Exon7F</b>	CAG GAC AGC ATT GTG ACA GA	
<b>HPLC-Exon7R</b>	CTC TGA TGG CCT GGG AGT A	341

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
HPLC-Exon8F	GAG GAT CCC ACG AAC TGC CAG	
HPLC-Exon8R	TTG GTG GAT AGC GGA CAC	546
HPLC-HGH-F	TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT	
HPLC-HGH-R	CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC	434

## 2.8.2 Primer zur Klonierung des C1-Inhibitors

Tabelle 2.3 Primer zur Amplifikation der *C1-INH*-cDNA

Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind fett hervorgehoben, Start- und Stop-Codon sind unterstrichen

<b>F-Primer: C1-HindIII-Start</b>	GCT GAC GAA <b>GCT</b> TCC AAG <u>ATG</u> GCC TCC AGG CTG ACC CT
<b>R-Primer: C1-NotI-Stop</b>	<b>GCGGCCGC</b> <u>TCA</u> GGC CCT GGG GTC ATA TAC TC

Tabelle 2.4 Primer zur Verifizierung der C1-INH-Klone

\*wurde mit pCEP4-F verwendet

\*\* wurde mit pCEP4-R verwendet

Primer	Sequenz	Tm in °C
pCEP4-F	AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG	58
pCEP4-R	TGTGGTTTGTCCAAACTCATC	58
Teil1-R*	AAACTCTCTGGATCCTGGGA	58
Teil5-F**	AAAGTGACGACCAGCCAGGA	58
Teil2-F	GGATAGAGCCTCCTCAA	58
Teil2-R	GCTGAGAAGGCGTGGTAGAG	58
Teil3-F	GGGGGATGCTTTGGTAGATT	60
Teil3-R	CTTCCACTTGGCACTCAGGT	60
Teil4-F	AGACAGTCTGCCCTCCGATA	58
Teil4-R	CAGCCCACACAGGTTAAGGT	58

### 2.8.3 Primer für Mutagenese am C1-Inhibitor

Tabelle 2.5 Primer für zielgerichtete Mutagenese  
Die jeweilige Basensubstitution ist hervorgehoben.

Mutation	Austausch	Position	Exon	Primer-F	Primer-R
M-22V	ATG>GTG	c.1 A>G	2	GTC GCC GCC CAG <b>GTG</b> GCC TCC AGG CTG ACC	GGT CAG CCT GGA GGC CAC CTG GGC GGC GAC
A-21V	GCC>GTG	c.5 C>T	2	GTC GCC GCC CAG <b>ATG</b> GTC TCC AGG CTG ACC	GGT CAG CCT GGA GAC CAT CTG GGC GGC GAC
N1D	AAT>GAT	c.67 A>G	3	T AGA GCC TCC TCA <b>GAT</b> CCA AAT GCT ACC AG	CT GGT AGC ATT TGG ATC TGA GGA GGC TCT A
P64A	CCC>GCC	c.256 C>G	3	AT ACC ACT GAT GAA <b>GCC</b> ACC ACA CAA CCC A	T GGG TTG TGT GGT GGC TTC ATC AGT GGT AT
E112X	GAG>TAG	c.400G>T	3	T CTC TGC TCT GAC TTG <b>TAG</b> AGT CAT TCA ACA GAG G	C CTC TGT TGA ATG ACT CTA CAA GTC AGA GCA GAG A
H114D	CAT>GAT	c.406 C>G	3	GAC TTG GAG AGT <b>GAT</b> TCA ACA GAG GCC GTG	CAC GGC CTC TGT TGA ATC ACT CTC CAA GTC
A134D	GCC>GAC	c.467 A>G	3	G AAG CTC TAC CAC <b>GAC</b> TTC TCA GCA ATG AA	TT CAT TGC TGA GAA GTC GTG GTA GAC CTT C
L156P	CTT>CCT	c.533 T>C	3	AG CAT CGC CAG <b>CCT</b> CCC TAC CCA GGT CCT	AGG ACC TGG GTA GGG AGG CTG GCG ATG CT
K179X	AAG>TAG	c.601 A>T	4	AGC ATC CTC TCT TAC <b>CCC</b> TAG GAC TTC ACC TGT GTC C	G GAC ACA GGT GAA GTC CTA GGG GTA AGA GAG GAT GCT
F203S	TTC>TCC	c.674 T>C	4	A GTC TCT CAG ATC <b>TCC</b> CAC AGC CCA GAC CT	AG GTC TGG GCT GTG GGA GAT CTG AGA GAC T
L229L	CTA>TTA	c.751 C>T	5	GC AGC CCC AGA GTC <b>TTA</b> AGC AAC AAC AGT G	C ACT GTT GTT GCT TAA GAC TCT GGG GCT GC
S233T	AGT>ACT	c.764 G>C	5	C CTA AGC AAC AAC <b>ACT</b> GAC GCC AAC TTG GA	TC CAA GTT GGC GTC AGT GTT GTT GCT TAG G
S233G	AGT>GGT	c.763 A>G	5	C CTA AGC AAC AAC <b>GGT</b> GAC GCC AAC TTG GA	TC CAA GTT GGC GTC ACC GTT GTT GCT TAG G
G323R	GGG>AGG	c.1033G>A	7	CC AAG GTG AGG CAG <b>CTG</b> CAG CTC TCC CAC A	T GTG GGA GAG CTG CAG CTG CCT CAC CTT GG
Q326X	CAG>TAG	c.1042 C>T	7	GTG GGG CAG CTG <b>TAG</b> CTC TCC CAC AAT CTG	CAG ATT GTG GGA GAG CTA CAG CTG CCC CAC
L331P	CTG>CCG	c.1058 T>C	7	CTC TCC CAC AAT <b>CCG</b> AGT TTG GTG ATC CTG	CAG GAT CAC CAA ACT <b>CGG</b> ATT GTG GGA GAG
M348R	ATG>AGG	c.1109 T>G	7	AT CGT CTT GAA GAC <b>AGG</b> GAA CAG GCT CTC A	T GAG AGC CTG TTC <b>CCT</b> GTC TTC AAG ACG AT
L374P	CTA>CCA	c.1187 T>C	7	TTC CAG CCC ACT CTC <b>CCA</b> ACA TAC CCC GCA TC	GAT GCG GGG TAG TGT <b>TGG</b> GAG AGT GGG CTG GAA
L376P:	CTA>CCA	c.1193 T>C	7	CC ACT CTC CTA ACA <b>CCA</b> CCC CGC ATC AAA GTG	CAC TTT GAT GCG GGG <b>TGG</b> TGT TAG GAG AGT GG
L376Q	CTA>CAA	c.1193 T>A	7	CC ACT CTC CTA ACA <b>CAA</b> CCC CGC ATC AAA GTG	CAC TTT GAT GCG GGG <b>TTG</b> TGT TAG GAG AGT GG
P377L	CCC>CTC	c.1196 T>C	7	C ACT CTC CTA ACA <b>CTC</b> CGC ATC AAA G	C TTT GAT GCG GAG TAG TGT TAG GAG AGT G
R378C	CGC>TGC	c.1198 C>T	7	TC CTA ACA CTA CCC <b>TGC</b> ATC AAA GTG ACG A	T CGT CAC TTT GAT GCA GGG TAG TGT TAG GA
R378H	CGC>CAC	c.1199G>A	7	TC CTA ACA CTA CCC <b>CAC</b> ATC AAA GTG ACG A	T CGT CAC TTT GAT <b>GTG</b> GGG TAG TGT TAG GA
L388P	CTC>CCC	c.1229 T>C	7	C AGC CAG GAT ATG <b>CCC</b> TCA ATC ATG GAG AA	TT CTC CAT GAT TGA GGG <b>CAT</b> ATC CTG GCT G
C406R	TGT>CGT	c.1282 T>C	8	T TAT GAC CTT AAC <b>CTG</b> CGT GGG CTG ACA GA	TC TGT CAG CCC <b>ACG</b> CAG GTT AAG GTC ATA A
Q420E	CAG>AAG	c.1323 C>A	8	AG GTT TCT GCG ATG <b>AAG</b> CAC CAG ACA GTG C	G CAC TGT CTG GTG CTT <b>CAT</b> CGC AGA AAC CT
E426Q	GAA>CAA	c.1342 G>C	8	AC CAG ACA GTG CTG <b>CAA</b> CTG ACA GAG ACT G	C AGT CTC TGT CAG <b>TTG</b> CAG CAC TGT CTG GT
S438S	TCC>TCT	c.1380 C>T	8	AG GCG GCT GCA GCC <b>TCT</b> GCC ATC TCT GTG G	C CAC AGA GAT GGC AGA <b>GGC</b> TGC AGC CGC CT
R444C	CGC>TGC	c.1396 C>T	8	C ATC TCT GTG <b>GCC</b> TGC ACC CTG CTG GTC TTT G	C AAA GAC CAG CAG <b>GGT</b> GCA GGC CAC AGA GAT G
R4444G	CGC>GGC	c.1396 C>G	8	C ATC TCT GTG <b>GCC</b> GGC ACC CTG CTG GTC TTT G	C AAA GAC CAG CAG <b>GGT</b> GCC GGC CAC AGA GAT G
R444H	CGC>CAC	c.1397G>A	8	C ATC TCT GTG <b>GCC</b> CAC ACC CTG CTG GTC TTT G	C AAA GAC CAG CAG <b>GGT</b> GTG GGC CAC AGA GAT G

Mutation	Austausch	Position	Exon	Primer-F	Primer-R
<b>V458G</b>	GTG>GGG	c.1439 T>G	8	G CCC TTC CTC TTC GGG CTC TGG GAC CAG CAG	CTG CTG GTC CCA GAG CCC GAA GAG GAA GGG C
<b>P476L</b>	CCC>CTC	c.1493 T>C	8	G CGA GTA TAT GAC CTC AGG GCC TGA GAC C	G GTC TCA GGC CCT GAG GTC ATA TAC TCG C

## 2.9 Bioinformatische Methoden

### 2.9.1 Verwendete Software

CEQ 8000	Beckman Coulter
Navigator 1.5.3. Software	Transgenomic Ltd, Omaha
Pymol v0.99	DeLano Scientific LLC, San Francisco

### 2.9.2 Verwendete Internetprogramme

Primerdesign:

[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Splice Site Prediction:

[http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>

Restriktionsanalyse:

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

HAE-Datenbank:

<http://hae.biomembrane.hu/info.php>

Sequenz-Alignment:

<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Protein Data Bank:

<http://www.pdb.org>

## 2.10 Patienten

Seit 1999 wurden von der Kinderklinik Frankfurt und der Hautklinik Mainz Blutproben von 359 HAE-Patienten eingesandt. Die Diagnose wurde in diesen spezialisierten Zentren aufgrund der klinischen und laborchemischen Parameter gestellt und Blutproben wurden zur genetischen Diagnose an das Institut für Humangenetik der Universität Würzburg geschickt. Die Patienten wurden über die beabsichtigte genetische Analyse informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

## 2.11 Methoden zur C1-Inhibitor Gendiagnostik

### 2.11.1 Isolierung genomischer DNA aus Blut

#### *Lyse der Erythrozyten*

Maximal 10 ml Vollblut wurden in ein 50 ml Falcon Röhrchen mit der 3-fachen Menge Lysispuffer gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lymphozyten durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 U/min und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Nachdem weitere 10 ml Lysispuffer auf das Pellet gegeben wurden, wurde erneut 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, 250 µl Proteinase K und 250 µl 20% SDS zugegeben, gemischt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

#### *Fällung der DNA*

Zu der Lösung wurden 2,5 ml SE-Puffer und 2,1 ml gesättigte NaCl Lösung gegeben, gut gemischt und mind. 10 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert, um ausgefallene Salze zu lösen. Nachdem 15 min bei 4000 U/min bei RT zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Falcon überführt, das 2-fache Volumen 100% Ethanol zufügt, gut gemischt und die DNA Wolke mit einem Glashäkchen herausgefischt.

Die DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration am Photometer bestimmt.

### 2.11.2 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt ein Verfahren dar, mit dem es möglich ist, gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen begrenzt werden, exponentiell zu vervielfältigen. Neben dem DNA-Template und einer geeigneten thermostabilen Polymerase werden für die PCR spezifische Primer, Desoxyribonukleotide sowie ein entsprechendes Puffersystem benötigt. Zur Optimierung des jeweiligen Ansatzes müssen die einzelnen Komponenten individuell abgestimmt werden. Gleiches gilt für das



Temperaturprofil während der verschiedenen Phasen (Denaturierung, Annealing, Elongation) beim Durchlaufen der PCR.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der PCRs in den meisten Fällen der Ansatz aus Tabelle 2.6 verwendet. Je nach Primerpaar wurde dieser jedoch modifiziert, um die Bindungsspezifität der Primer zu optimieren. Annealing Temperatur und evtl. Zusätze sind in Abschnitt 2.8 beschrieben.

Tabelle 2.6 Standardansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs

	Volumen (µl)
<b>1 x PCR Puffer</b>	23
<b>Taq-Polymerase</b>	0,3
<b>Primer forward 10pmol/µl</b>	1
<b>Primer reverse 10 pmol/µl</b>	1
<b>DNA ~ 500 µg/ml</b>	1

Die PCR Reaktionen wurden im Trio-Thermoblock nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Tabelle 2.7 Temperaturprofil einer Standard-PCR  
\* die jeweiligen T<sub>m</sub> sind unter Abschnitt 2.8 angegeben

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
35	95°C	30 sec
	T <sub>m</sub> des Primerpaares*	30 sec
	72°C	30 sec
1	72°C	5 min
	4°C	∞

Spezielle Temperaturprofile, die vom Standard abweichen, sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben.

### 2.11.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren ermöglicht den Nachweis und die Größenbestimmung sowie die Isolierung einzelner DNA-Fragmente. Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophoresen sind die Standardmethoden zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Die Auftrennung im elektrischen Feld ist durch die negative Nettoladung von Nukleinsäuren bei neutralem pH möglich.

Abhängig von der erwarteten Größe der aufzutrennenden Produkte werden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,7 % (bei sehr großen Fragmenten) und 2,0 % (bei kleinen Fragmenten) verwendet.

Um die Fragmente im Anschluss sichtbar zu machen, wird die Interkalation des Ethidiumbromids genutzt, welches bei UV-Bestrahlung Licht im sichtbaren Bereich emittiert. Die Größe der Fragmente wird durch Vergleich mit Fragmenten definierter Größe eines parallel gelaufenen Markers bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden meistens PCR-Produkte zwischen 200 und 600 bp aufgetrennt. Bei Fragmenten dieser Größenordnung wurde eine Agarosekonzentration von 1,5 % gewählt. Für größere Fragmente wurden 0,7 % ige Agarosegele verwendet.

#### **2.11.4 Sequenzierung**

Die Sequenziermethode nach Sanger beruht auf dem zufälligen Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) während der PCR. In dem Sequenzieransatz sind außer dNTPs auch mit verschiedenen Fluorophoren markierte ddNTPs vorhanden. Diese liegen in wesentlich geringeren Mengen als die dNTPs vor. Es kommt nun in statistischer Verteilung an einer der vielen Positionen zu einem Abbruch der DNA-Synthese. Dadurch entsteht eine Serie komplementärer Fragmente, die gelelektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Während der Elektrophorese misst ein Detektor die verschiedenen Fluoreszenzsignale, die von einem Computer ausgewertet und als vollständige Sequenz wiedergegeben werden.

Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wurde mit einer Standard-PCR (siehe Abschnitt 2.7.2) vervielfältigt. Um überschüssige dNTPs und Primer zu entfernen, wurde das Produkt mit den Enzymen SAP (shrimp-alkalische Phosphatase) und Exonuklease I aufgereinigt (Tabelle 2.8) In der anschließenden „Cycle Sequencing Reaktion“ (Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10) wurden durch Verwendung des DTCS Quick Start Kit von Beckmann Coulter nach o.g. Mechanismus markierte ddNTPs eingebaut.

Tabelle 2.8 Aufreinigung des PCR-Produktes vor der Sequenzierreaktion

	Volumen ( $\mu$ l)
<b>PCR Produkt</b>	20
<b>SAP</b>	0,5
<b>Exonuklease I</b>	0,5
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	4
<b>Inkubation</b>	10 min 37°C
	10 min 85°C

Tabelle 2.9 Reaktionsansatz der „Cycle Sequencing“ Reaktion

	Volumen ( $\mu$ l)
<b>gereinigtes PCR Produkt</b>	1,5
<b>DTCS-Mix</b>	4
<b>Primer forward 10pmol/<math>\mu</math>l</b>	1
<b>Primer reverse 10 pmol/<math>\mu</math>l</b>	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	12,5

Tabelle 2.10 Temperaturprofil einer „Cycle-Sequencing“-Reaktion

*die jeweiligen T<sub>m</sub> sind unter Abschnitt 2.8 angegeben*

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
35	95°C	30 sec
	T <sub>m</sub> des Primerpaares*	20 sec
	60°C	4 min
	4°C	$\infty$

## 2.11.5 Southern-Blot

### 2.11.5.1 Restriktionsverdau der genomischen DNA

Zur Southern-Blot Analyse wird die genomische DNA durch eine Restriktionsendonuklease in Fragmente geschnitten. Um Genveränderungen beurteilen zu können, dürfen keine Schnittpunkte im gewünschten Genabschnitt sein.

Das Restriktionsenzym BclI schneidet genomische DNA unter anderem up- und downstream des C1-Inhibitor Gens, so dass die 20 kb des Gens „ausgeschnitten“ werden.

Tabelle 2.11 Reaktionsansatz des Restriktionsverdau mit BclI für den Southern-Blot

	Volumen (µl)
10 µg genomische DNA	x
Reaktionspuffer 2	6
BclI	2 + 2
ddH <sub>2</sub> O	ad 60
Inkubation	1 h 50°C

Zur Überprüfung des Verdau wurde ein Aliquot der geschnittenen PatientInnen DNA mit Stop-Puffer versetzt und auf ein niedrigprozentiges Agarosegel aufgetragen. Bei unvollständigem Verdau wurde erneut BclI zugegeben und weiter inkubiert.

### 2.11.5.2 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Nach vollständigem Verdau wurde die PatientInnen DNA mit 6 µl Stop-Puffer versetzt und auf einem 0,7 % Seakem Agarosegel für 48 h bei 30 V aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein DNA-Längenstandard ( $\lambda$ -DNA/HindIII) aufgetragen, der die Größenordnung der aufgetrennten DNA-Fragmente erlaubte. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten.

### 2.11.5.3 Kapillarblot

Im Agarosegel liegen die DNA-Fragmente doppelsträngig vor. Damit die Fragmente durch Kapillarkräfte aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert werden können, wurden sie für 10 min in Lösung 1 depurinisiert und für weitere 10 min in Lösung 2 denaturiert. Anschließend wird der Kapillarblot aufgebaut. Dabei wird das Gel auf ein getränktes Filterpapier, welches in 0,4 N NaOH eintaucht, gelegt und mit der Nylonmembran bedeckt. Saugstarkes Papier zieht die NaOH durch das Gel und die Membran an und nimmt dabei die DNA mit, die aufgrund der negativen Ladung an die positiv geladene Oberfläche der Membran bindet.

Nach einer Transferzeit von mind. 12 h wurde die Membran für 20 min in 2 x SSC neutralisiert.

### 2.11.5.4 Radioaktive Markierung der Sonde und Hybridisierung

Während die Nylonmembran mit Church-Puffer bei 65°C vorhybridisiert wurde, wurde die cDNA des C1-Inhibitors mit dem Rediprime TM II Random Prime Labelling System radioaktiv markiert.

Tabelle 2.12 Radioaktive Markierung der Sonden-DNA

	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Sonden-DNA (~ 25 ng)	7
$\lambda$ -DNA	0,3
	ad 45 $\mu\text{l}$ TE-Puffer
<b>Inkubation</b>	10 min 90°C, 10 min Eis
$\alpha$ -CTP <sup>32</sup>	4
<b>Inkubation</b>	20-60 min 37°C, 10 min 90°C

Nachdem der Church-Puffer mit 15 ml Hybridisierungspuffer ersetzt worden war, wurde die markierte Sonde zugegeben und die Nylonmembran über Nacht und ständigem Rotieren bei 65°C hybridisiert.

### 2.11.5.5 Waschen und Entwickeln der Nylonmembran

Ungebundene Sonden-DNA wurde in drei Schritten von der Nylonmembran abgewaschen. Dazu wurde die Membran jeweils 10 min mit den Waschpuffern I, II und III gewaschen. Ein Röntgenfilm wurde in einer Autoradiographiekassette mit der Membran über Nacht bei -70°C exponiert.

### 2.11.6 dHPLC-Methode zur Detektion großer Deletionen

Mit Hilfe der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC, *denaturing high pressure liquid chromatography*) wurden ebenfalls große Deletionen detektiert, wobei mit dieser Methode ihre Lage und Ausdehnung aufgeklärt werden konnte.

#### 2.11.6.1 Amplifikation der Fragmente

Die Exons 4-8 des C1-Inhibitors wurden in einer semiquantitativen Multiplex PCR amplifiziert. Die Primer (Tabelle 2.2) wurden so gewählt, dass alle Fragmente mindestens einen Größenunterschied von 50 bp aufwiesen und die Amplifikation bei einer einheitlichen Annealingtemperatur von 56°C stattfinden konnte. Ein 434 bp großes Fragment des HGH Gens (Human growth hormone, Exon 2 und 3) wurde mit den C1-Inhibitor Fragmenten in einer Reaktion amplifiziert und diente als interne Kontrolle.

Der Reaktionsansatz (Tabelle 2.13) wurde als Mastermix pipettiert, um gleich bleibende Reaktionsbedingungen zu garantieren.

Tabelle 2.13 Multiplex-PCR Ansatz zur Amplifikation der Fragmente

	Volumen ( $\mu$ l)
1 x PCR Puffer	46
Taq-Polymerase	0,5
jeweils Ex4F, 5F, 6F, 7F, 8F, HGH-F (10pmol/ $\mu$ l)	1
jeweils Ex4R, 5R, 6R, 7R, 8R, HGH-R (10pmol/ $\mu$ l)	1
DNA (100 $\mu$ g/ml)	2

Die Amplifikation erfolgte nach einem „Touch down“ Temperaturprofil (Tabelle 2.14) und wurde in der linearen exponentiellen Phase abgebrochen.

Tabelle 2.14 „Touch down“ - Temperaturprofil der Multiplex Reaktion

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
3	95°C	30 sec
	62°C	30 sec
	72°C	30 sec
3	95°C	30 sec
	59°C	30 sec
	72°C	30 sec
19	95°C	30 sec
	56°C	30 sec
	72°C	30 sec
1	72°C	5 min
	4°C	$\infty$

### 2.11.6.2 Auftrennung der Fragmente und Auswertung

10  $\mu$ l Aliquots der Multiplex-PCR wurden in das dHPLC System injiziert und bei einer konstanten Temperatur von 50°C unter nichtdenaturierenden Bedingungen bei 260 nm des „Universal Linear application modus“ aufgetrennt. Die PCR Produkte wurden innerhalb von 20 min (Fließrate 0,9 ml/min) in einem 40-72 %igem Gradienten des Puffers B eluiert.

Mit Hilfe der Navigator 1.5.3. Software (Transgenomic Ltd, Omaha) wurden die Daten analysiert.

Die Patientenchromatogramme wurden mit Chromatogrammen gesunder Probanden überlagert und anhand des internen HGH Peaks normalisiert. Dabei wurden die Chromatogramme so skaliert, dass die HGH Peaks die Höhe 1 erhielten. Die Peakhöhen der einzelnen

Fragmente wurden dann mit den Peakhöhen der Kontrollpeaks verglichen und ihr Verhältnis zueinander berechnet. Ein Verhältnis zwischen 0,4 und 0,6 zeigte eine heterozygote Deletion des entsprechenden Fragmentes an.

## 2.12 Methoden zur Expression und Mutagenese des C1-Inhibitors

### 2.12.1 Klonierung des C1-Inhibitors

#### 2.12.1.1 Amplifikation der *C1-INH*-cDNA

Mittels PCR wurde die cDNA des C1-Inhibitors aus Leber cDNA amplifiziert. Die verwendeten Primer (Tabelle 2.3) enthielten zusätzlich Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme, die bei der Ligation des Inserts in den Vektor benötigt wurden. In den F-Primer wurde zudem zwischen der Erkennungsstelle für HindIII und dem ATG des *C1-INH* eine Kosak-Sequenz eingeführt, um eine funktionierende Translation zu gewährleisten. Die erfolgreiche Amplifikation der cDNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Tabelle 2.15 Temperaturprofil der Amplifikation der *C1-INH*-cDNA

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
35	95°C	30 sec
	65°C	30 sec
	72°C	2 min
	72°C	5 min
1	4°C	∞

#### 2.12.1.2 TA-Klonierung, Elektrotransformation und DNA-Präparation

Das Prinzip des TA-Cloning (Original TA-Cloning®, Eukaryotic TA Cloning® Kit Unidirectional, Invitrogen) beruht auf der Eigenschaft der Taq-Polymerase, an das 3'-Ende jedes bei der PCR-Amplifikation entstehenden Stranges ein einzelnes A-Nukleotid anzufügen. Der käuflich erwerbbarer Vektor ist bereits linearisiert und mit jeweils einem T-Nukleotid-Überhang an seinen 3'-Enden versehen. Dadurch werden „sticky ends“ passend zu den 3'-A-Überhängen der PCR-Produkte geschaffen und die Selbstligation des Vektors verhindert. Das PCR-Produkt aus 2.12.1.1 wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Vektor über Nacht bei 14°C ligiert.

Elektrische Pulse verursachen einen vorübergehenden Verlust der Semipermeabilität von Zellmembranen und ermöglichen damit eine Diffusion von fremder DNA in die Zelle. Eine

solche passive Diffusion kann durch Mediumzugabe unmittelbar nach dem elektrischen Puls unterstützt werden.

Für die Transformation wurde ein Aliquot des *E.coli*-Stammes XL1blue (Invitrogen) mit 0,75  $\mu$ l des fertigen Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 200  $\Omega$ , 2,5 kV und 25  $\mu$ F. Die *E.coli* Zellen wurden danach für 60 min in 250  $\mu$ l SOC-Medium bei 37°C auf einem Rotations-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 1,6 mg X-Gal (5-Brom-4chlor-3indolyl- $\beta$ -D-galaktosid) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Weißer Kolonien wurden in LB-Medium vermehrt und die erfolgreiche Ligation wurde durch PCR mittels der Primer aus Tabelle 2.4 verifiziert.

Für die Plasmid-Midipräparationen wurde eine korrekte Kolonie in 50 ml Ampicillin-LB-Medium für ca. 16 h bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung des Plasmids wurde mit dem NucleoBond<sup>®</sup> PC 100 Kit (Macherey-Nagel) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach alkalischer Lyse der Bakterien wurde dabei die Plasmid-DNA über Säulen mit einer DNA-bindenden Silica-Matrix aufgereinigt und in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.12.1.3 Umklonierung des C1-Inhibitors in den Expressionsvektor pCEP4

#### 2.12.1.3.1 Spaltung des Inserts mit HindIII/NotI

Aus der Plasmid-DNA (Kapitel 2.12.1.2) wurde anschließend mit den Enzymen HindIII und NotI das Insert herausgespalten (Tabelle 2.16). Durch Gelelektrophorese wurden die Fragmente getrennt, die Bande des Inserts ausgeschnitten und die DNA mit dem Nucleospin Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben eluiert und in 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Tabelle 2.16 Reaktionsansatz zur Spaltung des Inserts aus dem TA-Vektor

	Volumen ( $\mu$ l)
Plasmid-DNA	45
Reaktionspuffer 2	10
HindIII	1
NotI	1
BSA	1
ddH <sub>2</sub> O	42
Inkubation	1 h 37°C



### 2.12.1.3.2 Spaltung des Expressionsvektors pCEP4 mit HindIII/NotI

Der Vektor pCEP4 wurde ebenfalls mit HindIII und NotI geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Nucleospin Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben eluiert.

Tabelle 2.17 Reaktionsansatz zur Spaltung des Expressionsvektors pCEP4

	Volumen (µl)
pCEP4 Plasmid	8
Reaktionspuffer 2	10
HindIII	1
NotI	1
BSA	1
ddH <sub>2</sub> O	79
Inkubation	1 h 37°C

### 2.12.1.3.3 Ligation der *CI*-*INH*-cDNA mit dem Expressionsvektor

Die gereinigte Insert-DNA (Kapitel 2.12.1.3.1) wurde mit dem gereinigten Vektor (Kapitel 2.12.1.3.2) bei 14°C über Nacht ligiert.

Tabelle 2.18 Reaktionsansatz zur Ligation des Inserts mit dem Expressionsplasmid

	Volumen (µl)
pCEP4 Plasmid	1
Insert-DNA	2
Ligase Puffer	4
T4-Ligase	1
ddH <sub>2</sub> O	2
Inkubation	ü.N 14°C

### 2.12.1.3.4 Elektrotransformation

Kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes XL1blue (Invitrogen) wurden mit 0,75 µl des Ligationsansatzes aus 2.12.1.3.3 elektrotransformiert. Die *E.coli* Zellen wurden für 60 min in 250 µl SOC-Medium bei 37°C auf einem Rotations-Schüttler geschüttelt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.12.1.3.5 Überprüfung der Ligation mittels PCR und Sequenzierung

Es wurden Klone gepickt und mittels PCR auf das Vorhandensein des Inserts untersucht. Die verwendeten Primer pCEP4-F und pCEP4-R (Tabelle 2.4) binden rechts und links der

„multiple cloning site“ im Vektor und ermöglichen entweder die Amplifikation eines 137 bp großen oder, bei erfolgreicher Ligation mit dem Insert, eines 1549 bp großen PCR-Produkts.

Um die gesamte *CI-INH*-cDNA positiver Klone lückenlos sequenzieren und auf das Vorhandensein von Mutationen durchsuchen zu können, wurde das Insert zusätzlich in 5 überlappende Fragmente unterteilt.

Ein Klon, der die *CI-INH*-cDNA ohne Mutationen im richtigen Leseraster im pCEP4 Vektor enthielt, wurde als Stocklösung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und zusätzlich im größeren Maßstab vermehrt.

#### 2.12.1.4 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde in Anlehnung an den QuikChange<sup>®</sup> Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Das Prinzip dieses Mutageneseverfahrens besteht darin, dass ein nicht linearisiertes Plasmid mit Hilfe zweier komplementärer Oligonukleotideprimer, die beide die gewünschte Mutation tragen, repliziert wird. In einer PCR werden die Primer durch die *Pfu*-DNA Polymerase elongiert und die gewünschte Mutation inkorporiert. Als Produkte entstehen unmethylierte Plasmide, die die Mutation tragen, hemimethylierte Plasmide, sowie zu einem geringem Prozentsatz die vollmethylierten Ursprungsplasmide. Das Reaktionsprodukt wird mit DpnI, einer Restriktionsendonuklease mit einer spezifischen Erkennungssequenz für methylierte und hemimethylierte DNA, verdaut, so dass die ungewünschten Plasmide, die die Mutation nicht tragen, zerstört werden.

Als DNA-Template wurde die Plasmid-DNA aus Kapitel 2.12.1.2 verwendet. Die Primer, die die gewünschte Mutation tragen, sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.19 Reaktionsansatz für die zielgerichtete Mutagenese

	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
<b>1 x Pfu Puffer</b>	23
<b><i>Pfu</i>-Polymerase</b>	0,4
<b>Primer forward 10pmol/<math>\mu\text{l}</math></b>	1
<b>Primer reverse 10 pmol/<math>\mu\text{l}</math></b>	1
<b>Plasmid-DNA (aus)</b>	1

Tabelle 2.20 Temperaturprofil der Mutagenese-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
35	95°C	30 sec
	60°C	1 min
	55°C	1 min
	68°C	20 min
	4°C	∞

Zur Zerstörung der voll- und hemimethylierten Plasmide wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl DpnI (10U/µl) vermischt und bei 37°C für 1 h inkubiert.

Anschließend wurden *E.coli* mit 1 µl des Reaktionsproduktes, wie bereits in Kapitel 2.12.1.2 beschrieben, transformiert, Rekombinante selektioniert und die erfolgreiche Durchführung der Mutagenese durch Sequenzierung kontrolliert.

Obwohl die *Pfu*-Polymerase die Plasmid-DNA bei der Mutagenesereaktion mit hoher Genauigkeit repliziert und somit das Auftreten zusätzlicher Mutationen neben den gewünschten unwahrscheinlich ist, wurde das gesamte Insert mit Hilfe überlappender Fragmentprimer (Tabelle 2.4) sequenziert.

Plasmidpräparationen der mutierten Plasmide mit ausreichender Reinheit und Menge für die nachfolgenden Transfektionen wurden mit dem NucleoBond® PC 100 Kit (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.12.2 Kultivierung und Transfektion von HEK-293 Zellen

Bei HEK-293 Zellen (human embryonic kidney cell clone 293) handelt es sich um adhärenz EBNA-Zellen, welche das Resistenzgen gegen Neomycin tragen und daher auch gegen Geneticin (G418) resistent sind. Im Genom der EBNA-Zellen ist die Epstein-Barr Virus Replikationsstelle (oriP) und das EBNA-1 Gen integriert, die die extrachromosomale Replikation des Plasmids in Säugetierzellen und dessen stabile Verteilung auf sich teilende Zellen gewährleisten.

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen erforderten sterile Bedingungen. Unter einer sterilen Werkbank wurden daher ausschließlich sterile, vor Benutzung auf 37°C vorgewärmte Kulturmedien und Pufferlösungen sowie sterile Plastikwaren verwendet. Die verwendeten Pipetten wurden vor Gebrauch sterilisiert und direkt vor Benutzung unter der Werkbank abgeflammt.

Die Kultivierung der HEK-293 Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in MEM Medium mit 15 % FKS und 0,25 mg/ml Geneticin.

### **2.12.3 Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode**

Nahezu konfluent gewachsene HEK-293 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion aus einer großen Flasche 1:8 in 10 ml MEM Medium (15 % FKS, 0,25 mg/ml Geneticin) in 10 cm Gewebekulturschalen gesplittet.

10 µg Plasmid-DNA wurden in sterilem H<sub>2</sub>O dest. in einem Volumen von 438 µl gelöst. Anschließend wurden unter sanftem Mischen auf dem Vortexer 62 µl 2M CaCl<sub>2</sub> und 500 µl 2xBBS tröpfchenweise zugegeben. Während einer Inkubation von ca. 20 min bildet das Calciumphosphat – entstanden beim Mischen von CaCl<sub>2</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - mit der DNA ein Präzipitat. Dieser Vorgang kann durch eine leichte Trübung der Lösung beobachtet werden (Chen and Okayama, 1988). Die Lösung wurde gleichmäßig auf die Kulturplatten geträufelt. Die Calciumphosphat – DNA Komplexe setzen sich auf der Oberfläche der Zellen ab und werden durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. Die DNA gelangt in den Zellkern, wo sie gegebenenfalls transkribiert wird. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 35°C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.12.4 Kultivierung der transfizierten Zellen und Ernte des rekombinanten Proteins**

Am Morgen nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 8 ml 1xPBS gespült, mit 10 ml frischem MEM-Medium (15 % FKS, 0,25 mg/ml Geneticin) überschichtet und für weitere 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen wiederum mit 8 ml 1xPBS gespült und mit 3 ml MEM-Medium (ohne FKS, 0,25 mg/ml Geneticin) bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> weiterkultiviert.

Das in der cDNA des C1-INH enthaltene Signalpeptid sorgte für die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Kulturmedium. Für nachfolgende Tests wurde deshalb nur das Medium vorsichtig abgenommen und untersucht.

### 2.12.5 Messung der C1-INH-Aktivität mittels Technochrom<sup>®</sup> C1-INH-Kit

Um die Aktivität der rekombinant exprimierten C1-INH-Proteine zu messen, wurde die kinetische Methode des Technochrom<sup>®</sup> C1-INH-Kits (Technoclone) verwendet. Das Testprinzip ist in Kapitel 3.2.3 genauer beschrieben.

Substrat C1-1	18 $\mu$ mol, AcOH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CO-lys( $\epsilon$ -Cbo)-Gly-Arg-pNA, P.M. = 729,8
Reaktionspuffer B	Tris (6,1g/L)-NaCl (15 g/L)-pH 8,5
C1-Esterase	human

#### 2.12.5.1 Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Alle Testreagenzien wurden vor Beginn mit Aqua dest. laut Herstellerangaben gelöst und auf Raumtemperatur gebracht. Pro Testansatz wurden 50  $\mu$ l des Substrates C1-1 mit dem Reaktionspuffer B gemischt und bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Unverbrauchte Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.12.5.2 Durchführung der Messung

In einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß wurden Kulturmedium aus Kapitel 2.12.4 und C1-Esterase gemischt und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Substrat-Puffer-Gemisch zugegeben, gemischt und in eine Meßküvette überführt. Die Messung erfolgte am Photometer bei 405 nm gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> Dabei wurde die Extinktionszunahme linear pro Minute über einen Zeitraum von 4 Minuten bestimmt.

Tabelle 2.21 Reaktionsansatz der C1-INH-Aktivitätsmessung

	Volumen ( $\mu$ l)
Testprobe	50
C1-Esterase	50
Inkubation	5 min 37°C
Substrat-Puffer-Gemisch	300

#### 2.12.5.3 Berechnung der Ergebnisse

Die Aktivität des rekombinant exprimierten WT-Proteins wurde als 100 % angenommen, die Aktivität einer Mock-Transfektion als 0 %. Die Aktivität der exprimierten mutanten Proteine wurden dann in Bezug auf das WT-Protein ausgerechnet.

## 2.12.6 Western-Blot zum Nachweis der erfolgreichen rekombinanten Expression

Um die erfolgreiche rekombinante Proteinexpression des C1-INH zu bestimmen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten und die Proteine können anschließend durch spezifische Antikörper erkannt werden. In einer sekundären Reaktion bindet ein AP-konjugierter Antikörper an den spezifischen Antikörper. Nach Zugabe zweier Farbstoffe werden diese durch die Alkalische Phosphatase (AP) gespalten und die entstandenen Produkte bilden ein sichtbares Präzipitat um den Antigen-Antikörper-Komplex.

### 2.12.6.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel 10 %	30% Acrylamid	3 ml
	Lower Buffer	2,3 ml
	H <sub>2</sub> O	2,2 ml
	87% Glycerin	1,5 ml
	TEMED	12 µl
	40% APS	18 µl
Sammelgel 3 %	30% Acrylamid	0,47 ml
	Upper Buffer	2,5 ml
	H <sub>2</sub> O	3,2 ml
	TEMED	12 µl
	40% APS	18 µl

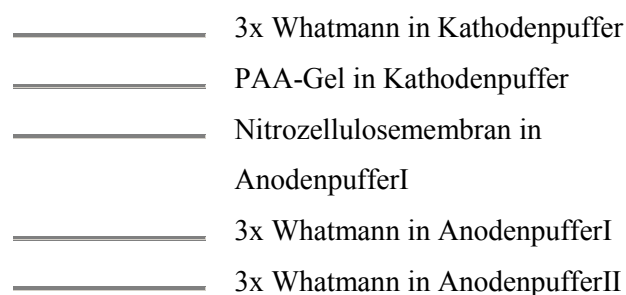
Die Proteine aus Kapitel 2.12.4 wurden auf einem 10 % igem PAA (Polyacrylamid)-Gel aufgetrennt. Die Lösungen für das Trenngel wurden vorsichtig gemischt und zwischen zwei Glasplatten, die senkrecht in der Gießapparatur eingespannt waren, bis zu einer Markierung ca. 1 cm unterhalb der kleineren Platte gegossen und mit Aqua dest. überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zur Bildung der Probenaschen eingesetzt.

Nach Zugabe von 5 µl Laemmli-Puffer zu 20 µl Proteinprobe wurden die Ansätze für 5 min bei 90°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurden 8 µl eines Protein-Markers aufgetragen.

Die Aufkonzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 70V für 30 min. Die Auftrennung wurde dann bei 120V für 60-80 min durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel abgebaut.

### 2.12.6.2 Elektroblot

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte nach dem „semi-dry“-Verfahren mit der Blot-Apparatur der Firma Biorad. Dazu wurden Whatmann Papiere in der Größe des PAA-Gels zugeschnitten, mit den entsprechenden Blotting Puffern getränkt und der Elektroblot nach folgendem Schema aufgebaut:



Minigele wurden für 1 h bei 12 V geblottet.

### 2.12.6.3 NuPage Fertiggele

Die rekombinanten Proteine wurden auch auf NuPage Fertiggele der Firma Invitrogen<sup>®</sup> (Tris-Acetat 3-8 % und Bis-Tris 3-8 %) nach Herstellerangaben in MOPS-Puffer aufgetrennt.

### 2.12.6.4 Entwickeln der Membran

#### *Blocking*

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 min in der Blocklösung geschwenkt und anschließend 3 x 5 min mit 1xTBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen.

#### *Antikörperinkubation*

Die Inkubation mit dem spezifischen Anti-C1-INH (1:1000 in 1xTBS) erfolgte für 1,5-2 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit 1xTBS, 0,05 % Tween 20 wurde der zweite (AP)-konjugierter Antikörper (1:10 000 in 1xTBS) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in 1xTBS, 0,05 % Tween 20 wurde die Membran gefärbt. Die Färbereaktion erfolgte in 25 ml AP-Puffer mit 165 µl BCIP und 112,5 µl NBT-Lösung so lange, bis die Banden gut sichtbar waren. Die Reaktion wurde durch Schwenken in Aqua dest. abgestoppt und die Membran getrocknet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Mutationsscreening des *C1-INH*-Gens

Zwischen 1999 und 2005 wurden 208 Familien mit 359 Mitgliedern auf eine Veränderung im *C1-INH*-Gen untersucht.

Je nach Eingangsdiagnose HAE Typ I oder HAE Typ II wurden die verschiedenen Analysen in einer anderen Reihenfolge durchgeführt (Abbildung 3.1):

- Patienten mit Verdacht auf HAE Typ I wurden zuerst mittels Southern-Blot und dHPLC auf eine große Deletion des *C1-INH*-Gens untersucht. Nach einem unauffälligen Blot, erfolgte die Komplett-Sequenzierung aller 8 Exons und der angrenzende Intronbereiche des *C1-INH*.
- Bei Patienten mit der Diagnose HAE Typ II wurde zuerst das Exon 8 des *C1-INH* sequenziert. Bei dieser Form ist fast immer das Aktive Zentrum (Arg444) durch eine Mutation verändert. Dadurch wird das C1-INH-Protein zwar in normalen Konzentrationen aber mit reduzierter Aktivität gebildet.

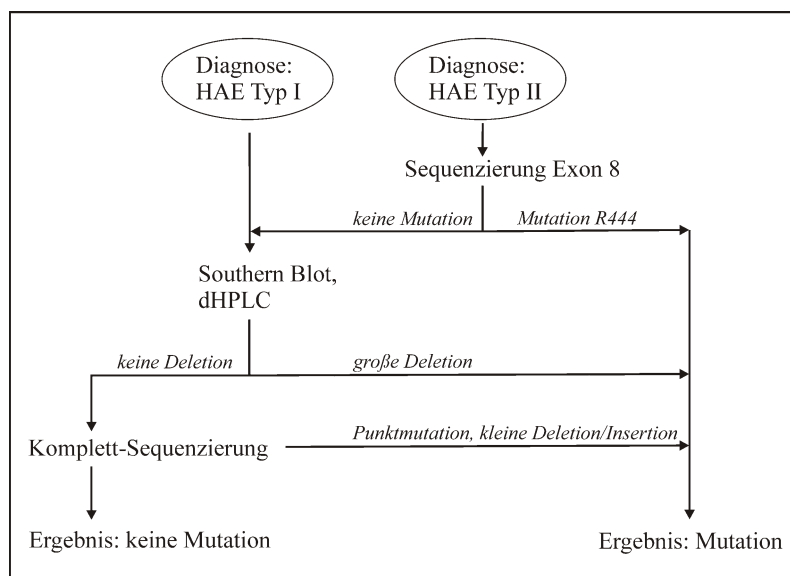


Abbildung 3.1 Ablaufschema der Genanalyse des C1-Inhibitors

Ausgehend von der Eingangsdiagnose HAE Typ I oder Typ II wurde zuerst die Southern-Blot Analyse oder die Sequenzierung des Exons 8 durchgeführt.



### 3.1.1 Detektion großer Deletionen mittels Southern-Blot

Zwei Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym BclI befinden sich up- und downstream des *CI-INH*-Gens im menschlichen Genom, so dass die gesamte codierende Region auf einem BclI-Fragment liegt. Nach einem Restriktionsverdau wurde die geschnittene genomische DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Durch Hybridisierung mit einer spezifischen *CI-INH*-cDNA Sonde wurde eine 20 kb große DNA-Bande sichtbar gemacht. Eine große Deletion des *CI-INH*-Gens bei der dominanten Erkrankung HAE ist durch das Vorhandensein zweier Banden auf der Membran gekennzeichnet. Dabei bildet das wildtypische Allel die 20 kb Bande und das deletierte Allel eine kürzere Bande.

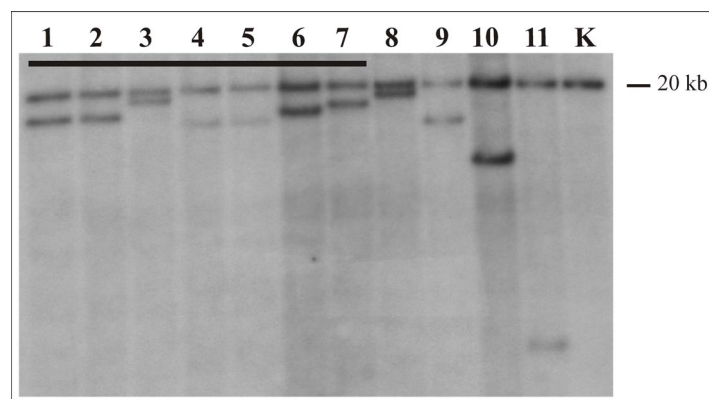


Abbildung 3.2 Southern-Blot und Hybridisierung mit einer *CI-INH*-cDNA Sonde bei verschiedenen HAE-Patienten

*Der Balken markiert unterschiedliche Deletionen des Exons 4, die durch Beteiligung verschiedener Alu-Repeats der Introns 3 und 4 zustande kommen. Spur 1+2: Deletion Exon 4 bei Familie D-A; Spur 3: Deletion Exon 4 bei Familie D-B; Spur 4: Deletion Exon 4 bei Familie D-C; Spur 5: Deletion Exon 4 bei Familie D-D; Spur 6: Deletion Exon 4 bei Familie D-E; Spur 7: Deletion Exon 4 bei Familie D-F; Spur 8: Deletion Exon 6 bei Familie D-H; Spur 9: Deletion Exon 5,6 bei Familie D-I, Spur 10: Deletion Exon 7,8 bei Familie D-K, Spur 11: Deletion Exons 5-8 bei Familie D-L, Spur K: gesunde Kontrolle*

*Die genaue Lage der Deletionen innerhalb des Gens konnte erst durch dHPLC-Untersuchungen ermittelt werden (vgl. 3.1.2)*

Mittels dieser Methode konnten bei 16 Familien mit 32 Mitgliedern große Deletionen nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Das Ergebnis des Southern-Blots kann aber grundsätzlich keine Auskunft darüber geben, welche Region des *CI-INH*-Gens von einer Deletion betroffen ist. Jedoch kann die Größe der Deletion nur anhand eines DNA-Größenstandards recht genau bestimmt werden.

### 3.1.2 Detektion großer Deletionen mittels dHPLC

Um die Lokalisation der großen Deletionen bestimmen zu können, fand eine dHPLC Analyse der Patientenproben statt. Dazu wurden DNA-Fragmente, die die einzelnen Exons 4-8 des *CI-INH* enthielten, zusammen mit einem Kontrollfragment in einer semi-quantitativen Multiplex-PCR amplifiziert. Die verschiedenen Amplikons wurden anschließend aufgrund ihrer Größe in der dHPLC aufgetrennt.

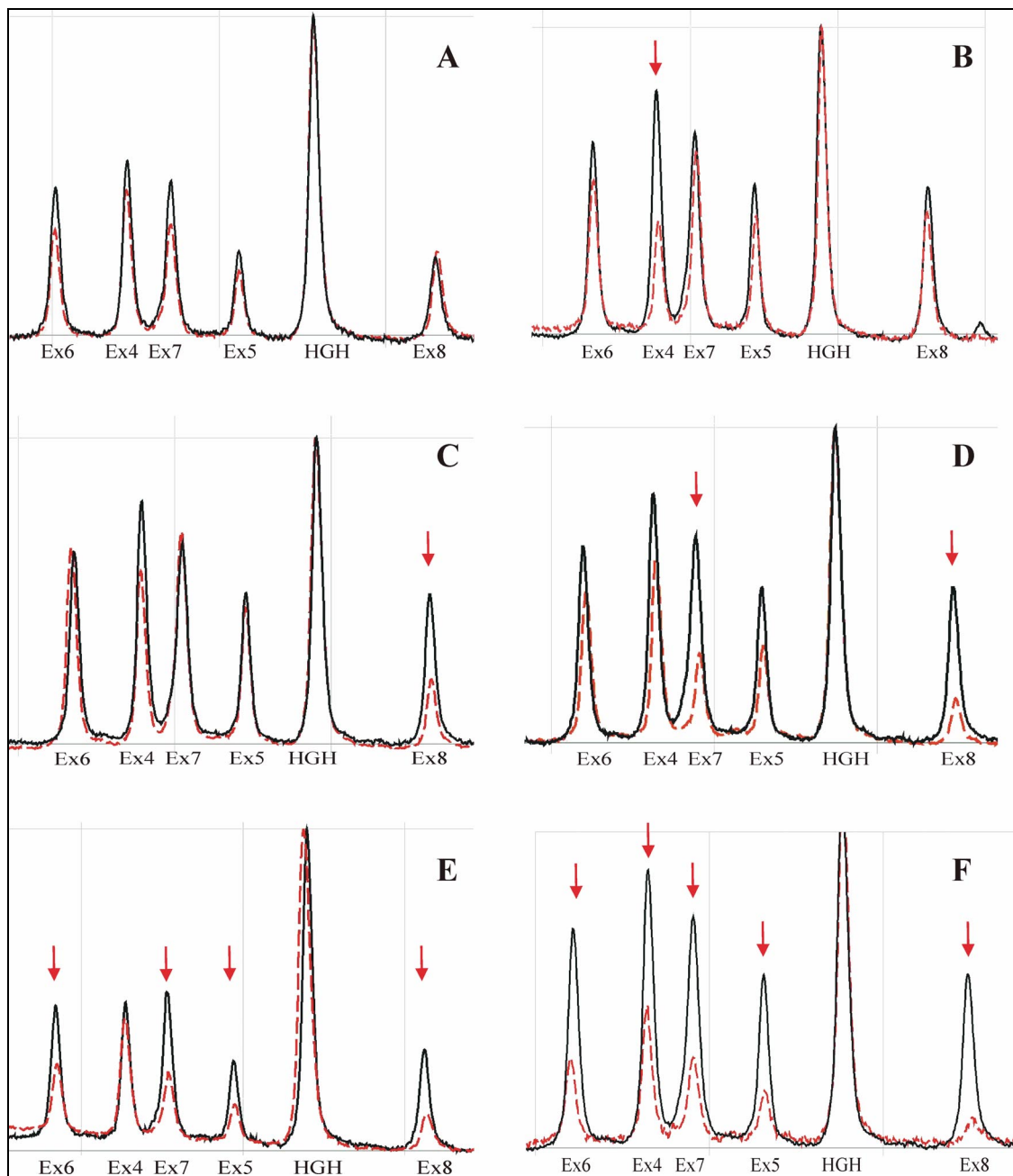


Abbildung 3.3 Detektion großer Deletionen mittels dHPLC

Die Chromatogramme der Patientenproben (rot gepunktete Linie) wurden mit Chromatogrammen gesunder Kontrollen (schwarze Linie) überlagert und anhand des internen Kontrollpeaks HGH normalisiert. Deletionen konnten durch einen Vergleich der jeweiligen Peakhöhen identifiziert werden. Ein Verhältnis des Kontroll- zum Patientenpeak zwischen 0,4 und 0,6 zeigte eine heterozygote Deletion des entsprechenden Fragmentes an **A:** keine Deletion; **B:** Deletion Exon 4; **C:** Deletion Exon 8; **D:** Deletion Ex7+8; **E:** Deletion Ex5-8; **F:** Deletion aller Exons

Um eine optimale Auftrennung und Identifizierung der einzelnen Fragmente zu gewährleisten, wurden die Primer so gewählt, dass die Fragmente einen Größenunterschied von mindestens 50 bp aufwiesen.

Die Chromatogramme der Patienten wurden am Computer mit Chromatogrammen gesunder Probanden überlagert und anhand des internen Kontrollpeaks normalisiert. Deletionen konnten durch einen Unterschied der Peakhöhen der Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle detektiert werden (Abbildung 3.3).

Tabelle 3.1 Große Deletionen und ihre Position bei HAE-Patienten

*\*die komplette Deletion konnte nicht auf dem Southern-Blot nachgewiesen werden*

<b>Familie</b>	<b>Lab-Nr</b>	<b>Deletion</b>	<b>Mitglieder</b>
D-A	99-1462	Exon 4	7
D-B	00-0195	Exon 4	3
D-C	03-1370	Exon 4	2
D-D	02-1601	Exon 4	2
D-E	03-2652	Exon 4	1
D-F	03-2672	Exon 4	1
D-G	03-0157	Exon 6	1
D-H	03-1369	Exon 8	2
D-I	00-1105	Exons 5,6	2
D-J	05-1112	Exons 7,8	1
D-K	00-1011	Exons 5—8	3
D-L*	00-0951	komplettes Gen	2
D-M*	01-0624	komplettes Gen	1
D-N	05-1992	Exon 8	1
D-O	05-2062	Exon 4	2
D-P	05-2104	Exon 4	1

In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der dHPLC Untersuchungen zusammengefasst. Bis auf die komplette Deletion eines Allels bei Familie D-L und D-M konnten alle Deletionen auch im Southern-Blot nachgewiesen werden. Eine Deletion des Exons 4 ist am häufigsten zu beobachten. Acht nicht verwandte Familien wiesen eine Deletion dieses Exons auf. Auf dem

Southern-Blot ergaben sich aber für die verschiedenen Deletionen des Exons 4 unterschiedliche Bandenmuster, was auf die Beteiligung unterschiedlicher Alu-Elemente der Introns 3 und 4 hinweist (Abbildung 3.2 Kennzeichnung durch einen Balken). Familie D-K zeigte schon auf dem Southern-Blot eine Deletion größeren Ausmaßes (Abbildung 3.2 Spur 11). Die dHPLC Analyse ergab eine Deletion der Exons 5-8, wodurch die Hälfte des Gens im betroffenen Allel fehlt (Abbildung 3.3 E). Die Auswertung der Chromatogramme wurde erleichtert, wenn in der untersuchten Familie sowohl betroffene als auch gesunde Mitglieder vorkamen.

### 3.1.3 Detektion von Punktmutationen und kleinen Deletionen mittels Sequenzierung

Nach Ausschluss einer großen Deletion wurden die 8 Exons und angrenzende Intronbereiche des *C1-INH* der Patienten amplifiziert (Abbildung 3.4) und anschließend komplett sequenziert (Abbildung 3.5).

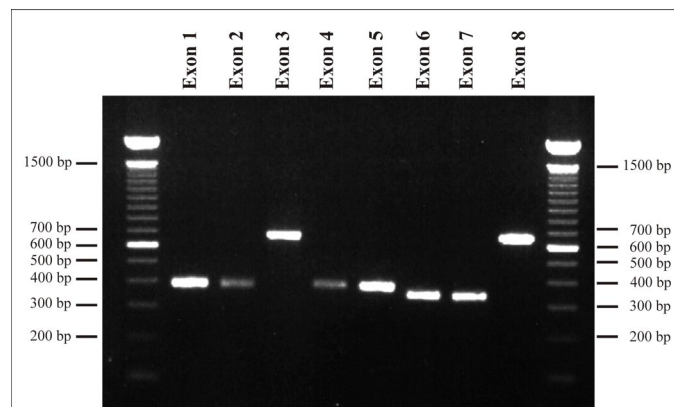


Abbildung 3.4 Amplifikation der Exons des C1-Inhibitor Gens

Die 8 Exons werden in unterschiedlich großen Fragmenten amplifiziert.

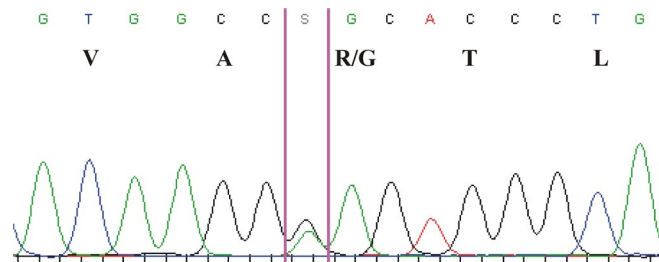


Abbildung 3.5 Sequenzierung eines HAE-Patienten

Die Sequenzierung des Exons 8 zeigte einen heterozygoten Austausch c.1396 C>G der zu einer Substitution der Aminosäure Arginin an Position 444 durch ein Glycin führt.

Mittels Southern-Blot, dHPLC und Sequenzierung konnten bei 146 Familien 268 Träger einer vermutlich kausalen Mutation entdeckt werden (Abbildung 3.6). 28 Mitglieder dieser Familien konnten als HAE-Patienten ausgeschlossen werden, weil sie die familiäre Genveränderung nicht trugen.

Bei 34 Familien mit 64 Mitgliedern konnten insgesamt 13 Mutationen identifiziert werden, die schon in der Literatur und der HAE-Datenbank beschrieben waren.

Am häufigsten ließen sich zwei bekannte Mutationen am reaktiven Zentrum nachweisen. Bei 23 Mitgliedern aus 11 Familien führten die Mutationen Arg444His und Arg444Cys zu einem HAE Typ II. Weiterhin wurden bei 23 Familien mit 41 Mitgliedern sechs bekannte Missense-Mutationen (F147S, G162R, G162E, G323R, P377L, P476R), zwei Nonsense-Mutationen (S-1X, R472X), zwei Splice-Site-Mutationen (IVS1-1G>A, IVS6-1G>C) und eine kleine Deletion (g.8453\_8455delCAA) identifiziert.

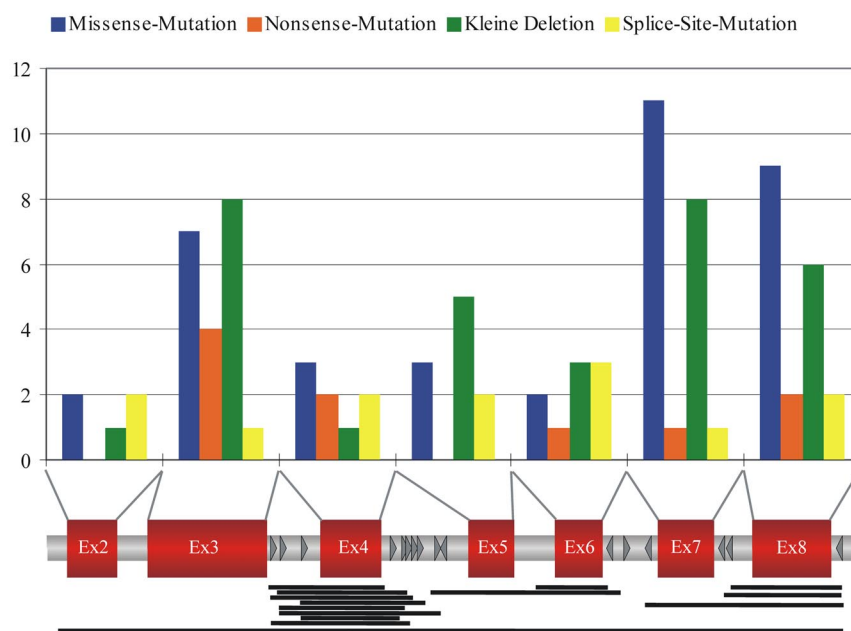


Abbildung 3.6 Übersicht der verschiedenen Mutationen in der untersuchten Kohorte

In der Abbildung sind 109 sowohl neue als auch bekannte Mutationen aufgeführt. Die Verteilung verschiedener Punktmutationen ist in Form von farbigen Balken über den Exons des C1-INH dargestellt. Die schwarzen Balken unter dem Gen symbolisieren die verschiedenen großen Deletionen. Exon 4 ist durch die vielen Alu-Repeats seiner angrenzenden Introns ein Hotspot für diese Deletionen.

Bei 96 Familien mit 172 Mitgliedern wurden insgesamt 80 Punktmutationen nachgewiesen, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden waren.

Die verschiedenen Mutationsarten werden in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert. Dabei sind die bekannten Mutationen neben den neuen Mutationen in den jeweiligen Tabellen aufgeführt.

### 3.1.3.1 Missense-Mutationen

Missense-Mutationen führen durch einen Basenaustausch zur Substitution einer Aminosäure durch eine andere. Bei 38 HAE-Familien mit 72 Mitgliedern konnten 30 noch nicht beschriebene Missense-Mutationen gefunden werden. Die Mutationen verteilen sich über den gesamten codierenden Bereich mit einem Cluster von 9 Mutationen in Exon 7.

Tabelle 3.2 Missense-Mutationen

\* alle betroffenen Mitglieder einer dieser Familien wiesen zusätzlich IVS1-5 C>A auf

\*\* Patient hat zusätzlich eine 1 bp Deletion in Exon 7

\*\*\* gleiche Familie; durch Klonierung des Exons 8 bei den betroffenen Mitgliedern und anschließende Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass beide Mutationen auf demselben Allel lokalisiert sind.

Exon	AS-Substitution traditionell	AS-Substitution systematisch	cDNA Nummerierung	genomische Nummerierung	Familien	Mitglieder	Referenz
2	M-22V	M1V	c.1 A>G	g.587 A>G	4	9	(Foerster et al.)
2	A-21V	A2V	c.5 C>T	g.591 C>T	2 *	4	(Foerster et al.)
3	P64A	P86A	c.256 C>G	g.2400 C>G	1	3	(Tarzi et al.,
3	L124S	L146S	c.437 T>C	g.2581 T>C	1	1	(Foerster et al.)
3	A134D	A156D	c.467 C>A	g.2611 C>A	1	1	(Foerster et al.)
3	M145R	M167R	c.500 T>G	g.2644 T>G	1	1	(Foerster et al.)
3	A146P	A168P	c.502 G>C	g.2646 G>C	1	2	(Foerster et al.)
3	F147S	F169S	c.506 T>C	g.2650 T>C	1	1	(Verpy et al.,
3	L156P	L178P	c.533 T>C	g.2677 T>C	2	4	(Foerster et al.)
3	G162R	G184E	c.550 G>A	g.2694 G>A	3	5	(Verpy et al.,
4	G162E	G184E	c.551 G>A	g.4351 G>A	2	2	(Zuraw and
4	I202N	I224N	c.671 T>A	g.4471 T>A	2	3	(Foerster et al.)
4	F203S	F225S	c.675 T>C	g.4474 T>C	2	2	(Foerster et al.)
5	S233T	S255T	c.764 G>C	g.8403 G>C	1	1 **	(Foerster et al.)
5	N236I	N258I	c.773 A>T	g.8412 A>T	1	1	(Foerster et al.)
5	N269H	N291H	c.871 A>C	g.8510 A>C	1	2	(Foerster et al.)
6	F281S	F303S	c.908 T>C	g.8741 T>C	1	1	(Foerster et al.)
6	A320P	A342P	c.1024 G>C	g.8857 G>C	2	3	(Foerster et al.)
7	G323R	G345R	c.1033 G>A	g.14034 G>A	1	1	(Roche et al.,
7	N330I	N352I	c.1055 A>T	g.14056 A>T	1	1	(Foerster et al.)
7	L331P	L353P	c.1058 T>C	g.14059 T>C	1	2	(Foerster et al.)
7	M348R	M370R	c.1109 T>G	g.14110 T>G	1	5	(Tarzi et al.,

Exon	AS-Substitution traditionell	AS-Substitution systematisch	cDNA Nummerierung	genomische Nummerierung	Familien	Mitglieder	Referenz
7	S367P	S389P	c.1165 T>C	g.14166 T>C	1	2	(Foerster et al.)
7	L374P	L396P	c.1187 T>C	g.14188 T>C	2		(Foerster et al.)
7	L376P	L398P	c.1193 T>C	g.14194 T>C	1	3	(Foerster et al.)
7	L376Q	L398Q	c.1193 T>A	g.14194 T>A	1	5	(Foerster et al.)
7	P377L	P399L	c.1196 C>T	g.14197 C>T	1	1	(Roche et al.,
7	R378C	R400C	c.1198 C>T	g.14199 C>T	1	3	(Foerster et al.)
7	M387R	M409R	c.1226 T>G	g.14227 T>G	1	2	(Foerster et al.)
7	L388P	L410P	c.1229 T>C	g.14230 T>C	1	1	(Foerster et al.)
8	C406R	C428R	c.1282 T>C	g.16674 T>C	1 <sup>***</sup>	4	(Foerster et al.)
8	M419T	M441T	c.1322 T>C	g.16714 T>C	1	1	(Foerster et al.)
8	E426Q	E448Q	c.1342 G>C	g.16734 G>C	1 <sup>***</sup>	4	(Foerster et al.)
8	R444G	R466G	c.1396 C>G	g.16788 C>G	1	4	(Foerster et al.)
8	R444C	R466C	c.1396 C>T	g.16788 C>T	5	14	(Skriver et al.,
8	R444H	R466H	c.1397 G>A	g.16789 G>A	6	9	(Ariga et al.,
8	P454L	P454L	c.1427 C>T	g.16813 C>T	1	1	(Foerster et al.)
8	V458G	V480G	c.1439 T>G	g.16831 T>G	1	2	(Foerster et al.)
8	P476S	P498S	c.1492 C>G	g.16884 C>T	1	1	(Verpy et al.,
8	P476L	P498L	c.1493 C>T	g.16885 C>T	1	1	(Foerster et al.)

### 3.1.3.2 Nonsense-Mutationen

Bei 8 Familien mit 16 Mitgliedern konnten durch Sequenzierung neue Nonsense-Mutationen nachgewiesen werden. Durch eine Basensubstitution wird dabei das Codon einer Aminosäure in ein vorzeitiges Stop-Codon umgewandelt. Als Resultat entsteht eine instabile mRNA und/oder bei der Translation ein verkürztes Protein. In Tabelle 3.3 sind die Nonsense-Mutationen aufgeführt.

Tabelle 3.3 Nonsense-Mutationen

Exon	AS-Substitution traditionell	AS-Substitution systematisch	cDNA Nummerierung	genomische Nummerierung	Familien	Mitglieder	Referenz
3	S-1X	S22X	c.65 C>G	g.2209 C>G	1	3	(Roche et al.,
3	Q82X	Q104X	c.310 C>T	g.2454 C>T	1	1	(Foerster et al.)
3	Q86X	Q108X	c.322 C>T	g.2466 C>T	1	1	(Foerster et al.)
3	E112X	E134X	c.400 G>T	g.2544 G>T	1	6	(Foerster et al.)
4	L168X	L190X	c.568 A>T	g.4368 A>T	1	1	(Foerster et al.)
4	L179X	L201X	c.601 A>T	g.4401 A>T	1	1	(Foerster et al.)
6	W277X	W299X	c.897 G>A	g.8730 G>A	1	3	(Foerster et al.)
7	Q326X	Q348X	c.1042 C>T	g.14043 C>T	1	2	(Foerster et al.)
8	Q420X	Q442X	c.1324 C>T	g.16716 C>T	1	1	(Foerster et al.)
8	R472X	R494X	c.1480 C>T	g.16872 C>T	9	15	(Verpy et al.,

### 3.1.3.3 Kleine Deletionen, Insertionen und Duplikationen

31 unbeschriebene kleine Deletionen, Insertionen und Duplikationen konnten in 36 Familien mit 58 Mitgliedern nachgewiesen werden (Tabelle 3.4). Häufig handelte es sich dabei um die Deletion einer einzelnen Base im *CI-INH*-Gen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führt. Als Konsequenz entsteht meistens ein vorzeitiges Stop-Codon down-stream, das ebenfalls wie im Falle der Nonsense-Mutationen, zu einer verkürzten Proteinsynthese führt. In Exon 3 konnte eine Duplikation von 20 bp bei einer Familie mit 4 Mitgliedern identifiziert werden, die ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserahmens führt. Weiterhin wurden 4 verschiedene mit Insertionen gekoppelte Deletionen in den Exons 5, 6 und 8 identifiziert.

Tabelle 3.4 Kleine Deletionen, Insertionen und Duplikationen

\* Patient hat zusätzlich S233T

Exon	cDNA Nummerierung	genomische Nummerierung	Familien	Mitglieder	Referenz
2	c.40_49del10	g.626_641del10	1	2	(Foerster et al.)
3	c.196delC	g.2340delC	1	1	(Foerster et al.)
3	c.275delC	g.2407delC	1	1	(Foerster et al.)
3	c.325_337del13bp	g.2469_2481del13bp	2	6	(Foerster et al.)
3	c.358_377dup	g.2502_2521dup	1	4	(Foerster et al.)
3	c.383_384delCT	g.2527_2528delCT	1	1	(Foerster et al.)



Exon	cDNA Nummerierung	genomische Nummerierung	Familien	Mitglieder	Referenz
3	c.444_455del11bp	g.2588_2598del11bp	1	1	(Foerster et al.)
3	c.459delC	g.2603delC	1	2	(Foerster et al.)
3	c.534_535insTT	g.2678_2679insTT	1	1	(Foerster et al.)
4	c.573_585del13bp	g.4373_4385del13bp	1	1	(Foerster et al.)
5	c.690 delGCCATAAinsTCCCTTAT	g.8329 delGCCATAAinsTCCCTTAT	1	1	(Foerster et al.)
5	c.790_813del24bp	g.8429_8452del24bp	1	1	(Foerster et al.)
5	c.814_816delAAC	g.8453_8455delAAC	2	8	(Verpy et al.,
5	c.864_884del21insG	g.8503_8523del21insG	1	1	(Foerster et al.)
5	c.868_870delCTC	g.8507_8509delCTC	1	1	(Foerster et al.)
6	c.950delA	g.8783delA	1	1	(Foerster et al.)
6	c.963_964delAGinsT	g.8796_8797delAGinsT	1	1	(Foerster et al.)
6	c.964delG	g.8797delG	1	1	(Foerster et al.)
7	c.1078_1084del7bp	g.14079_14085del7bp	1	1	(Foerster et al.)
7	c.1097delG	g.14098delG	1	4	(Foerster et al.)
7	c.1184delT	g.14185delT	1	1*	(Foerster et al.)
7	c.1189_90insA	g.14190_91insA	1	1	(Foerster et al.)
7	c.1212_1215delGACC	g.14213_14216delGACC	1	2	(Foerster et al.)
7	c.1216delA	g.14217delA	2	4	(Foerster et al.)
7	c.1220delA	g.14221delA	3	5	(Foerster et al.)
7	c.1245delA	g.14246delA	1	1	(Foerster et al.)
8	c.1353_1354delGA	g.16745_16746delGA	1	1	(Foerster et al.)
8	c.1366_1369delGCGGInsA	g.16758_16761delGCGGInsA	1	2	(Foerster et al.)
8	c.1402delC	g.16794delC	1	1	(Foerster et al.)
8	c.1407_1427del21bp	g.16799_16819del21bp	2	3	(Foerster et al.)
8	c.1420_1421insC	g.16812_16813insC	1	1	(Foerster et al.)
8	c.1432delC	g.16824delC	1	2	(Foerster et al.)

### 3.1.3.4 Splice-Site-Mutationen

Bei 14 Familien mit 27 Mitgliedern konnten 11 neue Veränderungen einer Konsensus-Spleißstelle an verschiedenen Exon-Intron Grenzen entdeckt werden (Tabelle 3.5).

Mit Hilfe zweier Algorithmen zur Vorhersage von Spleiß-Stellen (Splice Site Prediction by Neural Network ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) und NetGene 2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)) wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der

das veränderte Gen während der Transkription korrekt gespleißt wird. Beide Programme gaben einen Wert („Score“) zwischen 0,1 und 1 an, der die Wahrscheinlichkeit der Verwendung der Spleißakzeptor- bzw. Spleißdonorstelle im betreffenden Exon des Gens anzeigte. Je höher dieser Wert ausfiel, desto wahrscheinlicher wurde die betreffende Akzeptor- bzw. Donorsequenz zum korrekten spleißen verwendet. Ein Nachteil der verwendeten Programme bestand darin, dass die durch eine Mutation geänderte Spleißstelle bei einem Wert unter 0,1 nicht mehr angezeigt wurde, sondern gänzlich wegfiel. Deshalb mussten immer die Spleißstellen der WT-Sequenz mit denen der mutierten Sequenz verglichen und auf eine Abwesenheit der betroffenen Stelle überprüft werden.

Tabelle 3.5 Splice-Site-Mutationen

\* durch die Mutation IVS7-13 G&gt;A entsteht eine neue Akzeptorspleißstelle mit neuem Wert

Exon	Mutation	cDNA Nummerierung	genomische Nummerierung	Familien und Mitglieder		Neural Network		NetGene 2 Server		Referenz
						WT	Mut	WT	Mut	
2	IVS1-1	c.1-23 G>A	g.564 G>A	1	2	0,89	fehlt	0,00	fehlt	(Verpy et al.,
2	IVS2+1	c.51+1G>A	g.638 G>A	1	3	0,63	fehlt	0,91	fehlt	(Foerster et al.)
3	IVS2-1	c.52-1 G>A	g.2195 G>A	1	1	0,57	fehlt	0,00	fehlt	(Foerster et al.)
4	IVS3-2	c.551-2 A>G	g.4349 A>G	3	4	0,96	fehlt	1,00	fehlt	(Foerster et al.)
4	IVS3-3	c.551-3 C>G	g.4348 C>G	1	2	0,96	0,15	1,00	0,56	(Foerster et al.)
4	IVS4+1	c.685+1 G>A	g.4486 G>A	2	4	1,00	fehlt	0,99	fehlt	(Foerster et al.)
5	IVS5+1	c.889+1 G>T	g.8529 G>T	1	2	0,98	fehlt	0,95	fehlt	(Foerster et al.)
6	IVS6+1	c.1029+1 G>A	g.8863 G>A	1	2	1,00	fehlt	1,00	fehlt	(Foerster et al.)
6	IVS6+3	c.1029+3_c.1029+6 del4bp	g.8865_8868 delAAGT	1	2	1,00	fehlt	1,00	fehlt	(Foerster et al.)
6	IVS6-1	c.1030-1 G>C	g.14030 G>C	1	2	0,96	fehlt	1,00	fehlt	(Verpy et al.,
7	IVS7+1	c.1249+1G>A	g.14251 G>A	1	1	0,88	fehlt	0,95	fehlt	(Foerster et al.)
8	IVS7-13	c.1250-13 G>A	g.16629 G>A	1	2	0,71	0,68 0,98*	1,00	0,97 0,50*	(Foerster et al.)
8	IVS7-2	c.1250-2 A>G	g.16640 A>G	1	4	0,71	fehlt	1,00	fehlt	(Foerster et al.)

Die beiden Programme stimmten bei neun der untersuchten Mutationen sehr gut überein.

Das Programm „NetGene 2 Server“ entdeckte bei zwei Mutationen (IVS1-1 G>A und IVS2-1 G>A) die wildtypische Akzeptorspleißstelle, gab diese jedoch mit einem Wert von 0,0 an. Durch die entsprechenden Mutationen fiel in beiden Fällen die Spleißstelle weg. Das Programm „Splice Site Prediction by Neural Network“ erkannte die wildtypische Akzeptorspleißstelle und gab ebenfalls einen Wegfall der Spleißstelle durch die Mutation an.

Die Mutation IVS3-3 C>G führte bei beiden Programmen zur Reduzierung der Spleiß-Wahrscheinlichkeit, wobei das Programm „NetGene 2 Server“ die Spleiß-Wahrscheinlichkeit nur zu 50 % reduziert angab.

Die Mutation IVS7-13 G>A (c.1250-13 G>A) führte zwar in beiden Programmen nur zu einer geringfügigen Verringerung des wildtypischen Spleiß-Wertes, aber durch diese Basensubstitution wurde bei beiden Programmen eine zusätzliche Akzeptorstelle (ag<sup>^</sup>TTTTGCCCTA) angezeigt, die im Falle des Programms „Splice Site Prediction by Neural Network“ sogar über dem Wert der wildtypischen lag. Durch Verwendung dieser Spleißstelle werden Teile des Introns zum Exon hinzugefügt und durch diese Leserasterverschiebung kommt es schon sehr bald zu einem vorzeitigen Stop-Codon.

Da kein Patientenmaterial für eine mRNA-Analyse zur Verfügung stand, konnten die von den Programmen vorhergesagten Auswirkungen der Splice-Site-Mutationen jedoch nicht experimentell bestätigt werden.

### 3.1.3.5 Polymorphismen

Tabelle 3.6 listet zwei Nukleotidveränderungen in der codierenden Region des *CI-INH* auf, die nicht zur Substitution einer Aminosäure führen.

Der Austausch C>T an der Position c.751 führt zu einem Austausch CTA>TTA. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Leucin, weshalb die Nukleotidveränderung keinen Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung des Proteins hat. Dieser Austausch wurde zusätzlich zu anderen Veränderungen in zwei nichtverwandten Familien gefunden. Die erste Familie zeigte neben der stillen Mutation Leu229Leu eine 4 bp Deletion, die zweite Familie eine Stop-Mutation Q86X. Diese Mutationen sind ursächlich für HAE, wodurch die Variante c.751 C>T sehr wahrscheinlich als Polymorphismus anzusehen ist.

Ein weiterer Nukleotid austausch C>T an der Position c.1380 wurde in einer Familie gefunden und führte zu einer stillen Mutation Ser438Ser. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Vater, der selbst keinerlei Symptome eines HAE oder anderweitig auffällige Laborwerte aufwies, das veränderte Allel an seine drei betroffenen Kinder vererbt hatte. Weiterhin wurden in den Introns des Gens Basenaustausche entdeckt, die die Konsensus-Spleißstelle nicht betreffen und laut den zwei Spleiß-Vorhersage-Programmen keine Veränderung des Spleiß-Vorganges bewirken.

Tabelle 3.6 Polymorphismen und Variationen in den Introns

\* wurde in zwei nicht verwandten Familien nachgewiesen

\*\* wurde in zwei nicht verwandten Familien nachgewiesen

Exon/Intron	Nukleotidveränderung	Effekt	HAE-Mutation/Bemerkung
Exon 5*	C>T (c.751)	Leu229Leu	c.1211-1214 del; Q86X c.322C>T
Exon 8	C>T (c.1380)	Ser438Ser	durch den nichtbetroffenen Vater vererbt
Intron 1**	IVS1+45 T>C	?	N236I c.773 A>T; Q94 X
Intron 1	IVS1+61 G>T	?	
Intron 2	IVS2+29 G>T	?	
Intron 2	IVS2+41 G>T	?	
Intron 3	IVS3+29 G>T	?	
Intron 4	IVS4-42 A>C	?	

### 3.1.3.6 Keine Mutation im *C1-INH*-Gen

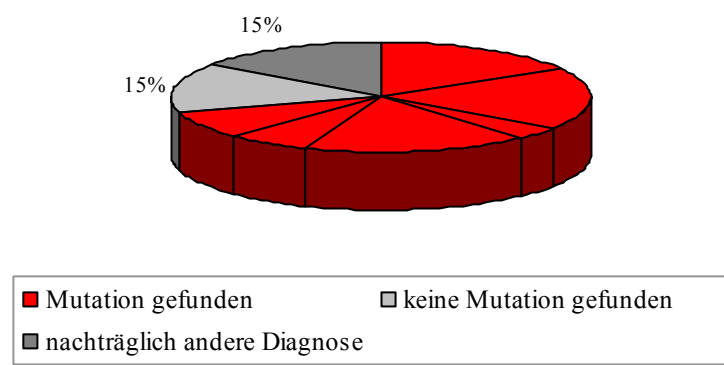


Abbildung 3.7 Detektionsrate des genetischen Analyseprotokolls

Bei 30 % aller eingesandten Patientenproben konnte durch die angewandten Methoden keine Mutation im *C1-INH*-Gen festgestellt werden. Durch eine Überprüfung der klinischen Daten konnte bei 15 % aller Patienten die Diagnose HAE nachträglich ausgeschlossen werden. Bei 70 % der eingesandten Proben konnten Mutationen im *C1-INH*-Gen identifiziert werden, die in verschiedene Mutationsklassen eingeteilt wurden und in der Abbildung mit Segmenten im roten Bereich dargestellt werden.

Bei 62 Familien mit 64 Mitgliedern konnte mit den oben beschriebenen Untersuchungen keine Veränderungen des *C1-INH* nachgewiesen werden.

Eine nachträgliche Überprüfung der klinischen Daten der Patienten zeigte, dass durch weitere Untersuchungen bei 7 Familien die Diagnose HAE durch die Diagnose AAE berichtigt worden war. In weiteren 24 Familien konnten aufgrund der klinischen Entwicklung der Verdacht auf HAE nicht aufrechterhalten werden.

Im Endeffekt konnten deshalb bei 31 Familien (15 %), die sehr wahrscheinlich an HAE erkrankt sind, keine Mutation im *C1-INH*-Gen nachgewiesen werden (Abbildung 3.7).

### 3.1.4 Zusammenfassung der C1-Inhibitor Gendiagnostik

Abbildung 3.8 zeigt die prozentuale Verteilung der 96 neuen Mutationen, die in den untersuchten Proben identifiziert wurden. Missense-Mutationen sind mit 31 % neben den kleinen Deletionen und Insertionen (33 %) die häufigste Mutationsart. Nonsense-Mutationen kommen mit 8 % relativ selten vor.

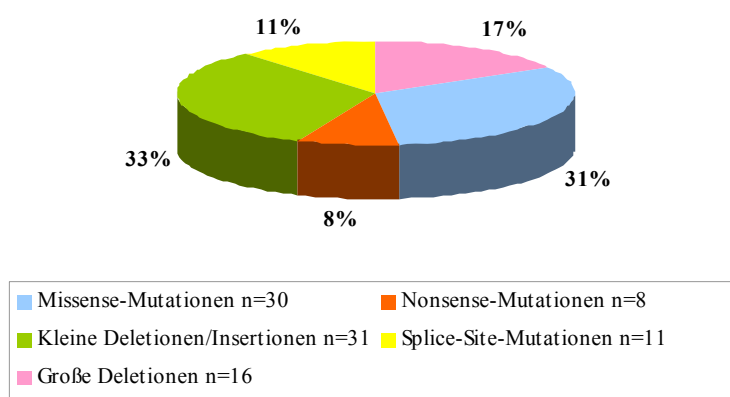


Abbildung 3.8 Prozentuale Verteilung der 96 neuen Mutationen der untersuchten Kohorte

In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse der C1-Inhibitor Gendiagnostik noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 3.7 Zusammenfassung der verschiedenen Mutationsarten in der Kohorte

	Mutationsart	Anzahl der Mutationen	Familien	Mitglieder
<b>bekannte Mutationen</b>	Punktmutationen	13	34	64
<b>neue Mutationen</b>	große Deletionen	16	16	32
	Missense-Mutationen	30	38	72
	Nonsense-Mutationen	8	8	16
	kleine Deletionen/Insertionen	31	36	58
	Splice-Site-Mutationen	11	14	27
	keine familiäre Mutation			28
<b>keine Mutation (insgesamt)</b>			62	62
	<i>nachträgliche Diagnose: AAE</i>		7	7
	<i>nachträgliche andere Diagnose</i>		24	23
	keine Mutation bei bestätigter Diagnose HAE		31	34

## 3.2 Expressionsanalyse rekombinanter C1-INH-Varianten

Die funktionelle Auswirkung der in der genetischen Analyse gefundenen Missense-Mutationen lässt sich nicht allein durch einen Vergleich zwischen den chemischen Eigenschaften der alten und der neuen Aminosäure vorhersagen. Ein weiteres Kriterium für die Kausalität einer beobachteten Variante ist daher die evolutionäre Konservierung dieser Aminosäureposition in den homologen Genen anderer Spezies. Die überzeugendsten Argumente liefert aber ein funktioneller Test. Um die Kausalität der beobachteten Veränderungen zu ermitteln, wurde daher ein rekombinantes Expressionssystem für C1-INH etabliert, das es erlaubt, die inhibitorische Aktivität des rekombinanten Proteins quantitativ zu bestimmen. Nach gezielter Mutagenese konnten damit die Auswirkungen einzelner Missense-Mutationen untersucht werden.

### 3.2.1 Homologie-Alignment

Mit Hilfe des Internetprogrammes Multalign wurde ein Homologie-Vergleich der C1-INH-Proteinsequenz verschiedener Spezies durchgeführt und überprüft, ob die Mutationen der HAE-Patienten konservierte AS betrafen (siehe Abschnitt 2.9.2).

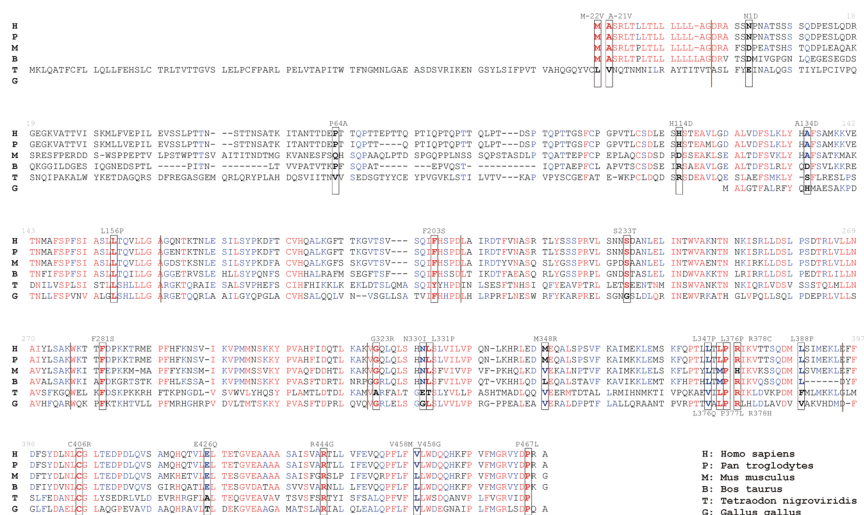


Abbildung 3.9 Sequenzvergleich des C1-INH verschiedener Spezies  
Mutationen, die bei HAE-Patienten identifiziert wurden sind durch einen Kasten gekennzeichnet und beschriftet.  
Diese Abbildung ist im Anhang 6.2 größer dargestellt.  
Verwendete Software: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Bis auf *Tetraodon* und *Gallus* ist der N-Terminus der verschiedenen C1-INH-Sequenzen stark konserviert. Beim humanen C1-INH fängt das reife Protein nach dem 22 AS langem

Signalpeptid mit der AS Asparagin an. Bei Maus und Rind befindet sich an dieser Stelle die AS Asparaginsäure.

Nur 15 der 29 betrachteten Aminosäureaustausche betreffen Positionen, die in der Evolution stark konserviert sind. Die funktionelle Bedeutung des Cysteins 406 sowie des Arginins 444 im RCL sind unmittelbar einleuchtend. Für die anderen Positionen liefert die Homologie-Betrachtung aber keine überzeugenden Argumente für oder gegen die Kausalität eines AS-Austauschs.

Alle Mitglieder der Serpin-Superfamilie werden anhand ihrer Funktion, Sequenz und Exon-Intron-Struktur in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Für einen Homologie-Vergleich verschiedener humaner inhibitorischer Serpine wurden Mitglieder mehrerer Untergruppen wie Antitrypsin, Antithrombin,  $\alpha$ -2-Antiplasmin, PEDF und Heparin-Cofaktor verwendet.

Die Sequenzen der humanen Serpine unterscheiden sich sehr stark. Nichtsdestotrotz sind einige Bereiche der Proteine konserviert, was auf die Entstehung der Serpin-Familie durch Genduplikationen zurückzuführen ist.

Die Proline 377 und 456 sowie das Phenylalanin 281 sind in den betrachteten Serpinen perfekt konserviert, was auf eine wichtige Funktion hinweist.



Abbildung 3.10 Sequenzvergleich verschiedener humaner Serpine

Mutationen, die im C1-INH bei HAE-Patienten identifiziert wurden sind durch einen Kasten gekennzeichnet und beschriftet. Diese Abbildung ist im Anhang 6.2 größer dargestellt.

## 3.2.2 Rekombinante Expression in HEK-293 Zellen

### 3.2.2.1 Klonierung des C1-Inhibitors

Die gesamte kodierende Sequenz des *C1-INH* wurde aus einer humanen Leber cDNA-Bank amplifiziert und mit Hilfe angehängter Restriktionsschnittstellen für die Enzyme Hind III und Not I in den Expressionsvektor pCEP4 kloniert (siehe Abschnitt 2.12.1.)

Um zu gewährleisten, dass während der Klonierung keine Sequenzveränderungen stattgefunden hatten, wurden das gesamte Insert und angrenzende Teile des Vektors sequenziert.

### 3.2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden Punktmutationen, die im Rahmen der *C1-INH*-Gendiagnostik bei HAE-Patienten identifiziert worden waren, in das cDNA-Konstrukt eingeführt (siehe Abschnitt 2.12.1.4). Die Mutationen waren über das gesamte Gen verteilt und bewirkten verschiedene Aminosäuresubstitutionen.

Zur Überprüfung der geglückten Mutagenese und zum Ausschluss weiterer Mutationsereignisse wurde das Insert wiederum komplett sequenziert (Abbildung 3.11).

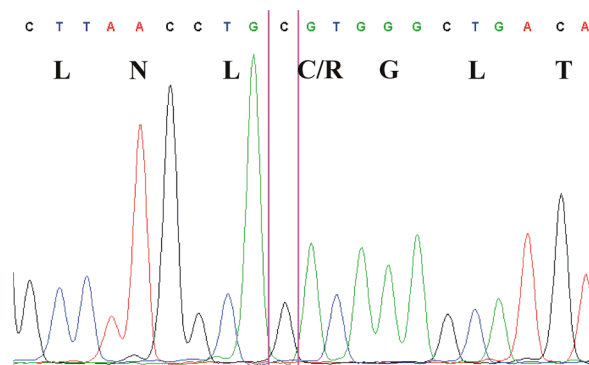


Abbildung 3.11 Sequenzierung des Inserts nach zielgerichteter Mutagenese

Durch die zielgerichtete Mutagenese wird das Codon TGT (Cys406) im Exon 8 des C1-INH zu einem CGT (Arg406) homozygot mutiert.

### 3.2.2.3 Transfektion in HEK-293 Zellen

Im Vergleich zu Bakterienzellen findet in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) eine korrekte posttranslationale Modifizierung wie Glykosylierung oder Phosphorylierung humaner rekombinanter Proteine statt. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit HEK-293 Zellen mit dem Konstrukt aus 3.2.2.2 nach der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Sie exprimierten anschließend den rekombinanten C1-Inhibitor mit guter Ausbeute und hoher Aktivität.



Zur Kultivierung und Vermehrung der HEK-293 Zellen wurde dem Medium fötales Kälberserum (FKS) als Supplement in einer Konzentration von 15 % zugegeben. Da das Serum bovines C1-INH enthalten kann, wurden die Zellen nach der Transfektion nur für kurze Zeit in FKS-haltigem Medium zur Überwindung des Transfektions-Stresses kultiviert; danach wurden die Zellen mit FKS-freiem Medium behandelt, um eine Verfälschung der Ergebnisse mit exogenem C1-INH zu vermeiden.

Die codierende Sequenz des C1-INH besitzt ein Signalpeptid zur Sekretion des Proteins über die Zellmembran. Dieses Signalpeptid wird auch in HEK-Zellen richtig erkannt, so dass das rekombinante Protein in das Zellkulturmedium geschleust wurde, das anschließend direkt zur Messung der C1-INH-Aktivität eingesetzt werden konnte.

### **3.2.3 Messung der C1-INH-Aktivität der rekombinant exprimierten Varianten**

Die Aktivität des rekombinanten C1-INH wurde mit dem Testkit Immunochrom (Immuno, Vienna Austria) bestimmt, der auch in der laborchemischen Bestimmung der C1-INH-Aktivität im menschlichen Plasma eingesetzt wird.

In dieser Arbeit wurde die sog. kinetische Messmethode des Kits angewandt. Dabei wird C1-Esterase, eine Zielprotease des C1-INH, dem Überstand der Zellkultur aus 3.2.2.3 im Überschuss zugegeben. Protease und rekombinanter Inhibitor bilden während einer Inkubationszeit einen stöchiometrischen Komplex, wodurch die Protease ihre Funktion verliert (siehe Abschnitt 1.7.1.2).

Die verbleibende C1-Esterase spaltet in einem zweiten Reaktionsschritt spezifisch aus einem zugegebenen Substrat  $C_2H_5CO\text{-lys}(\epsilon\text{-Cbo})\text{-Gly-Arg-pNA}$  eine chromogene Gruppe pNA ab (Abbildung 3.12). Diese Gruppe kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm nachgewiesen werden.

Über einen Zeitraum von  $4 \times 1$  min wurde die Konzentrationszunahme des pNA anhand der Extinktionszunahme bei 405 nm gemessen und die Werte anschließend gemittelt.

Je mehr rekombinanter C1-INH die Protease komplexieren konnte, desto weniger übrig gebliebene C1-Esterase konnte die chromogene Gruppe aus dem Substrat abspalten und desto geringer viel die Extinktionszunahme aus. Die Extinktionszunahme ist also umgekehrt proportional der C1-INH-Aktivität.

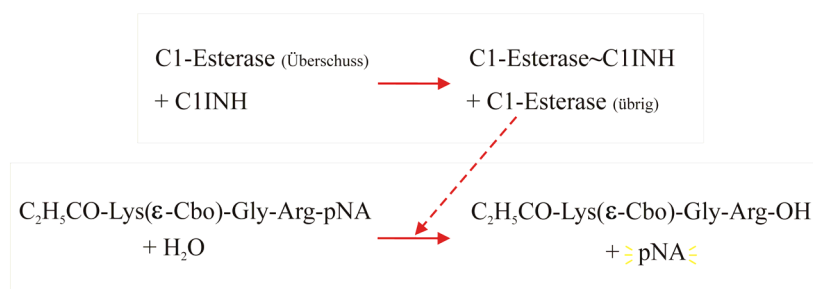


Abbildung 3.12 Testprinzip des Aktivitäts-Assays

Nach Zugabe eines Überschusses der Zielprotease C1-Esterase kann der rekombinant exprimierte C1-INH während einer Inkubationszeit einen Enzym-Inhibitor Komplex bilden. Die übrige Protease spaltet aus einem Substrat eine chromogene Gruppe pNA ab, die bei 405 nm nachgewiesen werden kann.

Anhand der dem Kit beiliegenden Referenzplasmen mit angegebener C1-INH-Aktivität wurde eine Bezugskurve angefertigt. Die Expression des Wildtyp-Proteins (WT) ergab dabei eine Extinktion und Aktivität vergleichbar mit einer 1:10 Verdünnung des Referenzplasmas.

Nachdem die inhibitorische Aktivität des rekombinanten, wildtypischen C1-INH nachgewiesen worden war, wurde seine Extinktionsänderung  $\Delta E_{WT}$  mit einer Aktivität von 100 % gleichgesetzt.

HEK-293 Zellen, die mit dem pCEP4 Vektor ohne das C1-INH-Insert transfiziert wurden (Mock-Transfektion), exprimierten keinen Inhibitor (siehe auch Abbildung 3.15, Western-Blot). Die Extinktionsänderung  $\Delta E_{Mock}$  wurde daher mit 0 % Aktivität gleichgesetzt.

Die Extinktionsänderungen der mutierten Proteine wurden nach mindestens drei unabhängigen Transfektionen bestimmt und gemittelt (Abbildung 3.13).

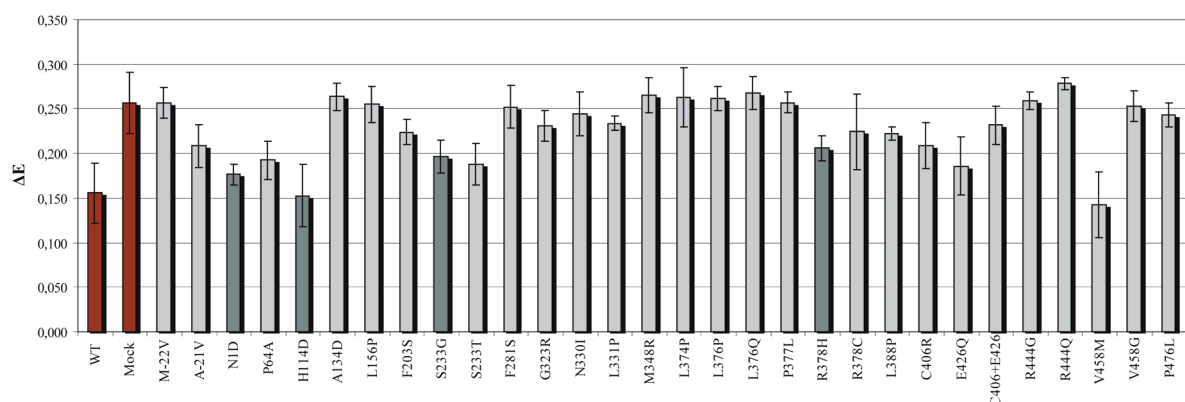


Abbildung 3.13 Extinktion bei 405 nm verschiedener C1-INH-Proteinvarianten

In dunkelrot sind die Extinktionen des WT-Proteins und der Mock-Transfektion, in hellgrau Extinktionen verschiedener humaner Missense-Mutationen und in dunkelgrau verschiedener muriner Aminosäurevariationen dargestellt.

Die Proteinaktivität wurde in Abhängigkeit des WT aus der Extinktion berechnet (siehe Abschnitt 2.12.5.3) und prozentual dazu angegeben (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8 Aktivitätsmessung verschiedener C1-INH-Proteinvarianten

*Die kursiv hervorgehobene Varianten sind AS-Substitutionen wie sie natürlich in der Maus oder im Rind vorkommen.*

\*: bekannter Polymorphismus beim Menschen

Position	Mutation	Extinktionsänderung		C1-INH-Aktivität		Anzahl	
				in % ± SD		Familien	Mitglieder
	WT	0,156	± 0,034	<b>100,00</b>			
	Mock	0,257	± 0,034	<b>0,00</b>			
Exon2	M-22V	0,257	± 0,017	<b>6,30</b>	± <b>6,57</b>	4	9
	A-21V	0,208	± 0,024	<b>49,40</b>	± <b>17,71</b>	2	4
Exon3	<i>N1D</i>	0,176	± 0,012	<b>93,42</b>	± <b>12,80</b>		
	P64A	0,192	± 0,021	<b>83,65</b>	± <b>28,58</b>	1	3
	<i>H114D</i>	0,153	± 0,035	<b>123,07</b>	± <b>35,09</b>		
	A134D	0,264	± 0,016	<b>8,38</b>	± <b>9,26</b>	1	1
	L156P	0,255	± 0,020	<b>8,54</b>	± <b>8,83</b>	2	4
Exon4	F203S	0,224	± 0,014	<b>9,21</b>	± <b>6,57</b>	2	3
Exon5	<i>S233G</i>	0,197	± 0,018	<b>76,91</b>	± <b>17,06</b>		
	<i>S233T</i>	0,188	± 0,024	<b>85,17</b>	± <b>12,64</b>	1	1
Exon6	F281S	0,252	± 0,024	<b>0,25</b>	± <b>0,36</b>	1	1
Exon7	G323R	0,231	± 0,017	<b>7,46</b>	± <b>5,40</b>	1	1
	N330I	0,245	± 0,024	<b>7,98</b>	± <b>11,29</b>	1	1
	L331P	0,234	± 0,008	<b>6,22</b>	± <b>10,77</b>	1	2
	M348R	0,265	± 0,020	<b>5,47</b>	± <b>13,39</b>	1	5
	L374P	0,263	± 0,033	<b>6,47</b>	± <b>8,46</b>	2	5
	L376P	0,261	± 0,014	<b>8,63</b>	± <b>11,74</b>	1	3
	L376Q	0,268	± 0,018	<b>8,75</b>	± <b>11,42</b>	1	5
	P377L	0,257	± 0,011	<b>5,02</b>	± <b>5,22</b>	1	1
	<i>R378H</i>	0,206	± 0,014	<b>81,30</b>	± <b>13,05</b>		
	R378C	0,224	± 0,042	<b>40,56</b>	± <b>23,58</b>	1	3
	L388P	0,222	± 0,007	<b>11,85</b>	± <b>6,41</b>	1	1
Exon8	C406R	0,209	± 0,025	<b>39,24</b>	± <b>16,38</b>	1	4
	E426Q	0,186	± 0,032	<b>53,59</b>	± <b>12,94</b>	1	4
	C406+E426	0,232	± 0,021	<b>12,14</b>	± <b>6,09</b>	1	4
	R444G	0,259	± 0,009	<b>1,19</b>	± <b>2,06</b>	1	4
	V458M	0,143	± 0,037	<b>104,70</b>	± <b>23,40</b>	*	
	V458G	0,253	± 0,017	<b>14,39</b>	± <b>12,51</b>	1	2
	P476L	0,243	± 0,014	<b>6,98</b>	± <b>3,64</b>	1	1

Die Abbildung 3.14 fasst die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen der verschiedenen mutanten C1-INH-Proteine zusammen.

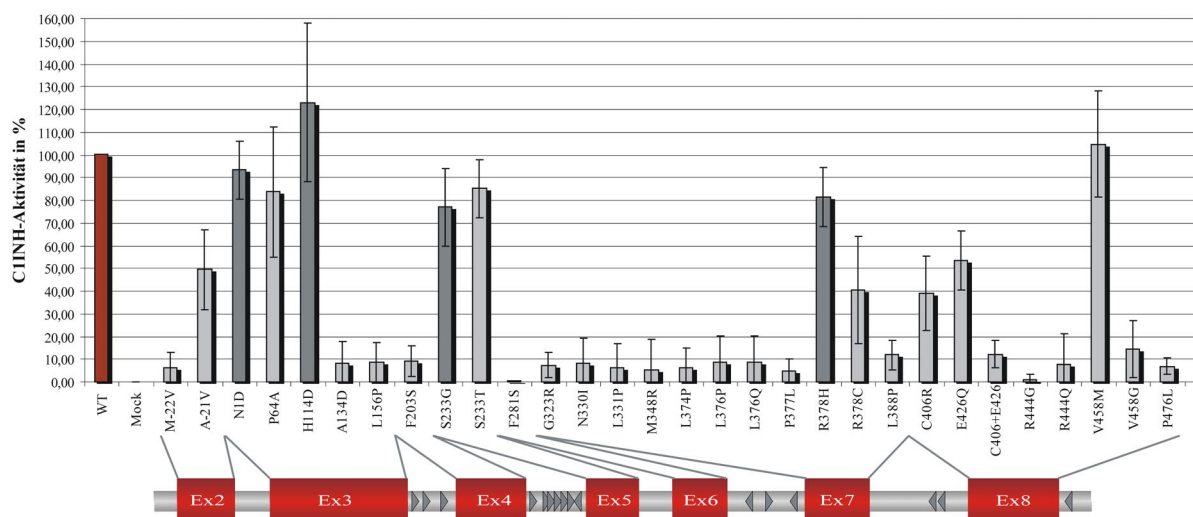


Abbildung 3.14 Berechnete C1-INH-Aktivität verschiedener C1-INH-Proteinvarianten  
 Die Aktivität des WT-Proteins, die auf den Wert 100 % festgelegt wurde, ist in dunkelrot angegeben. Die Mock-Transfektion besitzt keine C1-INH-Aktivität. In hellgrau sind die Aktivitäten verschiedener humaner Missense-Mutationen und in dunkelgrau verschiedener muriner und boviner Aminosäurevariationen dargestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen der verschiedenen Varianten geordnet nach ihrer Position im Protein näher beschrieben:

### **Exon 2:**

Das C1-INH-Protein wird hauptsächlich in der Leber produziert (Johnson et al., 1971). Die ersten 22 AS werden in Exon 2 und dem Anfang des Exons 3 codiert und bilden ein Signalpeptid, das für die Sekretion des Proteins über die Zellmembran in das Blutplasma verantwortlich ist. Das Signalpeptid ist zwischen den homologen Säuger-Genen hoch konserviert.

Ein Basenaustausch c.1 A>G führt zu einer Mutation **M-22V** und zum Verlust des bei der Translation benötigten Start-Codons ATG. Die Expression dieser C1-INH-Variante resultierte in einer Aktivität < 10 %.

Die Mutation **A-21V** (c.5 C>T) wurde durch Sequenzierung bei zwei nicht verwandten Familien entdeckt (siehe Tabelle 3.2). Der Aktivitäts-Assay des rekombinant exprimierten Proteins ergab eine Restaktivität von ca. 50 % verglichen mit dem WT-Protein.

**Exon 3:**

Im menschlichen C1-INH ist Asparagin an Position 1 die erste Aminosäure im prozessierten Protein. Bei der Maus beginnt das reife Protein mit einem Aspartat. Der Austausch der beiden Aminosäuren **N1D** ergab keine signifikante Veränderung in der Aktivität des Proteins.

Exon 2 und der größte Teil des Exons 3 codieren für die in der Serpin-Superfamilie einzigartige N-terminale Domäne. Die Serpin-Domäne beginnt mit AS 114. Im Vergleich der Spezies ist diese AS sehr variabel. Die Expression der Maus-spezifischen Variante **H114D** zeigte eine erhöhte C1-INH-Aktivität.

Bei einer englischen Familie konnte die Mutation **P64A** (c.256 C>G) sowohl beim Vater als auch seinem Kind nachgewiesen werden. Nach Angaben der behandelten Ärztin lag beim Vater aufgrund der klinischen Symptome und der laborchemischen Daten eine milde Form des HAE Typ I vor. Der Sohn war für eine zuverlässige Bestimmung der C1-INH-Werte noch zu jung, zeigte bis jetzt jedoch noch keine Symptome der Erkrankung. Die rekombinante Expression der P64A-Variante ergab eine C1-INH-Aktivität von ca. 80 %.

Bei einem HAE-Patienten wurde durch eine Mutation c.467 A>G die Aminosäuresubstitution **A143D** hervorgerufen. Dieser Austausch einer neutralen AS in eine saure kommt natürlicherweise im Rind vor und führte zu einer rekombinanten Aktivität von unter 10 %.

Zwei Familien mit insgesamt vier betroffenen Mitgliedern wiesen eine Mutation c. 533 T>C auf, die zum Tausch der hochkonservierten AS Leucin 156 durch ein Prolin führte. Die Expression der Mutation **L156P** ergab eine Aktivität unter 10 %.

**Exon 4:**

Die Mutation **F203S** (c. 674 T>C) wurde bei zwei Familien identifiziert und führte zu einer Aktivität < 10 % des Proteins verglichen mit dem WT. Das betroffene Phenylalanin ist zwischen den verschiedenen Spezies und auch innerhalb verschiedener humaner Serpine hochkonserviert.

**Exon 5:**

Das Serin an Position 233 ist hochkonserviert zwischen den Spezies. Die Expression der C1-INH-Variante **S233T** (c.764 G>C), die bei einem HAE-Patienten gefunden wurde, der zusätzlich eine Deletion eines Nukleotids in Exon 7 (c.1184 delT) aufwies, ergab eine

Aktivität von 80 %. Die Expression der beim Huhn vorkommenden **S233G** Variante ergab eine Aktivität ähnlich der des HAE-Patienten.

**Exon 6:**

Die Aminosäure Phenylalanin an Position 281 ist sowohl zwischen den Spezies als auch zwischen verschiedenen humanen Serpinen hoch konserviert. Die Substitution **F281S** (c.908 T>C), die bei einem der untersuchten Patienten identifiziert worden war, ergab eine kaum messbare Aktivität des mutierten Proteins.

**Exon 7:**

Die genetische Analyse der Kohorte ergab eine hohe Dichte an Punktmutationen in Exon 7 des *C1-INH*-Gens.

Bis auf den Fisch *Tetraodon nigroviridis* weisen alle verglichenen Spezies im C1-INH an der Position 323 ein Glycin auf. Die Variante **G323R** (c.1033 G>A) eines HAE-Patienten resultierte nach rekombinanter Expression in einer Aktivität von < 10 %.

Das hydrophile Asparagin N330 wurde bei einem Patienten durch die hydrophobe AS Isoleucin ersetzt (**N330I**; c.1055 A>T). In der Expressionsstudie konnte nur eine Aktivität < 10 % dieser Variante gemessen werden.

Das benachbarte, hoch konservierte Leucin **L331** wurde bei zwei Mitgliedern einer HAE-Familie in ein Prolin mutiert (c.1058 T>C). Die Expression ergab ebenfalls eine Aktivität < 10 %.

Eine englische Familie mit fünf Mitgliedern zeigte die Mutation **M348R** (c.1109 T>G). Trotz des geringen Konservierungsgrades des Methionins führte diese Substitution im Zellsystem zu einer Aktivität des rekombinanten C1-INH von weniger als 10 %. Klinische Daten dreier Patienten der Familie zeigen aber eine normale Funktion bei reduziertem Antigen an (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 Klinische Daten einer englischen Familie mit der Mutation M348R (Tarzi et al., unpublished data)

Patient	Alter	Sex	C1-INH-Antigen (mg/ L) (Norm-Bereich 150-350mg/ L)	C1-INH-Funktion (%) (Norm-Bereich >84%)	Genetische Daten
1 DF	69	F	78	92	Met348Arg
2 JA	20	M	100	93	Met348Arg
3 RA	11	M	122	84	Met348Arg

Die Aminosäuren Leu374 bis Arg378 sind sowohl zwischen den Spezies als auch zwischen verschiedenen Serpinen stark konserviert (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Bei sechs HAE-Familien mit insgesamt 17 Mitgliedern konnte eine Mutation in dieser Region des Gens identifiziert werden.

Zwei Mutationen substituierten dabei Leucine in Proline (**L374P**, c.1187 T>C **L376P**, c.1193 T>C). In einer anderen Familie wurde das Leu376 durch ein Glutamin (**L376Q**, c.1193 T>A) ersetzt. Die Mutation **P377L** (c.1196 C>T) ersetzt das heterozyklische Prolin durch ein hydrophobes Leucin. All diese Substitutionen resultierten in einer C1-INH-Aktivität < 10 %.

Drei Patienten einer Familie wiesen die Variante **R378C** (c.1198 C>T) auf. Die Maus besitzt an dieser Position ein Histidin. Die Expression der Maus-Variante **R378H** resultierte in einer Aktivität von 80 %, während die menschliche Variante eine Aktivität von ca. 40 % verglichen mit dem WT aufwies. Diese Ergebnisse zeigen, dass die AS Histidin an dieser Stelle des Proteins akzeptiert werden könnte, die AS Cystein die Proteinstruktur aber stark verändert.

Ein weiteres Leucin wurde an der Position 388 bei einem Patienten durch ein Prolin ersetzt (**L388P**, c.1229 T>C) und ergab eine Aktivität des rekombinanten Proteins von weniger als 10 %.

#### **Exon 8:**

Eines der vier Cysteine, die für die Verbindung der N-terminalen mit der C-terminalen Domäne durch zwei Disulfidbrücken essentiell sind, wird in Exon 8 durch das Triplet 406 codiert. In einer Familie mit vier Mitgliedern konnte eine Mutation entdeckt werden, die zur Substitution des Cysteins durch ein Arginin führte (**C406R**, c.1282 T>C). Bei allen betroffenen Mitgliedern dieser Familie konnte durch Sequenzierung geklonter Allele eine weitere Mutation **E426Q** (c.1342 G>C) 20 AS downstream in *cis* nachgewiesen werden. Wurden die beiden Mutationen getrennt voneinander exprimiert, ergab C406R eine Aktivität von 40 % und E426Q eine Aktivität von 50 %. Wurden die beiden Mutationen jedoch

zusammen durch einen einzigen Expressionsvektor in die Zellen eingefügt, verfügte das rekombinante Protein nur noch über eine Restaktivität von 12 %.

Das Aktive Zentrum bestimmt die Protease-Spezifität des Serpins. Beim C1-Inhibitor ist dafür, im Gegensatz zu anderen Serpinen, die AS Arginin an Position 444 verantwortlich. Bei einer Familie mit HAE Typ II wurde die bis jetzt noch nicht beschriebene Mutation **R444G** entdeckt. Die Expression dieser neuen Variante ergab - wie bereits erwartet - eine C1-INH-Aktivität von weniger als 10 %.

Der bekannte Polymorphismus **V458M** ergab nach der Expression eine Aktivität vergleichbar mit dem WT-Protein. In einer HAE-Familie führte ein Nukleotid austausch zur Mutation **V458G** (c.1439 T>G). Diese Variante resultierte in einer reduzierten Aktivität des rekombinanten Proteins von ca. 14 % und zeigte, dass die AS Glycin im Gegensatz zum Methionin an dieser Position des Proteins nicht tolerierbar ist

Bei einem HAE-Patienten wurde durch den Austausch eines Nukleotids das Codon 476 verändert. Auch die Substitution der letzten Aminosäure (**P476L**) im Protein führte zu einer signifikanten Abnahme der C1-INH-Aktivität.

### 3.2.4 Western-Blot Analyse

Ein Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen Mutationen und Varianten im C1-INH-Assay setzt voraus, dass die Einzelansätze mit einer vergleichbaren Transfektionseffizienz erfolgt waren.

Deshalb wurde die Effizienz der Transfektionen mittels Western-Blot überprüft. Dazu wurden Aliquots der Zellüberstände nach verschiedenen Transfektionen auf einem PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Durch Hybridisierung mit einem anti-C1-INH-Antikörper konnte das Protein nachgewiesen werden.

Als Kontrolle wurde humanes Plasma in einer 1:10 oder 1:20 Verdünnung aufgetragen.

Die mit einem „leeren“ Expressionsvektor (Mock) transfizierten Zellen stellten selbst keinen C1-INH her, so dass der Überstand dieser Zellen im Aktivität-Assay mit 0 % angegeben werden konnte.



Die meisten C1-INH-Varianten erschienen als Bande bei ca. 105 kDa gleich der C1-INH-Bande aus humanem Kontrollplasma (Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16). Obwohl zur Transfektion immer die gleiche Menge Expressionsvektor eingesetzt worden war, viel die Effizienz der Expression von Mutante zu Mutante unterschiedlich aus.

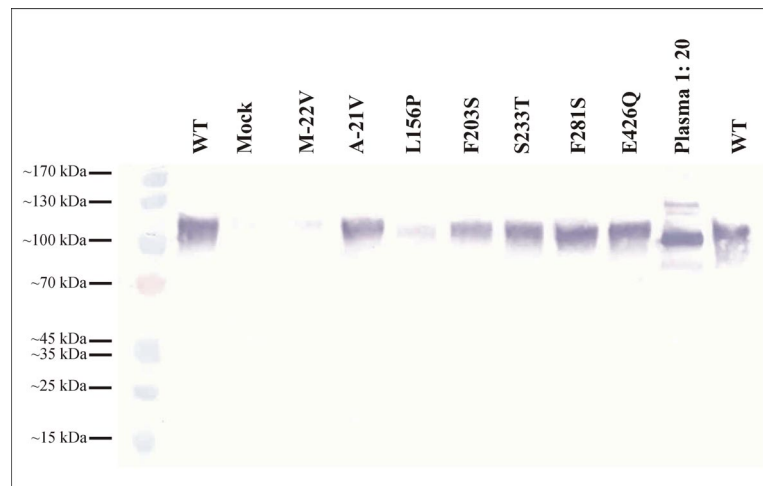


Abbildung 3.15 Western-Blot: Auftrennung verschiedener rekombinanter C1-INH-Varianten auf einem Bis-Tris 3-8 % Fertiggel

Die Mutation C406R und auch die Doppelmutante C406R-E426Q führte im Western-Blot zu einer niedrigeren Bande (Abbildung 3.16). Die Mutation E426Q lief auf gleicher Höhe wie das Wildtyp-Protein (WT). Der Austausch des für die Sekundärstruktur erforderlichen Cysteins 406 hat also eine erkennbare Strukturveränderung zur Folge.

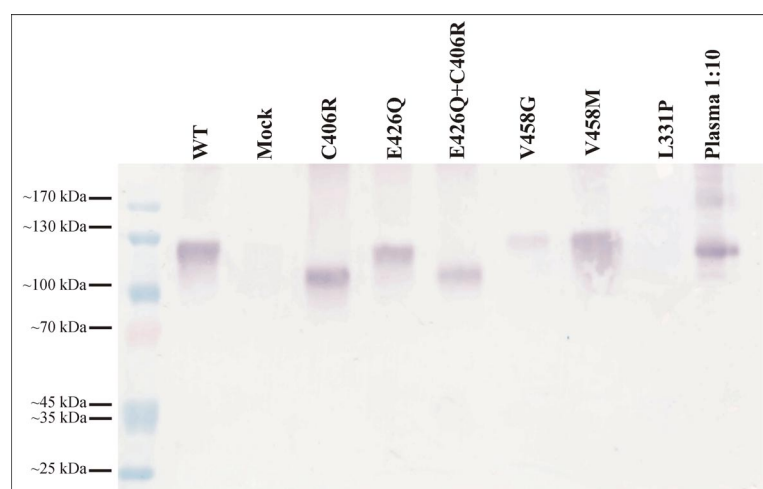


Abbildung 3.16 Western-Blot: Auftrennung verschiedener rekombinanter C1-INH-Varianten auf einem 10 % PAA-Gel

### 3.2.5 3D-Modellierung

Die kristalline Struktur des C1-INH ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt worden weshalb kein reales 3D-Struktur-Modell des Proteins zur Verfügung steht. Die Arbeitsgruppe um Bos (Bos et al., 2002) hat unter der Bezeichnung 1M6Q.pdb in der Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) ein auf der Kombination struktureller Daten verschiedener Serpine basierendes Modell des C1-INH veröffentlicht. Da die N-terminale Domäne des C1-INH in der Serpinfamilie einzigartig ist, beinhaltet das Modell nur die Serpindomäne und beginnt erst mit AS 116.

In dieser Arbeit wurde das Programm PyMOL (Version 0.99rc1, DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2006) zu beziehen unter <http://www.pymol.org>) zur Visualisierung der Auswirkungen verschiedener Mutationen auf die tertiäre Struktur des C1-INH-Proteins verwendet.

Durch das Programm-Werkzeug „wizard mutagenesis“ wurden die Aminosäuren mit der Option „backbone-dependent“ entsprechend der Mutation substituiert und anschließend Vergleiche der mutanten Protein mit dem Wildtyp-Protein hergestellt.

Zur besseren Übersicht sind die verschiedenen Modelle im „Cartoon-Modus“ dargestellt. Dabei werden  $\alpha$ -Helices als gewundene Strukturen und  $\beta$ -Faltblätter als Pfeile visualisiert. PyMOL ermöglicht die farbliche Kennzeichnung dieser verschiedenen Proteinstrukturen. In der vorliegenden Arbeit wurden, wie schon in Abbildung 1.8, die drei  $\beta$ -Faltblätter A, B und C in rot, grün bzw. blau dargestellt. Die gelben  $\alpha$ -Helices werden von grauen Loops verbunden. Der orange RCL bildet eine exponierte Schleife, die aus dem Molekül hervorsteht. Um die Auswirkungen der Mutationen besser bewerten zu können, wurden die veränderten Aminosäuren in lila und der „Stick-Form“ angezeigt. Durch die „Zoom-Funktion“ konnten die Auswirkungen noch eingehender betrachtet werden.

Die Ergebnisse der verschiedenen 3D-Modelle sind im Folgenden in den Abschnitten 4. Diskussion und im Anhang dargestellt und genauer erläutert.

## 4 Diskussion

### 4.1 *CI-INH*-Gendiagnostik

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit der Kinderklinik Frankfurt und der Hautklinik Mainz zwischen 1999-2005 insgesamt 208 Familien mit der Differential- oder Verdachtsdiagnose „Hereditäres Angioödem“ auf eine Mutation im *CI-INH*-Gen untersucht.

Mittels der verwendeten Methoden (Komplett-Sequenzierung, Southern-Blot und dHPLC) konnten bei 146 Familien (70,2 %) insgesamt 109 Mutationen im *CI-INH* nachgewiesen werden.

In den verbleibenden 62 Familien (29,8 %) konnte keine Veränderung des *CI-INH* identifiziert werden. Eine nachträgliche Überprüfung der klinischen Daten ergab, dass bei 7 Familien ein AAE vorlag, so dass die Gendiagnostik hier kein Ergebnis bringen konnte, sondern nur die erworbene Form des Angioödems bestätigte.

Bei weiteren 24 Familien konnte die Diagnose HAE aufgrund weiterführender Anamnese und Untersuchungen ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass erst bei späterer Überprüfung der Daten die Diagnose HAE bei einer Vielzahl von Patienten aufgehoben werden konnte, zeigt die Schwierigkeit der exakten Diagnose. Selbst erfahrene Kliniker missinterpretieren die Daten und Symptome.

Nach Aussonderung der Fälle mit revidierter klinischer Diagnose verblieben 15 % aller Probanden mit bestehender Differentialdiagnose HAE, bei denen dennoch keine Mutation identifiziert werden konnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mutationen in regulatorischen Elementen des *CI-INH*, die für die Ausprägung der Krankheit verantwortlich sind, durch die verwendeten Methoden unentdeckt blieben. Ebenso könnten andere Gene, die z.B. in der Regulation der Komplement-Kaskade oder des Kinin Systems eine Rolle spielen, durch eine Mutation einen HAE-ähnlichen Phänotyp auslösen.

Bei Abschluss dieser Arbeit waren 13 Punktmutationen, die in 34 Familien mit 64 Mitgliedern nachgewiesen werden konnten, in der HAE-Datenbank bekannt (<http://hae.biomembrane.hu/>).

Bei 96 Familien mit 172 Mitgliedern konnten 80 neue Punktmutationen nachgewiesen werden, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Literatur beschrieben worden waren.

Ebenfalls konnten bei 16 Familien große Deletionen mittels Southern-Blot und dHPLC aufgezeigt und deren Größe und Lokalisation im *CI-INH* bestimmt werden.

Die Verteilung der in dieser Arbeit neu entdeckten Mutationen auf die verschiedenen Mutationstypen stimmt mit der Verteilung der Mutationen aus der Literatur überein (Abbildung 4.1).

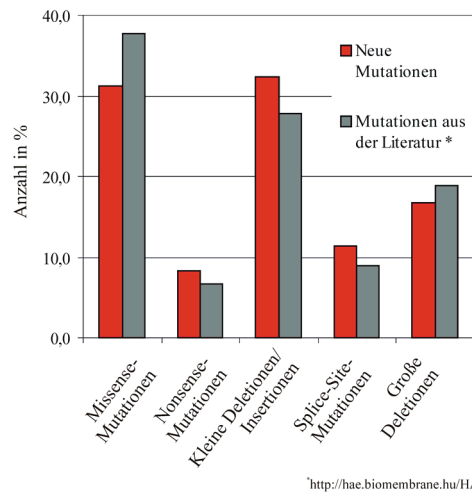


Abbildung 4.1 Prozentualer Vergleich der neu gefunden Mutationen mit Mutationen aus der Literatur

Somit konnte die Liste der bekannten HAE-Mutationen auf eine Gesamtzahl von 279 erweitert werden (Abbildung 4.2). In der HAE-Datenbank sind demnach 98 verschiedene Missense-Mutationen, 81 kleine Deletionen und Insertionen, 20 Nonsense-Mutationen und 27 Splice-Site-Mutationen bekannt. In 50 Fällen konnte die Deletionen großer Anteile des *CI-INH*-Gens nachgewiesen werden. Mit zunehmender Gendiagnostik wird diese Anzahl wohl noch beträchtlich anwachsen, da fast jede HAE-Familie eine eigene Mutation besitzt.

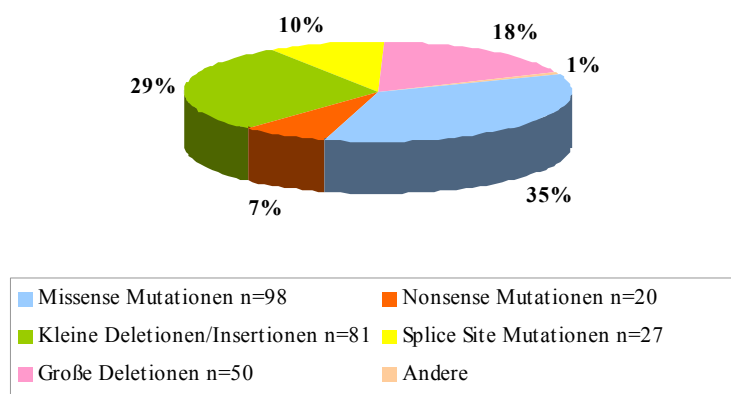


Abbildung 4.2 Verteilung der 279 bekannten Mutationen im *CI-INH*-Gen

### 4.1.1 Einteilung der neu entdeckten Mutationen aufgrund ihrer Kausalität

Die in dieser Arbeit neu entdeckten Mutationen konnten in Bezug auf ihre Kausalität in verschiedene Kategorien unterteilt werden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Übersicht der Einteilung der neuen Mutationen in verschiedene Kategorien

	Mutationsart
<b>Kategorie I:</b> (Kausalität gesichert)	Große Deletionen Nonsense-Mutationen Deletionen und Insertionen $\neq$ 3 bp R444-Mutationen
<b>Kategorie II:</b> (Kausalität wahrscheinlich)	Splice Site Mutationen C406R
<b>Kategorie III:</b> (Kausalität nicht gesichert)	Deletionen und Insertionen = 3 bp Aminosäuresubstitutionen

#### 4.1.2 Kategorie I, Kausalität gesichert

In die erste Kategorie wurden Mutationen eingeordnet, die aufgrund ihrer Lokalisation oder ihrer Auswirkung auf das C1-INH-Protein zweifelsfrei kausal für das HAE erscheinen.

##### 4.1.2.1 Große Deletionen

Große Deletionen des *C1-INH* sind bei ca. 20 % aller Patienten die molekulare Ursache des HAE und werden durch Rekombination zwischen Alu-Repeats der Introns verursacht (Stoppa-Lyonnet et al., 1991). Der Ausfall eines oder mehrerer Exons führt dabei zu einem Funktionsverlust des betroffenen Proteins.

Durch die Kombination der Methoden Southern-Blot und dHPLC konnte die Ausdehnung und Position verschiedener großer Deletionen bei 16 Familien nachgewiesen werden.

Dabei zeichnete sich Exon 4 als „Hotspot“ für Deletionen aus, da sich viele der 17 Alu-Repeats in den angrenzenden Introns 3 und 4 befinden. Das Bandenmuster des Southern-Blots (Abbildung 3.2) zeigte anschaulich, dass verschiedene Alu-Repeats für die Entstehung der Deletionen verantwortlich waren. Viele der betroffenen Familien zeigten ein privates Bandenmuster auf.

Während mittels dHPLC bei zwei Familien mit drei Mitgliedern die Deletion eines gesamten Allels nachgewiesen werden konnte, zeigte die Southern-Blot Analyse bei diesen Patienten keine Auffälligkeit. Diese Methode eignet sich demnach nur zur Detektion von Deletionen, die nur einen Teil des Gens betreffen und somit zu einer kleineren Bande auf der Nylonmembran führen. Eine quantitative Auswertung eines Southern-Blots für komplette Deletionen eines Allels kann nur sehr unzureichend durchgeführt werden.

Die dHPLC erlaubt die schnelle und einfache Detektion großer Gen-Deletionen, einschließlich der kompletten Gen-Deletionen. Um aber falsch-positive Ergebnisse z.B. durch Fehler der Multiplex-PCR auszuschließen, wurde stets ein Southern-Blot zur Verifizierung der Deletion durchgeführt.

Patienten, die sowohl im Southern-Blot als auch in der Komplet-Seqenzierung ohne Befund waren, wurden mittels dHPLC auf eine komplette Deletion eines Allels untersucht.

#### **4.1.2.2 Mutationen, die zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führen**

Neue Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führen, wurden in 35 der 146 Familien (23,9 %) gefunden.

Acht Nonsense-Mutationen führten durch einen Basenaustausch zur Generierung eines Stop-Codons. Ebenso konnten in der untersuchten Kohorte 27 kleine Deletionen und Insertionen identifiziert werden, die eine Leserasterverschiebung und ein vorzeitiges Stop-Codon verursachen.

Vorzeitige Stop-Codons führen zu einer reduzierten Stabilität der mRNA („nonsense-mediated mRNA decay“ (Amrani et al., 2006)). Schon dadurch wird die Syntheserate mutanter Proteine deutlich erniedrigt. Die dennoch synthetisierten verkürzten oder veränderten Proteine verlieren üblicherweise ihre Funktion und werden im Stoffwechsel sehr schnell degradiert. Bei einer dominanten Erkrankung wie dem HAE müsste die Expression des nichtbetroffenen Allels zu einer 50 % igen Proteinaktivität und -konzentration führen.

Bei den meisten HAE-Patienten werden aber nur C1-INH-Plasmaspiegel zwischen 5-30 % der Norm gemessen. Diese Diskrepanz wird durch einen erhöhten Verbrauch des übrigen C1-INH (Lachmann and Rosen, 1984; Quastel et al., 1983) erklärt. Auch kann der Suizidmechanismus der Protease-Inhibierung (siehe Abschnitt 1.7.1.2) für dieses Phänomen verantwortlich sein. Die meisten Enzyme stehen aufgrund eines Recyclingprozesses mehrmals für ihre spezifische Reaktion zur Verfügung und müssen deshalb nicht ständig neu synthetisiert werden. Der C1-INH ist aber nach seiner Inhibierungsreaktion irreversibel geschädigt und wird abgebaut.

Für weitere Inhibierungen muss ständig neues Protein hergestellt werden, wobei die Syntheserate vom nicht-betroffenen Allel anscheinend nicht ausreichend ist.

Weiterhin wird diskutiert, dass eine mögliche Transinhibierung des beschädigten Allels auf die Expression des normalen Allels auf einer prä- oder posttranslationalen Ebene für die niedrige Rest-Aktivität der Patienten verantwortlich sein könnte (Kramer et al., 1993). Es ist auch vorstellbar, dass veränderte C1-INH-Moleküle den korrekten Transport der Wildtyp-Proteine verhindern können und so zur Reduzierung der C1-INH-Aktivität beitragen (Verpy et al., 1995).

#### **4.1.2.3 Mutationen am aktiven Zentrum des C1-INH**

Mutationen am aktiven Zentrum Arg444 sind die Hauptursache für HAE Typ II (Skriver et al., 1989).

In 12 von 146 Familien (8,2 %) konnten Mutationen an dieser Position des Gens gefunden werden. Zusätzlich zu den fünf bereits beschriebenen Mutationen (R444C, R444S, R444L, R444H und R444P) konnte in einer Familie mit vier Mitgliedern die letzte natürlich mögliche Mutation R444G (CGC>GGC) identifiziert werden. Diese Mutation an Position P1 der RCL ändert, ebenso wie die bekannten Mutationen, die Erkennungsstelle der Zielprotease und ist mit einem HAE Typ II assoziiert.

### **4.1.3 Kategorie II, Kausalität wahrscheinlich**

Die zweite Kategorie bilden Mutationen, die aufgrund ihrer Lokalisation oder ihrer Auswirkung auf das C1-INH-Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit verantwortlich für das HAE scheinen.

#### **4.1.3.1 Splice-Site-Mutationen**

Bei 11 Familien (7,5 %) wurde die Konsensussequenz einer der 14 Spleiß-Stellen des *C1-INH*-Gens durch eine Mutation geändert. Da mRNA-Analysen aufgrund fehlenden Patientenmaterials nicht durchgeführt werden konnten, wurde die Spleiß-Wahrscheinlichkeit mit Hilfe zweier Internetprogramme bestimmt (siehe Abschnitt 2.9.2). Die Algorithmen der Spleiß-Vorhersage-Programme analysieren und arbeiten auf der Basis der kanonischen Spleißstelle 5'-GT und AG-3' und geben einen Wert zwischen 0,1 und 1 an, der die Wahrscheinlichkeit der Verwendung der betreffenden Spleißakzeptor- bzw. Spleißdonorstelle

widerspiegelt. Durch Vergleich der Ergebnisse der WT-Sequenz mit der mutierten Sequenz konnten die Konsequenzen der Basensubstitutionen vorhergesagt werden.

Acht der 11 neun Splice-Site-Mutationen betreffen das kanonische Dinukleotiden der Spleiß-Donor- bzw. der Spleiß-Akzeptor-Stelle und führten in beiden verwendeten Programmen zu einer Veränderung des Spleiß-Vorgangs.

Obwohl das Programm „NetGene 2 Server“ bei den zwei Mutationen IVS1-1 G>A und IVS2-1 G>A die wildtypische Akzeptorspleißstelle mit einem Wert von 0,0 angab, fiel diese nach Einsetzen der Mutation ebenfalls weg. Da das andere Programm „Splice Site Prediction by Neural Network“, obgleich es die beiden wildtypischen Akzeptorspleißstellen mit normalen Werten erkennt, zu dem gleichen Ergebnis kommt, ist davon auszugehen, dass diese beiden Mutationen das korrekte spleißen verhindern.

Die Analyse der Mutation IVS3-3 C>G ergab eine Reduzierung der Spleiß-Wahrscheinlichkeit durch beide Programme um 80 bzw. 50 % (Tabelle 3.5). Als Folge des Austauschs sollte der Spleiß-Vorgang deshalb nicht mehr einwandfrei durchgeführt werden.

Die Mutation IVS7-13 (g.16629 G>A) führte nur zu einer geringfügigen Verminderung der Spleiß-Wahrscheinlichkeit durch die wildtypische Akzeptorstelle. Durch diese Basensubstitution wird aber eine zusätzliche Spleißakzeptorstelle generiert, die von einem der beiden Programme sogar über die Wertigkeit der WT-Akzeptorstelle gestuft wird. Durch Verwendung dieser neuen Spleißstelle werden 11 Nukleotide des Introns 7 dem Exon 8 zugefügt. Durch die entstehende Leserasterverschiebung kommt es sehr bald zu einem vorzeitigen Stop-Codon und Abbruch der Translation, so dass das für die Funktion des C1-INH essentielle Aktive Zentrum nicht synthetisiert wird.

Obwohl die beiden verwendeten Programme meistens die gleichen Ergebnisse hinsichtlich der Spleiß-Wahrscheinlichkeit lieferten, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Spleiß-Vorgang *in vivo* anders verläuft. Um die tatsächlichen Spleiß-Vorgänge aufzuklären ist eine mRNA Analyse unerlässlich, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch fehlendes Patientenmaterial jedoch nicht durchgeführt werden konnte.



#### 4.1.3.2 Cys406Arg führt zum Verlust einer Disulfidbrücke

Im C1-Inhibitor Protein werden durch die Aminosäuren Cys101 und Cys406 bzw. Cys108 und Cys183 zwei Disulfidbrücken gebildet, welche die N-terminale mit der C-terminalen Domäne verbinden (Bock et al., 1986) und einen Übergang der nativen Konformation des C1-INH in eine latente, inaktive Form verhindern (Simonovic and Patston, 2000).

In einer Familie mit vier Mitgliedern konnte an der Position c.1282 eine Substitution T>C identifiziert werden, die zum Austausch des Cysteins 406 durch die Aminosäure Arginin führt. Arg406 ist nicht in der Lage die Disulfidbrücke mit dem entsprechenden Cystein 101 zu bilden. Die verbleibende Disulfidbrücke Cys108-Cys183 kann die native Proteinkonfiguration wahrscheinlich nicht alleine aufrechterhalten, weshalb eine massive Konformationsänderung die Folge der C406R Mutation sein dürfte. Dies ist auch an dem veränderten Wanderungsverhalten des rekombinanten Proteins in SDS-PAGE zu erkennen (siehe Abbildung 3.16). Obwohl die Rolle der N-terminalen Domäne in Bezug auf die Proteinfunktion bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt die bei einem weiteren HAE-Patienten bereits beschriebene Mutation eines anderen Cysteins (C183Y) (Zuraw and Herschbach, 2000) einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit der Integrität der Disulfidbrücken.

Bei allen betroffenen Mitgliedern der Familie mit der Mutation C406R wurde eine weitere Substitution 20 Aminosäuren „downstream“ entdeckt, die zum Austausch E426Q führt. Durch Sequenzanalysen klonierter Exon 8 Fragmente der Patienten konnte nachgewiesen werden, dass beide Mutationen C406R und E426Q *in cis* lokalisiert sind. Eine funktionelle Auswirkung der Einführung einer zusätzlichen –NH<sub>2</sub> Gruppe durch die Aminosäure Glutamin konnte nicht vorhergesagt werden.

#### 4.1.3.3 Mutation am Initiations-Codon M-22

Die Mutation g.587 A>G im Exon 2 verändert das Start-Codon Methionin (ATG) in ein Codon für Valin (GTG).

Das nächste mögliche Initiations-Codon befindet sich in einem anderen Leserahmen an Position g.640. Die Translation von diesem Startpunkt würde zu einem Protein gänzlich anderer Zusammensetzung führen und schon nach 24 Aminosäuren durch ein Stop-Codon terminiert werden. Es ist aber auch möglich, dass in Folge der Mutation g.587 A>G die Proteinsynthese überhaupt nicht initiiert wird, so dass nur das WT-Allel für die Proteinsynthese zur Verfügung steht.

#### 4.1.4 Kategorie III, Kausalität nicht gesichert

In Kategorie III wurden Mutationen eingeordnet, deren Effekt auf das Protein und seine Funktion nicht allein durch ihre Position oder die durch sie ausgelösten Veränderungen erklärt werden konnte.

##### 4.1.4.1 Kleine Deletionen, die den Leserahmen nicht verschieben

Durch Sequenzanalyse konnten vier kleine Deletionen eines Vielfachen von drei Basenpaaren (g.8507\_8509delCTC; g.16799\_16819del21bp; g.16758\_16761delGCGGinsA; g.8429\_8452del24bp) nachgewiesen werden, die den Leserahmen der *CI-INH*-mRNA nicht beeinflussen. Durch die Deletionen werden zwar eine, sieben oder acht Aminosäuren entfernt, sofern diese aber keine wichtigen Domänen des C1-INH sondern „nur“ das Grundgerüst des Proteins bilden, kann nicht ohne Weiteres auf die Kausalität der Deletionen geschlossen werden.

##### 4.1.4.2 Aminosäuresubstitutionen

Die Sequenzanalyse ergab eine Vielzahl an Mutationen, die zu Aminosäuresubstitutionen der Exons 2-8 führten. Im Gegensatz zu den großen Deletionen, die einen Hotspot in Exon 4 aufweisen, konnten Punktmutationen in der gesamten codierenden Sequenz des *CI-INH* identifiziert werden.

Bei manchen Mutationen konnte anhand ihrer Position oder der chemischen Eigenschaften der substituierten Aminosäure über ihren Effekt spekuliert werden, aber bei vielen Veränderungen konnte keinerlei Aussage über ihre Kausalität getroffen werden. Eine Auswahl der nicht allein formal erklärbaren Mutationen ist hier aufgeführt:

- Der Aminosäureaustausch A-21V (c.5 C>T) wurde bei zwei nicht-verwandten Familien, nicht aber in 192 Chromosomen gesunder Kontrollen gefunden.

Familie G01-0011: Sowohl die angeblich betroffene Mutter und die Tochter erwiesen sich als Träger der A-21V Mutation, während beim nicht betroffenen Vater keine Mutation nachgewiesen werden konnte. Bei der Tochter konnten nur einmalig erniedrigte C1-INH-Werte gemessen werden; sie war zum Zeitpunkt der Einsendung des Probenmaterials über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren klinisch unauffällig. Laborchemische und klinische Daten der betroffenen Mutter lagen nicht vor.

Familie G00-1221: Die Familie bestand aus einer Mutter mit zwei Söhnen, die alle als Patienten mit HAE Typ I diagnostiziert worden waren. Während nur bei der Mutter die Mutation A-21V nachgewiesen werden konnte, wiesen alle drei Familienmitglieder zusätzlich eine Veränderung IVS1-5 C>A auf, die in 100 Kontroll-Chromosomen nicht nachgewiesen werden konnte. Nur eines der beiden Spleiß-Vorhersage-Programme ergab für diesen Basenaustausch eine Veränderung im Spleiß-Verhalten. Aufgrund fehlenden Materials konnte keine RNA-Analyse durchgeführt werden, weshalb nicht geklärt werden konnte, ob die intronische Veränderung für eine veränderte Transkription verantwortlich ist.

- In der kurzen Region der Aminosäuren 374-378 in Exon 7 konnten fünf verschiedene Mutationen (L374P, L376P, L376Q, P377L und R378C) nachgewiesen werden. Die hohe Dichte der auftretenden Mutationen bei HAE-Patienten könnte auf eine wichtige Region im C1-INH-Protein hindeuten.
  
- In einer Familie mit zwei Mitgliedern wurde eine Mutation identifiziert, die zum Austausch der AS Valin an der Position 458 durch die AS Glycin führte (c.1439 T>G). Der Austausch des gleichen Val458 durch ein Methionin (c.1438 G>A) ist ein bekannter Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von 31 % in der gesunden Bevölkerung (Bock et al., 1986; Cumming et al., 2003).  
Die Komplet-Seqenzierung der anderen Exons der beiden Patienten ergab aber keine weitere Variation der codierenden Sequenz. Ob der Austausch V458G ebenso wie V458M keinen Effekt auf die Funktion des Proteins hat, konnte nur durch rekombinante Expression bestimmt werden.
  
- Bei einem HAE-Patienten wurde ein Basenaustausch c.1493 C>T festgestellt, der zum Austausch der letzten Aminosäure des C1-INH-Proteins führte (P476L). Zwar konnte der von Verpy und anderen (Verpy et al., 1996) zuvor beschriebene Austausch dieser endständigen Aminosäure durch ein Serin ebenfalls in einem weiteren HAE-Patienten nachgewiesen werden, lieferte aber nicht ohne weiteres eine Erklärung für die Pathogenese der Erkrankung.

### 4.1.5 Fazit der genetischen Diagnostik des C1-Inhibitors

Das Hereditäre Angioödem aufgrund eines C1-Inhibitor-Mangels ist eine komplexe Erkrankung. Unspezifische Schwellungssymptome, Erstmanifestation in einem breiten Altersspektrum und die unvollständige Penetranz der Erkrankung erschweren selbst erfahrenen Klinikern die Diagnose. Laborchemische Daten sind nicht immer eindeutig (Tarzi et al., unpublished data), so dass oft andere Verdachtsdiagnosen wie Allergien usw. gestellt werden, und die lebensbedrohliche Krankheit über einen langen Zeitraum unerkannt bleiben kann.

Die genetische Analyse des C1-INH ist ein wichtiges Werkzeug zur Abgrenzung des HAE von anderen phänotypisch ähnlichen Erkrankungen.

Die Gendiagnostik durch Southern-Blot, dHPLC und Sequenzierung konnte die oft private, kausale Mutation der meisten Familien nachweisen, wodurch Mutationsträger selbst vor der Erstmanifestation der Symptome auf das Risiko einer lebensbedrohlichen Schwellung hingewiesen und gegebenenfalls prophylaktisch behandelt werden können.

Des Weiteren konnten einige Familienmitglieder als Träger eines mutierten *C1-INH*-Gens ausgeschlossen und so vor unnötigen und unwirksamen Behandlungen bewahrt werden.

Die Auswirkungen der Missense-Mutationen konnten nicht allein durch die chemischen Eigenschaften der neuen Aminosäure erklärt werden. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden deshalb unterschiedliche Mutationen in einem Zellsystem rekombinant exprimiert, um eine veränderte Funktion in Bezug auf das Wildtyp-Protein bestimmen zu können.

## 4.2 Expressionsstudien verschiedener C1-INH-Proteinvarianten

Verschiedene Untersuchungen zum Effekt einzelner Aminosäuresubstitutionen des Aktiven Zentrums, des RCL und der Hinge-Region des C1-INH sind bereits durchgeführt worden (Bos et al., 2004; Davis et al., 1992; Eldering et al., 1992; Eldering et al., 1995; Verpy et al., 1995; Zahedi et al., 2001), aber nur sehr wenig ist über den funktionellen Effekt von Mutationen in anderen Bereichen des Proteins bekannt.

Da Punktmutationen, die zu einem AS-Austausch führen, beim Hereditären Angioödem sehr häufig vorkommen, müssen kausale Mutationen von Veränderungen mit keiner oder nur geringer Auswirkung auf die Proteinfunktion unterschieden werden. Dies hat auch für die Beratung der betroffenen Patienten unmittelbare Auswirkungen.

Mutationen, die in Kategorie III eingeteilt worden waren, ließen keinen Rückschluss auf ihre Kausalität für das HAE zu (siehe Abschnitt 4.1.4). Deshalb wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die entsprechenden Aminosäureaustausche durch zielgerichtete Mutagenese in das C1-INH-Protein eingeführt und in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie rekombinant exprimiert.

Die Effizienz der Transfektionen wurde durch einen Western-Blot und die Aktivität der exprimierten Proteine durch einen funktionellen Assay überprüft.

Weiterhin wurden auch Mutationen aus Kategorie I (R444G) und Kategorie II (C406R) rekombinant exprimiert.

Die ersten 22 AS des C1-INH codieren ein Signalprotein zur Sekretion des Proteins über die Zellmembran. Für die Aktivitätsmessungen stand deshalb direkt das Überstandsmedium der HEK-293 Zellen zur Verfügung.

Der wildtypische C1-INH zeigte eine Aktivität vergleichbar mit einem 1:10 verdünnte humanen Kontrollplasma. Mock transfizierte Zellen wiesen weder Aktivität noch Antigen auf, so dass ein Beitrag einer endogenen C1-INH-Aktivität der HEK-Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Im Zellsystem werden die heterozygot bei den Patienten vorkommenden Mutationen homozygot exprimiert, so dass die Expression vom wildtypischen Allel nicht in die Restaktivität des Proteins mit eingeht.

### 4.2.1 Mutationen mit einer Restaktivität < 20 %

Die meisten der rekombinant exprimierten mutanten Proteine erzielten eine sehr geringe Restaktivität (Abbildung 4.3). Aufgrund von Messungenauigkeiten des komplexen C1-INH-Assays wurden Aktivitäten unter 20 % vernachlässigt und die betroffenen Proteine als nicht aktiv bezeichnet. Die bei HAE-Patienten messbare Restaktivität des C1-INH von 5-30 % wird wahrscheinlich vom wildtypischen Allel produziert.

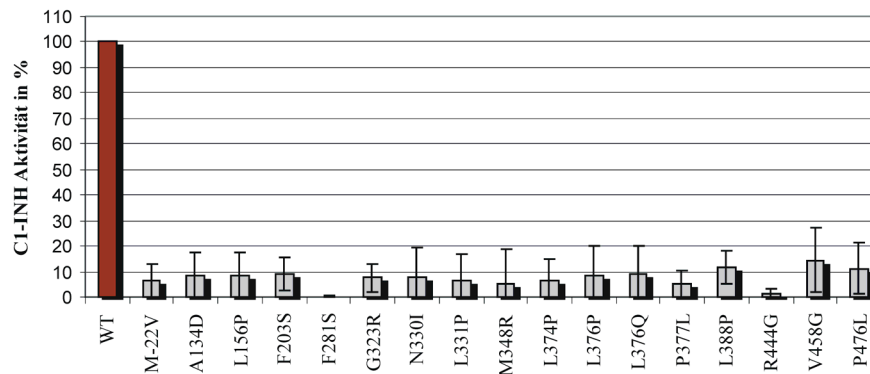


Abbildung 4.3 C1-INH-Varianten mit einer Aktivität < 20 %

Die meisten der untersuchten Varianten des C1-INH resultierten in einer Restaktivität < 20 % und wurden als nicht aktiv eingestuft.

Im Folgenden werden einige interessante Proteinmutanten näher diskutiert.

#### 4.2.1.1 Mutation M-22V

Die Translation des Proteins beginnt normalerweise (im wildtypischen Protein) mit der Aminosäure Met-22. Die Mutation M-22V verändert den Initiationspunkt, so dass das Ribosom nicht mehr an dieser Stelle mit der Proteinsynthese beginnen kann. Das exprimierte mutante Protein erschien auf dem Western-Blot nur in sehr geringer Konzentration. Es ist daher anzunehmen, dass aufgrund des Verlusts des Initiations-Codons die Expression des mutierten Allels drastisch reduziert wurde.

#### 4.2.1.2 Mutation N330I

Wie bereits in Abschnitt 1.7.3 geschildert, befinden sich die meisten der 13 Glykosylierungsstellen des C1-INH im N-Terminus, welcher keine signifikante Homologie mit anderen bekannten Proteinen aufzeigt.

Drei N-glykosylierte Asparagine sind jedoch in der Serpin-Domäne an Position 216, 231 und 330 lokalisiert (Bock et al., 1986). Durch die Mutation N330I wird eine dieser

Glykosylierungsstelle zerstört. Die Expression des varianten Proteins resultierte in einer Restaktivität < 20 %.

Die Funktion der Oligosaccharide im C1-INH ist nicht bekannt. Deglykosylierung hat keine grundlegende Auswirkung auf seine Aktivität (Reboul et al., 1987), aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zuckergruppen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des zentralen  $\beta$ -Faltblattes A spielen. Weitere Studien haben gezeigt, dass ein unterschiedlicher Glykosylierungsgrad den hepatischen Abbau des C1-INH beeinflusst (Minta, 1981).

#### 4.2.1.3 Mutation G323R

Die inhibitorische Leistung des C1-INH wird durch seine Fähigkeit bestimmt, seine Zielprotease zu binden und festzuhalten. Dies erfordert die adäquate Exposition des RCL im Molekül. Das 3D-Modell zeigt in Folge der Mutation G323R dass durch die Einführung der AS Arginin mit seiner sperrigen Seitenkette eine Veränderung der Proteinstruktur auftreten kann. Die Mutation hat womöglich eine sterische Auswirkung auf das  $\beta$ -Faltblatt B, welches für die korrekte Verankerung des RCL verantwortlich ist. Als Konsequenz könnte der RCL verschoben werden, wobei die Verschiebung des Aktiven Zentrums zu einer reduzierten Proteasebindung und -inhibierung führen würde.

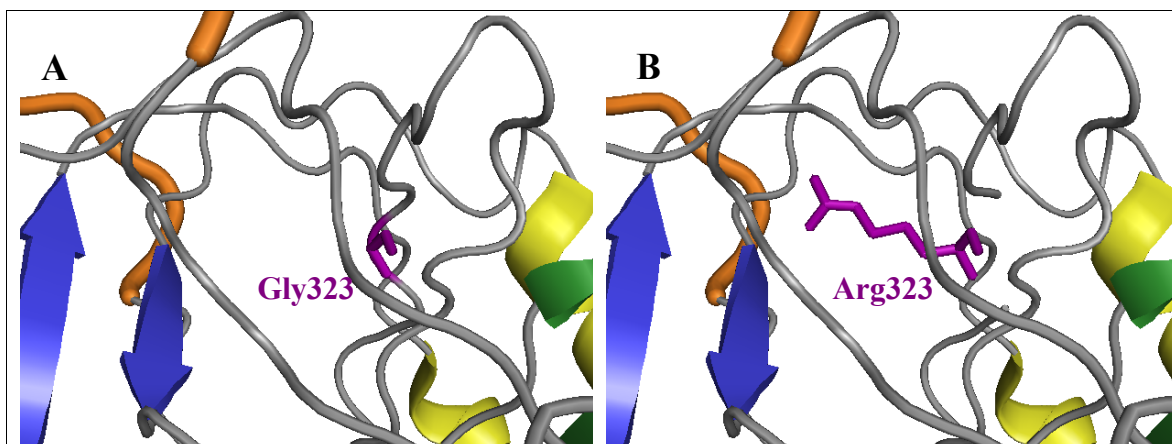


Abbildung 4.4 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und G323R

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt B in blau und  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Die kleine AS Gly323 (lila „Sticks“) besitzt keine Seitenketten; B: R323 kann durch die lange Seitenkette das  $\beta$ -Faltblatt B evtl. sterisch behindern und verschieben.

#### 4.2.1.4 Mutationen in der Region 374-377

Das inhibitorische Vermögen des C1-INH wird ebenfalls durch die schnelle Insertion des RCL in das zentrale  $\beta$ -Faltblatt A nach der Bindung der Zielprotease an das Aktive Zentrum bestimmt. Diese Konformationsänderung hält die Protease gefangen, zerstört ihre katalytische Stelle und verhindert ein Auseinanderdriften der beiden Proteine. Sowohl die Protease als auch der Inhibitor werden anschließend proteolytisch degradiert. Mutationen, die im kritischen Bereich der Loop-Insertion geschehen, können deshalb schwerwiegende Auswirkungen auf Serpin-Moleküle haben.

Das  $\beta$ -Faltblatt B spielt eine kritische Rolle im Inhibierungsmechanismus. Damit der RCL vollständig in das zentrale  $\beta$ -Faltblatt A inserieren kann, muss er das  $\beta$ -Faltblatt B passieren. Laut Bos ist die AS P377 im zentralen  $\beta$ -Faltblatt A lokalisiert (Bos et al., 2002). Das 3D-Modell 1M6Q.pdb zeigt aber, dass die Aminosäure 374-378 im  $\beta$ -Faltblatt C lokalisiert sind. Ob hier nur ein Schreibfehler in der Veröffentlichung oder ein Darstellungsfehler des Programms für diese Diskrepanz verantwortlich ist, konnte nicht geklärt werden. Diese Region des Proteins ist stark konserviert zwischen den Spezies und deutet eine wichtige Funktion dieser Region an.

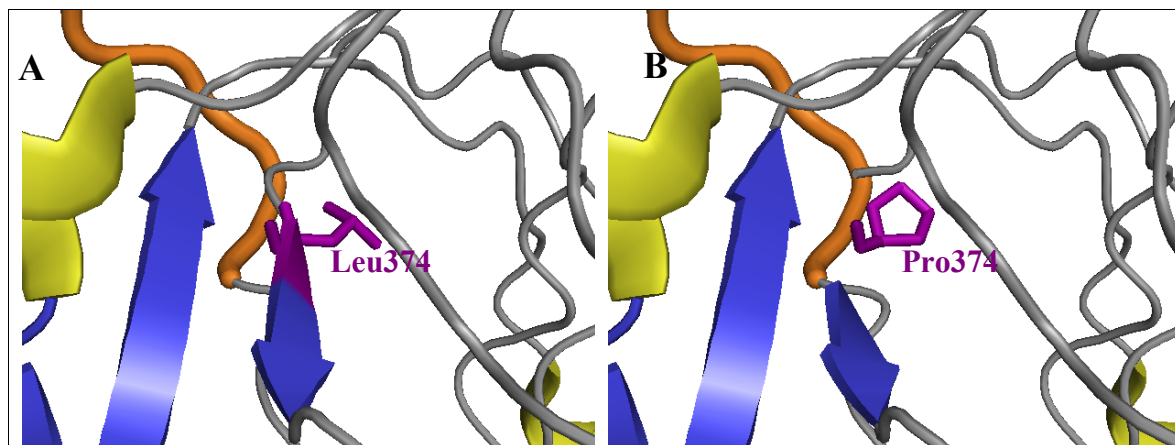


Abbildung 4.5 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L374P

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt B in blau und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Leucin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: die AS Prolin an Stelle 374 zerstört das Faltblatt und die Struktur des C1-INH

Durch die Mutationen L374P und L376P werden neue Proline in die Proteinsequenz eingebaut. Während durch das Prolin an Stelle 374 das  $\beta$ -Faltblatt B zerstört wird (Abbildung 4.5) hat das Prolin an Stelle 376 keinen so drastischen Effekt auf die Struktur des Proteins (Abbildung 4.6)



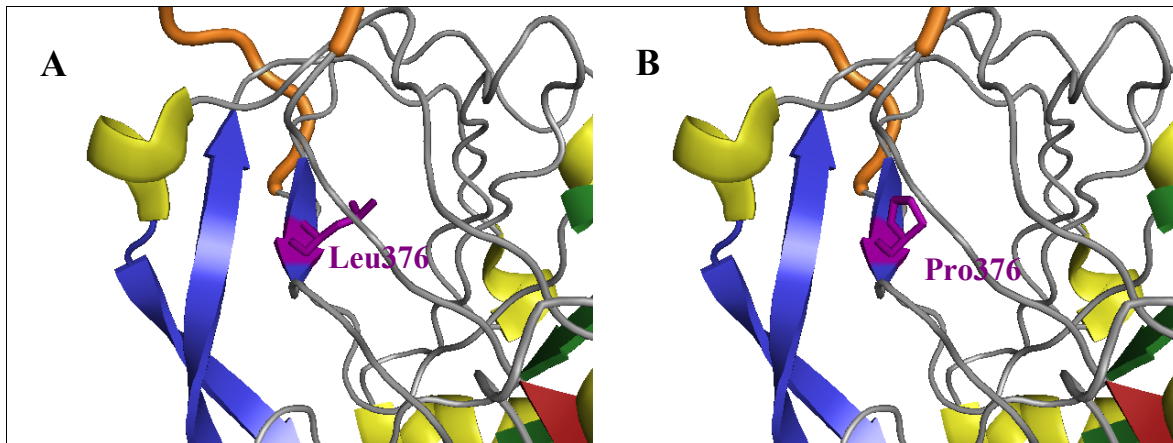


Abbildung 4.6 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L376P

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt A in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Leucin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: die AS Prolin an Stelle 376 bewirkt keine Veränderung der Struktur des C1-INH

Hingegen führt die Substitution des Leu376 durch ein Glutamin zu einer signifikanten Zerstörung des  $\beta$ -Faltblattes im Modell (Abbildung 4.7)

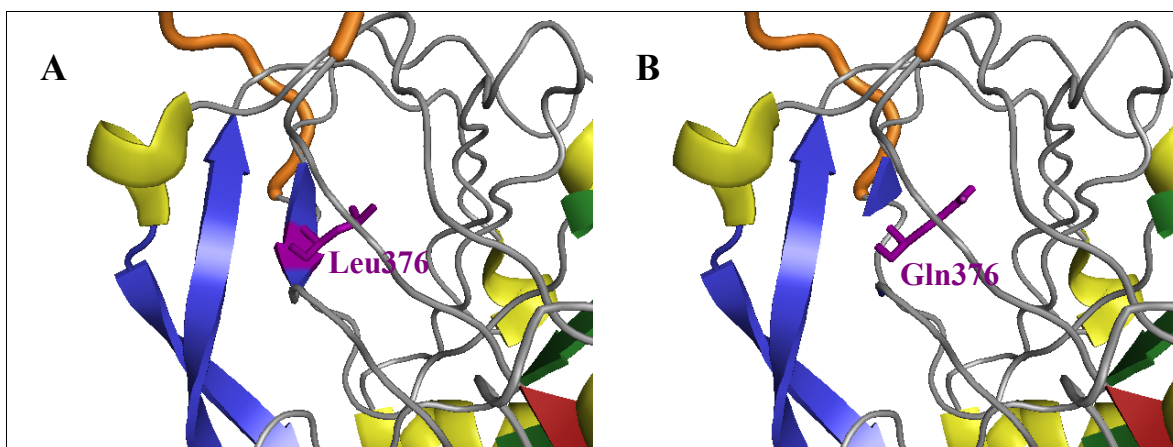


Abbildung 4.7 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L376Q

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt A in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Leucin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: die AS Glutamin an Stelle 376 zerstört das Faltblatt und die Struktur des C1-INH

Die Substitution des Prolin an Position 377 durch ein Leucin bewirkt wiederum keine im Modell erkennbare Strukturveränderung (Abbildung 4.8).

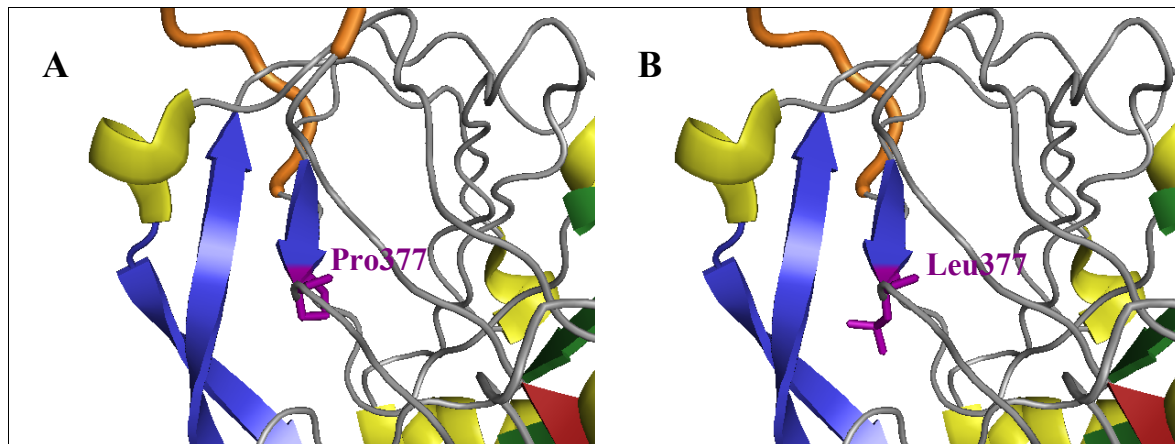


Abbildung 4.8 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und P377L

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt A in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Prolin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: durch den Austausch des Prolins durch ein Leucin wird die Struktur des C1-INH nicht sichtbar verändert.

Alle Mutationen im Bereich 374-377 resultieren zwar in einer nur sehr geringen Aktivität nach der rekombinanten Expression, haben aber unterschiedliche Auswirkungen im Modell.

Alle genannten Mutationen verhindern anscheinend, auch wenn es im Modell nicht immer sichtbar ist, durch eine Veränderung des  $\beta$ -Faltblatts B eine Insertion des RCL in das zentrale  $\beta$ -Faltblatt A.

#### 4.2.1.5 Mutation L388P

In einer HAE-Familie wurden die Aminosäuresubstitution L388P in Exon 7 gefunden. Das 3D-Modell zeigt, dass das Leu388 in einer  $\alpha$ -Helix in der Nähe des zentralen  $\beta$ -Faltblattes A liegt. Obwohl Proline als Helixbrecher bekannt sind, ergeben sich im Modell keine Auswirkungen. Es könnte aber sein, dass das Prolin eine Verschiebung des  $\beta$ -Faltblatt A bewirkt und als Konsequenz die Protease nicht korrekt gefangen gehalten werden kann und sie deshalb den Inhibitor angreifen und spalten kann.

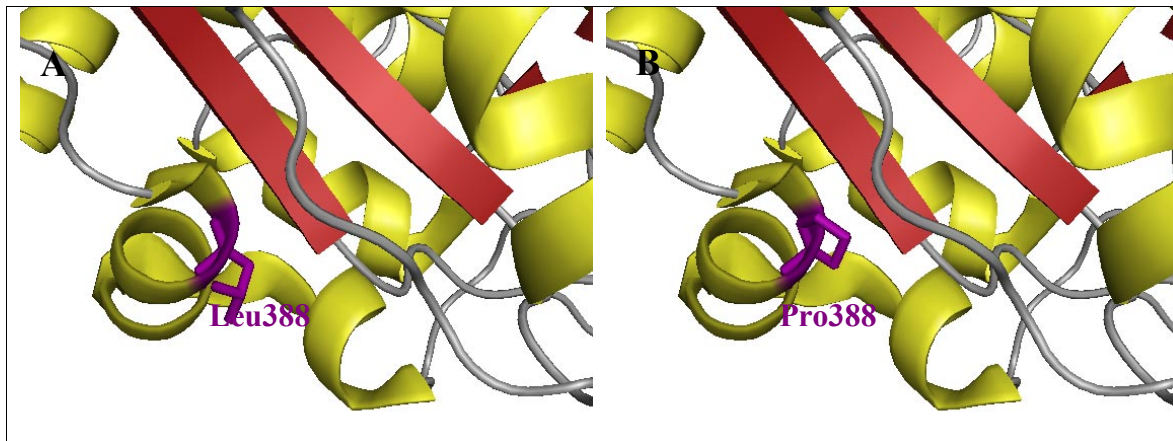


Abbildung 4.9 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und L388P

Das  $\beta$ -Faltblatt A ist in rot und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Leucin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: obwohl Proline als Helixbrecher bekannt sind, verändert die Substitution L388P nichts an der Struktur des C1-INH

#### 4.2.1.6 Mutation P476L

Eldering und Mitarbeiter (Eldering et al., 1995) zeigten, dass die im  $\beta$ -Faltblatt B lokalisierte Mutation P476S für eine spontane Insertion des RCL in dasselbe oder ein anderes C1-INH-Molekül verantwortlich ist und dadurch zu einem Übergang des Inhibitors von der nativen in eine latente Form führt.

Die in einer HAE-Familie vorkommende Mutation P476L könnte ebenfalls zu einer Multimerisierung führen kann. Während der chromogene Assay den Verlust der Proteinfunktion bestätigte, konnte der Western-Blot keine Anzeichen dafür liefern.

#### 4.2.1.7 Mutation V458G und Polymorphismus V458M

Ein häufiger Polymorphismus ändert die Aminosäure Val458 in ein Methionin (Bock et al., 1986). Obwohl die stark konservierte AS substituiert wird, hat dieser Polymorphismus keine Auswirkung auf die Stabilität oder Aktivität des Proteins (Kapitel 4.2.3, Abbildung 4.16).

Bei einer HAE-Familie mit zwei Mitgliedern wurde eine Mutation identifiziert, die zu einem Austausch dieses Valins durch ein Glycin führt (c.1439 T>G, V458G). Die Expression der polymorphen Variante V458M resultierte in einer Aktivität des rekombinanten C1-INH vergleichbar mit dem WT während die Expression der V458G-Variante eine reduzierte Aktivität ergab.

Die distale „hinge“-Region downstream des Aktiven Zentrums ist für die ordnungsgemäße Bindung des C1s (He et al., 1997) und für den intrazellulären Transport des C1-INH verantwortlich (Verpy et al., 1995). Die Arbeit von Verpy zeigte, dass die C1-INH-Varianten L459P und L459R beim intrazellulären Transport blockiert und nicht sekretiert werden.

Auch andere Autoren (Bowen et al., 2001) postulierten einen Sekretionsdefekt verursacht durch die Mutation F457L.

Die Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Western-Blot zeigte, dass die Substitution V458G zu einer reduzierten Sekretion des Proteins führte. Das spricht zusätzlich dafür, dass die Region 457-459 für den intrazellulären Transport des Proteins verantwortlich ist.

Die Mutation V458G hat im 3D-Modell keine Auswirkung auf die Proteinstruktur des C1-INH. Obwohl V458M ein weit verbreiteter Polymorphismus mit einer Aktivität ähnlich der des WT-Proteins ist, zeigt das 3D-Modell hier eine erhebliche Strukturveränderung des Proteins an. Demzufolge kann vom Modell nicht immer auf die tatsächlichen funktionellen Auswirkungen der verschiedenen Mutationen geschlossen werden.

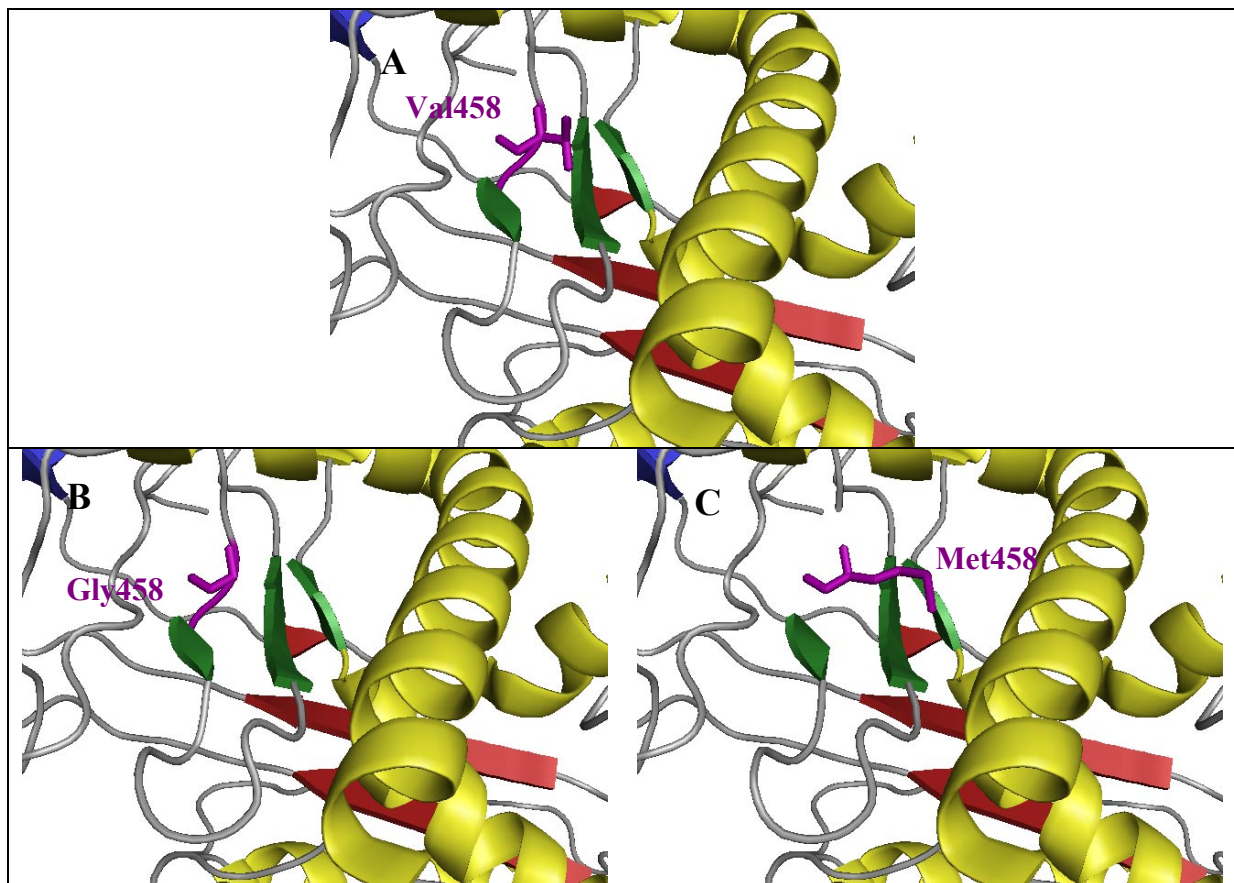


Abbildung 4.10 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT, V458G und V458M

$\beta$ -Faltblatt A ist in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Valin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: Die Mutation V458G führt zum Austausch des Valins durch ein Glycin, wobei die Struktur des  $\beta$ -Faltblatts C nicht verändert wird; C: Im Modell führt der weitverbreitete Polymorphismus V458M zur Störung der Proteinstruktur obwohl dieses Protein eine Aktivität vergleichbar mit dem WT besitzt.

#### 4.2.1.8 Mutation R444G

Die Bedeutung des P1-Restes wurde durch die Konstruktion verschiedener P1-Substitutionen untermauert, die in den meisten Fällen zu einem dysfunktionellen Molekül führten (Eldering et al., 1992).

Arg444 ist auf dem flexiblen RCL des C1-INH lokalisiert und ahmt das ideale Substrat der Zielprotease nach. Mutationen an dieser Aminosäure kommen bei mehr als 70 % aller HAE Typ II Patienten vor (Parad et al., 1990) und führen zu einem dysfunktionellem Inhibitor in normaler Plasmakonzentration. Die häufigste Mutation tritt durch eine spontane Deaminierung des Cytosins im CpG Dinukleotide des Codons 444 auf (Skriver et al., 1989). Je nach Lokalisation der Mutation - im Codon oder Anticodon - kann dadurch die P1-Aminosäure Arginin entweder durch Cystein oder Histidin ersetzt werden. Weitere Mutationen des aktiven Zentrums die für ein dysfunktionelles Protein verantwortlich sind, sind Arg444Ser, Arg444Leu oder Arg444Pro.

Interessanterweise führt Arg444Leu zu einem Phänotyp, der sowohl Charakteristika des Typs I als auch des Typs II aufweist (Pappalardo et al., 2000).

Die letzte natürlich mögliche Mutation Arg444Gly (c.1396 C>G) wurde in einer Familie der untersuchten Kohorte identifiziert. Die Expression dieser Mutation ergab ein Protein mit fehlender Aktivität aber normaler Konzentration im Western-Blot. Diese Mutation ist also genauso wie die anderen P1-Mutationen für einen Verlust der Serinprotease-Erkennung verantwortlich, beeinträchtigt aber nicht die Stabilität des Proteins. Im 3D-Modell ist der Austausch der beiden AS im RCL gut sichtbar.

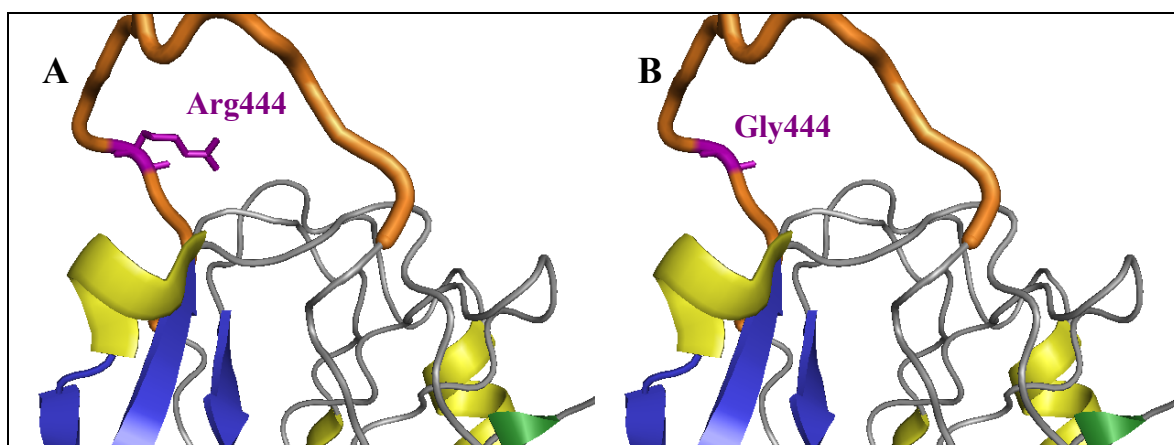


Abbildung 4.11 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und R444G

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Der P1-Rest Arg444 ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: Durch Substitution der AS444 mit eine Glycin wird die Erkennungsstelle für die Zielproteasen verändert. Ansonsten ändert sich nichts an der Struktur des Proteins.

## 4.2.2 Mutationen mit reduzierter C1-INH-Aktivität

Vier der untersuchten Varianten resultierten in einer reduzierten, aber messbaren Aktivität des rekombinanten C1-INH (Abbildung 4.12)

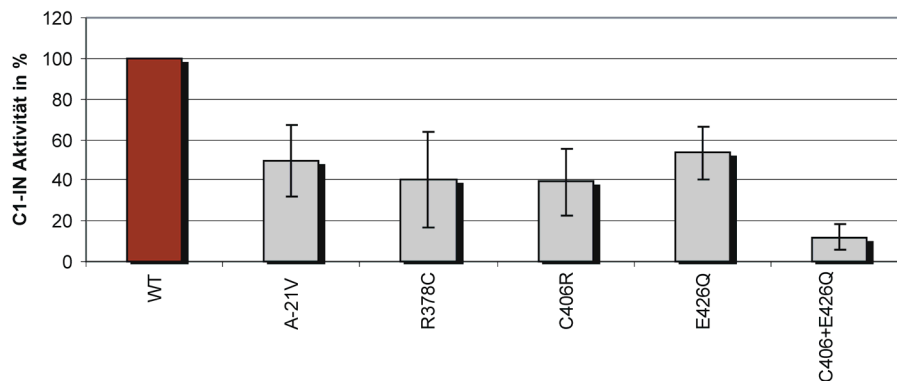


Abbildung 4.12 C1-INH-Varianten mit einer reduzierten Aktivität

Die meisten der untersuchten Varianten des C1-INH resultierten in einer Restaktivität < 20 % und wurden als nicht aktiv eingestuft. Bei diesen 5 Austausch bleibt aber eine deutliche Restaktivität erhalten.

### 4.2.2.1 Mutation A-21V

Wie bereits im Kapitel 4.1.4 beschrieben, wurde die AS-Substitution A-21V in zwei nicht verwandten Familien festgestellt, von denen eine eine zusätzliche Mutation, die andere keine eindeutigen HAE-Symptome aufwies. Anhand der 50 % igen Aktivität des homozygot exprimierten A-21V Proteins kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Austausch der Aminosäuren nicht um kausale Mutationen, sondern um einen, wenn auch seltenen, Polymorphismus handelt. Ob diese Variante dennoch Auswirkung auf den Schweregrad der Erkrankung bei der einen Familie hat (modifier-Allel), kann nur durch weitergehende klinische Untersuchungen nachgewiesen werden.

Das variante Protein A-21V zeigte eine Aktivität von ca. 50 % des WT-Proteins. Das Alanin an der zweiten Position des C1-INH ist hoch konserviert zwischen den Spezies.

In Bezug auf die beiden Familien, bei denen diese Variation entdeckt wurde, ist es möglich, dass diese Veränderung nicht mit dem HAE assoziiert ist. Ein Träger dieser Veränderung zeigte nur einmal reduzierte C1-INH-Plasmaspiegel und blieb über zwei Jahre symptomfrei.

Alle betroffenen Mitglieder der anderen Familie wiesen zusätzlich eine Mutation IVS1-5 C>A auf, die aufgrund der Änderung der Spleißwahrscheinlichkeit ebenfalls als kausal in Betracht kommt.



In Anbetracht dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass A-21V ein, wenn auch seltener Polymorphismus ist, da diese Änderung in 192 Kontrollchromosomen nicht nachgewiesen werden konnte. Um diese Behauptung zu untermauern ist es unabdingbar, den klinischen Status mehrerer Patienten mit dieser Variation genauer zu beschreiben.

#### 4.2.2.2 Mutation R378C

Arg378 ist am Ende des  $\beta$ -Faltblatts C lokalisiert und ist hochkonserviert zwischen den Spezies. In einer Familie konnte die Mutation R378C identifiziert werden, die in der rekombinanten Aktivität von ca. 40 % resultierte. Trotz der Lokalisierung im  $\beta$ -Faltblatt C, das wie schon in Kapitel 1.7.1.2 beschrieben, für die Insertion des RCL essentiell ist, war die Substitution nicht für einen kompletten Verlust der C1-INH-Aktivität verantwortlich. Ob durch die Einführung des neuen Cysteins weitere Disulfidbrücken im Molekül gebildet werden, konnte nicht bestimmt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dadurch das Protein stabilisiert werden könnte und trotz Mutation eine Restaktivität behält.

Die Expression der mausspezifischen Variante R378H ergab eine Aktivität von 80 % (Abbildung 4.16). Ein Histidin an dieser Position des Proteins stellt also keine schwerwiegende Veränderung dar.

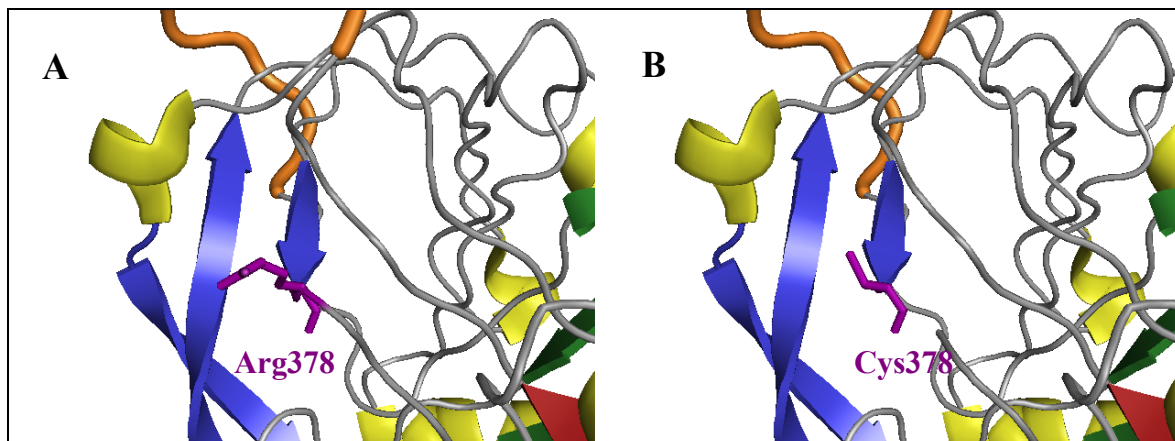


Abbildung 4.13 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und R378C

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt A in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Das Arginin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: Obwohl die AS am Ende des  $\beta$ -Faltblatt liegt, tritt keine sichtbare Änderung der C1-INH-Struktur auf.

### 4.2.2.3 Mutationen C406R und E426Q

Zwei Disulfidbrücken Cys101 - Cys406 und Cys108 - Cys183 verbinden die Serpin-Domäne mit der N-terminalen Domäne und halten die metastabile Konformation des C1-INH aufrecht. Eine Reduktion der Bindungen mit Dithiothreitol verursacht eine Konformationsänderung und eine spontane Insertion des RCL in das zentrale  $\beta$ -Faltblatt A, wodurch eine latente Form des Proteins entsteht (Simonovic and Patston, 2000).

In einer HAE-Familie wurde eine Mutation gefunden, die zur AS-Substitution C406R führt. Als Konsequenz kann nur noch die Disulfidbrücke Cys108 – Cys183 gebildet werden, da ein Arg406 keine Bindung mit Cys101 eingehen kann. Die Expression der C406R-Mutante resultierte in einer Rest-Aktivität von 40 % verglichen mit dem WT, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die zweite Disulfidbrücke die Konformation und damit die Funktion des Proteins noch zu einem gewissen Grad aufrecht erhalten kann.

Das 3D-Modell zeigt weiterhin, das Arg406 direkt gegenüber des Aktiven Zentrums Arg444 auf dem anderen Pol des C1-INH-Moleküls lokalisiert ist (Abbildung 4.14). Man könnte spekulieren, dass dieses neue Arginin fälschlicherweise als Bindungsstelle der Zielprotease erkannt wird und dadurch die korrekte Funktion des Proteins verhindert wird.

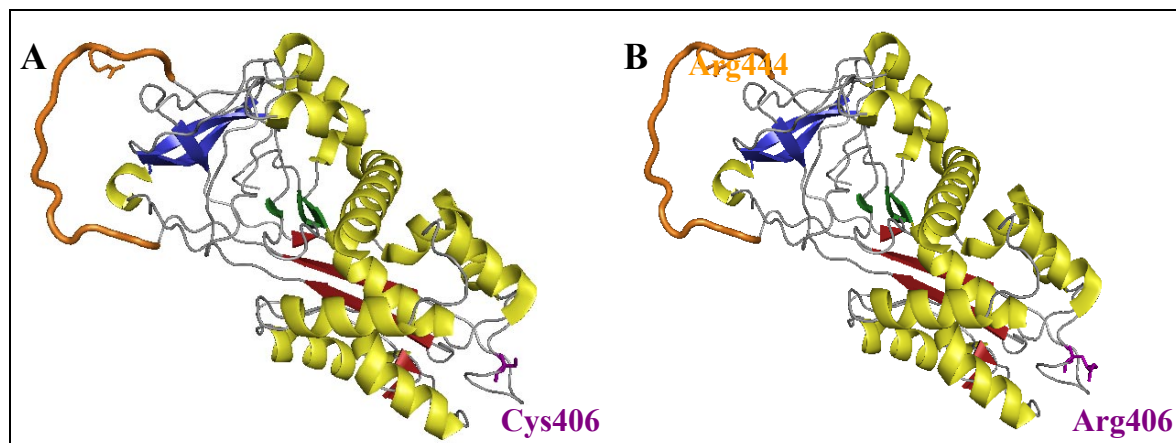


Abbildung 4.14 3D-Modell des C1-INH-Varianten WT und C406R

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt A in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Cys406 ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: Arg406 ist auf dem gegenüberliegenden Pol des RCL lokalisiert und könnte das Aktive Zentrum Arg444 imitieren.



Alle vier betroffenen Mitglieder der Familie wiesen zusätzlich eine zweite Mutation E426Q auf demselben Allel auf. Die Expression der Mutation alleine resultierte in einer verringerten Aktivität des rekombinanten Proteins. Überraschenderweise reduzierte sich die Aktivität nach gleichzeitiger Expression beider Mutationen weit unter die der einzelnen. Die Einführung einer zweiten NH<sub>2</sub>-Gruppe verstärkt also den destabilisierenden Effekt der C406R Mutation (Abbildung 4.15).

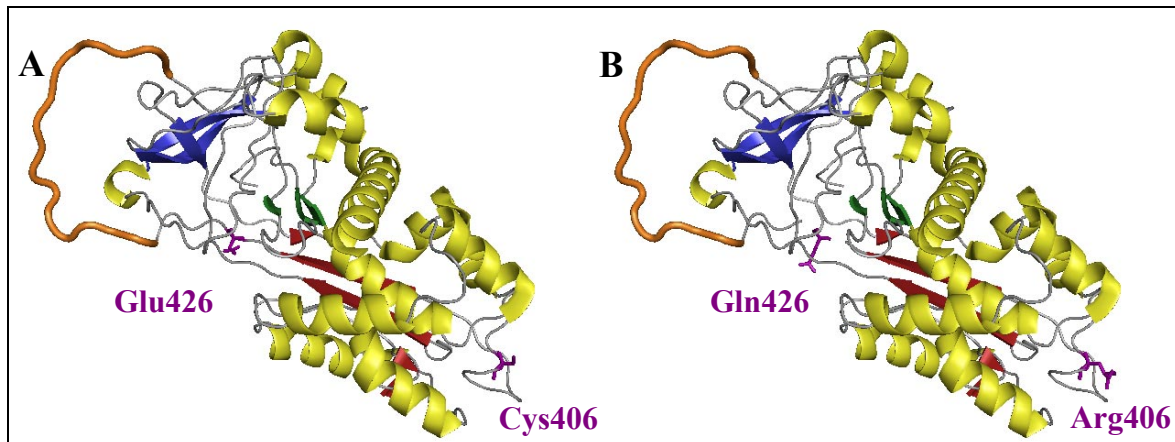


Abbildung 4.15 Übersichtsansicht des 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und C406R+E426Q

RCL ist in orange,  $\beta$ -Faltblatt A in rot,  $\beta$ -Faltblatt B in blau,  $\beta$ -Faltblatt C in grün und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: Cys406 und E426 sind in lila „Sticks“ dargestellt; B: Q426 zerstört die Proteinstruktur und kann die destabilisierende Wirkung des Arg406 verstärken

### 4.2.3 C1-INH-Varianten mit Aktivität vergleichbar mit dem WT

Alle natürlich vorkommenden C1-INH-Varianten aus verschiedenen Spezies zeigten eine Aktivität vergleichbar mit dem humanen WT (Abbildung 4.16, dunkelgraue Balken).

Zwei in der Kohorte identifizierte Sequenzvariationen sowie der weit verbreitete Polymorphismus V458M (siehe Abschnitt 4.2.1.7) erzielten ebenfalls eine Aktivität vergleichbar mit dem WT-Protein (Abbildung 4.16, hellgraue Balken).

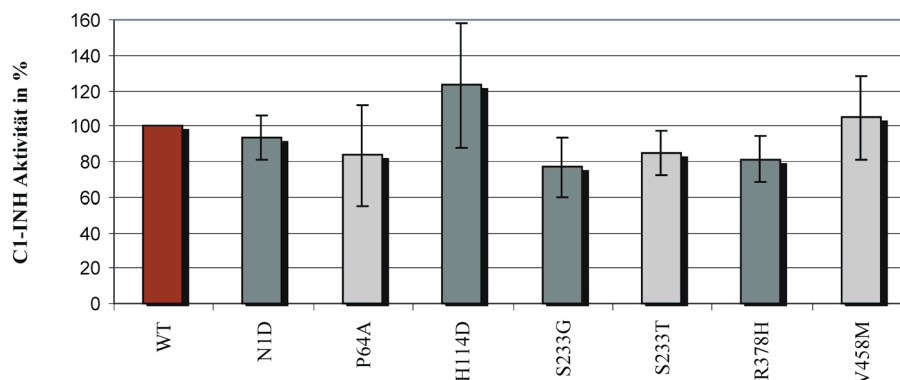


Abbildung 4.16 C1-INH-Varianten mit einer Aktivität vergleichbar mit dem WT-Protein  
*In dunkelgrau sind C1-INH-Varianten dargestellt, die bei anderen Spezies (Maus, Rind und Huhn) natürlicherweise vorkommen. In hellgrau sind Varianten dargestellt, die bei der Genanalyse der Kohorte identifiziert worden waren.*

#### 4.2.3.1 Varianten N1D und H114D

Die C1-INH-Sequenz der Maus besitzt die AS Asparaginsäure an Stelle der ersten AS des reifen Proteins und auch zu Beginn der Serpindomäne. Durch zielgerichtete Mutagenese wurden diese beiden Variationen in die Sequenz des humanen C1-INH eingebaut und im Zellsystem exprimiert. Wie bei einer natürlich vorkommenden Variante zu erwarten, erzielte der rekombinante C1-INH eine mit dem WT vergleichbare Aktivität, wobei die Aktivität der Variante H114D sogar größer ist.

#### 4.2.3.2 Mutation P64A

Die Mutation P64A konnte bei zwei Mitgliedern einer englischen Familie nachgewiesen werden. Wie schon im Kapitel 3.2.3 beschrieben, diagnostizierte die behandelnde Ärztin beim Vater aufgrund der klinischen Symptome und der laborchemischen Daten eine sehr milde Form des HAE Typ I. Der Sohn, der ebenfalls Mutationsträger ist, war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Vaters zu klein, um seine C1-INH-Werte zuverlässig zu bestimmen.

Aufgrund der hohen Aktivität des rekombinant exprimierten Proteins von ~ 80 % dürfte diese Sequenzvariation nicht direkt für ein HAE verantwortlich sein. Es bedarf jedoch einer

genaueren klinischen Überprüfung der Mutationsträger um diese Veränderung als nicht ursächlich einstufen zu können.

#### 4.2.3.3 Mutation S233T und S233G

Die Substitution S233T resultierte nach der rekombinanten Expression in fast 100 % Aktivität. Diese Variante wurde bei einem HAE-Patienten festgestellt, der zusätzlich eine Deletion einer Base in Exon 7 aufwies. Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters und sollte für die Erkrankung ursächlich sein.

Eine Variante S233G des Huhns zeigte ebenso wie die menschliche Variante S233T eine kaum reduzierte Aktivität gegenüber dem WT. Das Serin an Position 233 ist zwar hoch konserviert zwischen den Spezies, besitzt aber anscheinend keine weiterreichende funktionelle Bedeutung. Das 3D-Modell sowohl der S233T als auch der S233G Variante zeigte signifikante Veränderungen in der Proteinstruktur an. Dies ist aber in anbetracht der Expressionsdaten nicht nachvollziehbar.

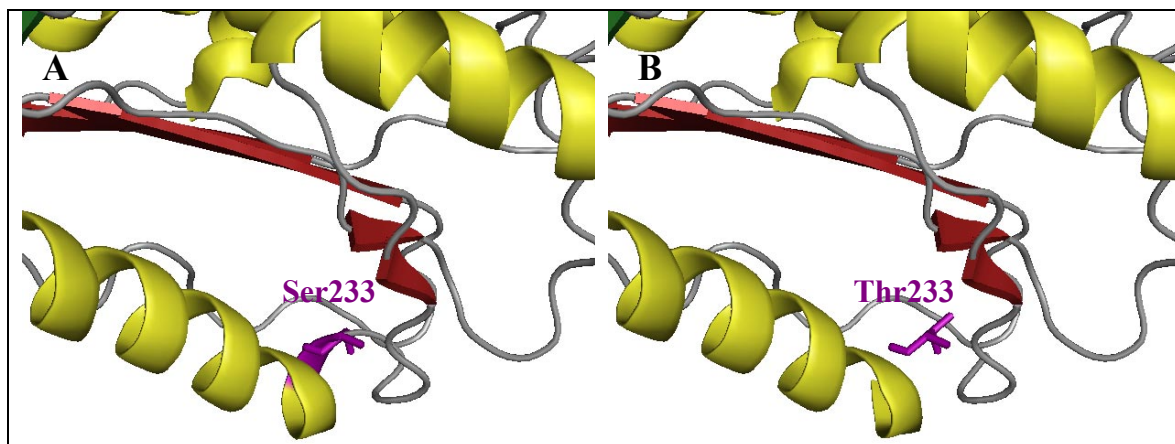


Abbildung 4.17 3D-Modell der C1-INH-Varianten WT und S233T

$\beta$ -Faltblatt A ist rot und  $\alpha$ -Helices sind in gelb dargestellt.

A: WT-Protein: das Serin ist in lila „Sticks“ dargestellt; B: die Einführung eines Threonin zerstört die  $\alpha$ -Helix

#### 4.2.4 Bewertung des 3D-Modells zur Vorhersage der Auswirkung von Aminosäuresubstitutionen

**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt zum Abschluss eine Gegenüberstellung der Aktivitäten der verschiedenen C1-INH-Varianten nach rekombinanter Expression und der vorhergesagten Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen im 3D-Modell.

Tabelle 4.2 Gegenüberstellung der Expressionsdaten und Auswirkungen im 3D-Modell

n.b.: nicht bestimmbar; +: signifikante Änderung; -: keine Veränderung feststellbar

Position	Mutation	Aktivität in %	Auswirkung im Modell	Übereinstimmung Aktivitätsassay und 3D-Modell
	WT	100		
	Mock	0		
Exon2	M-22V	< 20	n.b.	n.b.
	A-21V	~ 50	n.b.	n.b.
Exon3	<i>N1D</i>	~ 100	n.b.	n.b.
	P64A	~ 100	n.b.	n.b.
	<i>H114D</i>	~ 100	n.b.	n.b.
	A134D	< 20	-	nein
	L156P	< 20	-	nein
Exon4	F203S	< 20	-	nein
Exon5	<i>S233G</i>	~ 80	+	nein
	<i>S233T</i>	~ 85	+	nein
Exon6	F281S	< 20	-	nein
Exon7	G323R	< 20	-	nein
	N330I	< 20	-	nein
	L331P	< 20	-	nein
	M348R	< 20	-	nein
	L374P	< 20	+	ja
	L376P	< 20	-	nein
	L376Q	< 20	+	ja
	P377L	< 20	-	nein
	<i>R378H</i>	~ 80	-	nein
	R378C	~ 40	-	nein
	L388P	< 20	-	nein
Exon8	C406R	~ 40	-	nein
	E426Q	~ 50	+	ja
	C406+E426	< 20	+	ja
	R444G	< 20	-	nein
	V458M	~ 100	+	nein
	V458G	< 20	-	nein
	P476L	< 20	+	ja

Daraus ergibt sich keine konsistente Aussage des 3D-Modells zu den funktionellen Effekten einer Aminosäuresubstitution. Signifikante Veränderungen der Proteinstruktur treten sowohl bei Varianten mit fehlender Restaktivität als auch bei Varianten mit bestehender Restaktivität auf. Nur bei den Mutationen L374P, L376Q, E426Q und P476L stimmen die Aktivitätsmessungen mit beobachtbaren Auswirkungen im 3D-Modell überein.

Das 3D-Modell kann deshalb nur zur groben Einschätzung der Auswirkung einer AS-Substitution herangezogen werden kann. Dies könnte zum einen daran liegen, dass es sich nicht um ein echtes, auf röntgen-kristallografischen Daten fußendes Strukturmodell des C1-INH handelt, sondern um eine virtuelle Rekonstruktion auf der Ähnlichkeit zu anderen Serpinen. Zum anderen erfasst das Modell nur die Serpindomäne und vernachlässigt die N-terminale Domäne, die für C1-INH typisch und einzigartig ist. Obwohl dieses Modell also für einige Mutationen eine anschauliche Strukturveränderung erkennen lässt, berücksichtigt es doch nicht das gesamte C1-INH-Molekül. Alleine durch das Modelling kann jedenfalls nicht auf den Effekt einer Mutation geschlossen werden.

#### **4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Die rekombinante Expression mutierter C1-INH-Proteine ist ein geeignetes Werkzeug, um funktionell wichtige Aminosäurereste zu charakterisieren. Jedoch erfordern einige Mutationen, die zu einer Aminosäuresubstitution führen, weitere Untersuchungen, um ihre Kausalität zu klären. Zusammenfassend haben die funktionelle Expression und die Strukturbetrachtung natürlich vorkommender dysfunktioneller Moleküle neue Einblicke in strukturellen Anforderungen und den inhibitorischen Mechanismus des C1-INH ermöglicht.

Die strukturellen und funktionellen Daten der vorliegenden Arbeit können dazu beitragen, den molekularen Pathomechanismus des Hereditären Angioödems weiter aufzuklären.

## 5 Literaturverzeichnis

- Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE and others. (2004). Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 114(3 Suppl):S51-131.
- Agostoni A, Cicardi M. (1992). Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 71(4):206-15.
- Agostoni A, Cicardi M, Bergamaschini L, Boccassini G, Tucci A. (1980). C1-inhibitor concentrate for treatment of hereditary angioedema. *N Engl J Med* 303(9):527.
- Amrani N, Dong S, He F, Ganesan R, Ghosh S, Kervestin S, Li C, Mangus DA, Spatrick P, Jacobson A. (2006). Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 1):39-42.
- Ariga T, Igarashi T, Ramesh N, Parad R, Cicardi M, Davis AE, 3rd. (1989). Type I C1 inhibitor deficiency with a small messenger RNA resulting from deletion of one exon. *J Clin Invest* 83(6):1888-93.
- Bergamaschini L, Gatti S, Caccamo L, Prato P, Latham L, Trezza P, Maggioni M, Gobbo G, Fassati LR. (2001). C1 inhibitor potentiates the protective effect of organ preservation solution on endothelial cells during cold storage. *Transplant Proc* 33(1-2):939-41.
- Bock SC, Skriver K, Nielsen E, Thogersen HC, Wiman B, Donaldson VH, Eddy RL, Marrinan J, Radziejewska E, Huber R and others. (1986). Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 25(15):4292-301.
- Bork K, Barnstedt SE. (2001). Treatment of 193 episodes of laryngeal edema with C1 inhibitor concentrate in patients with hereditary angioedema. *Arch Intern Med* 161(5):714-8.
- Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. (2000). Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet* 356(9225):213-7.
- Bork K, Ressel N. (2003). Sudden upper airway obstruction in patients with hereditary angioedema. *Transfus Apher Sci* 29(3):235-8.
- Bos IG, Hack CE, Abrahams JP. (2002). Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiology* 205(4-5):518-33.

- Bos IG, Lubbers YT, Eldering E, Abrahams JP, Hack CE. (2004). Effect of reactive site loop elongation on the inhibitory activity of C1-inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1699(1-2):139-44.
- Bowen B, Hawk JJ, Sibunka S, Hovick S, Weiler JM. (2001). A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. *Clin Immunol* 98(2):157-63.
- Cai S, Davis AE, 3rd. (2003). Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion. *J Immunol* 171(9):4786-91.
- Cai S, Dole VS, Bergmeier W, Scafidi J, Feng H, Wagner DD, Davis AE, 3rd. (2005). A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol* 174(10):6462-6.
- Caldwell JR, Ruddy S, Schur PH, Austen KF. (1972). Acquired C1 inhibitor deficiency lymphosarcoma. *Clin Immunol Immunopathol* 1:39-52.
- Carter PE, Dunbar B, Fothergill JE. (1988). Genomic and cDNA cloning of the human C1 inhibitor. Intron-exon junctions and comparison with other serpins. *Eur J Biochem* 173(1):163-9.
- Carter PE, Duponchel C, Tosi M, Fothergill JE. (1991). Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur J Biochem* 197(2):301-8.
- Carugati A, Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. (2001). C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol* 38(2-3):161-73.
- Chen CA, Okayama H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6(7):632-8.
- Cicardi M, Zingale L, Zanichelli A, Pappalardo E, Cicardi B. (2005). C1 inhibitor: molecular and clinical aspects. *Springer Semin Immunopathol* 27(3):286-98.
- Colman RW. (1984). Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J Clin Invest* 73(5):1249-53.
- Coutinho M, Aulak KS, Davis AE, 3rd. (1994). Functional analysis of the serpin domain of C1 inhibitor. *J Immunol* 153(8):3648-54.
- Cugno M, Bos I, Lubbers Y, Hack CE, Agostoni A. (2001). In vitro interaction of C1-inhibitor with thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 12(4):253-60.

- Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. (1997). Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 89(9):3213-8.
- Cumming SA, Halsall DJ, Ewan PW, Lomas DA. (2003). The effect of sequence variations within the coding region of the C1 inhibitor gene on disease expression and protein function in families with hereditary angio-oedema. *J Med Genet* 40(10):e114.
- Curd JG, Prograis LJ, Jr., Cochrane CG. (1980). Detection of active kallikrein in induced blister fluids of hereditary angioedema patients. *J Exp Med* 152(3):742-7.
- Davis AE, 3rd, Aulak K, Parad RB, Stecklein HP, Eldering E, Hack CE, Kramer J, Strunk RC, Bissler J, Rosen FS. (1992). C1 inhibitor hinge region mutations produce dysfunction by different mechanisms. *Nat Genet* 1(5):354-8.
- Davis AE, 3rd, Whitehead AS, Harrison RA, Dauphinais A, Bruns GA, Cicardi M, Rosen FS. (1986). Human inhibitor of the first component of complement, C1: characterization of cDNA clones and localization of the gene to chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10):3161-5.
- de Zwaan C, Kleine AH, Diris JH, Glatz JF, Wellens HJ, Strengers PF, Tissing M, Hack CE, van Dieijen-Visser MP, Hermens WT. (2002). Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 23(21):1670-7.
- DeMichele MA, Moon DG, Fenton JW, 2nd, Minnear FL. (1990). Thrombin's enzymatic activity increases permeability of endothelial cell monolayers. *J Appl Physiol* 69(5):1599-606.
- Donaldson VH, Evans RR. (1963). A Biochemical Abnormality in Hereditary Angioneurotic Edema: Absence of Serum Inhibitor of C' 1-Esterase. *Am J Med* 35:37-44.
- Donaldson VH, Rosen FS, Bing DH. (1977). Role of the second component of complement (C2) and plasmin in kinin release in hereditary angioneurotic edema (H.A.N.E.) plasma. *Trans Assoc Am Physicians* 90:174-83.
- Eldering E, Huijbregts CC, Lubbers YT, Longstaff C, Hack CE. (1992). Characterization of recombinant C1 inhibitor P1 variants. *J Biol Chem* 267(10):7013-20.
- Eldering E, Verpy E, Roem D, Meo T, Tosi M. (1995). COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem* 270(6):2579-87.
- Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L. (2001). Eradication of *Helicobacter pylori* and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet* 358(9294):1695-6.



- Fields T, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. (1983). Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivation from C2 and in support of "spontaneous" formation of bradykinin. *J Allergy Clin Immunol* 72(1):54-60.
- Foerster T, Kocot A, Kreuz W, Martinez-Saguer I, Aygoren-Pursun E, Rusicke E, Bork K, Pavlova A, Müller CR, Oldenburg J. Genetic Analysis of Patients with Hereditary Angioedema Identifies Patients at Risk for Developing Acute Edema. submitted
- Frank MM, Gelfand JA, Atkinson JP. (1976). Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management. *Ann Intern Med* 84(5):580-93.
- Gettins PG. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102(12):4751-804.
- Gupta S, Yu F, Klaustermeyer WB. (2004). New-variant hereditary angioedema in three brothers with normal C1 esterase inhibitor level and function. *Allergy* 59(5):557-8.
- Hack CE, Eisele B. (1998). C1-Esterase-Inhibitor: Indikationen jenseits der klassischen Angioödemtherapie. *Die gelben Hefte* 38:120-127.
- Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE, 3rd. (2002). Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest* 109(8):1057-63.
- He S, Yang JC, Tsang S, Sim RB, Whaley K. (1997). Role of the distal hinge region of C1-inhibitor in the regulation of C1s activity. *FEBS Lett* 412(3):506-10.
- Horstick G, Berg O, Heimann A, Gotze O, Loos M, Hafner G, Bierbach B, Petersen S, Bhakdi S, Darius H and others. (2001). Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation* 104(25):3125-31.
- Inderbitzin D, Beldi G, Avital I, Vinci G, Candinas D. (2004). Local and remote ischemia-reperfusion injury is mitigated in mice overexpressing human C1 inhibitor. *Eur Surg Res* 36(3):142-7.
- Irons BK, Kumar A. (2003). Valsartan-induced angioedema. *Ann Pharmacother* 37(7-8):1024-7.
- Jackson J, Sim RB, Whaley K, Feighery C. (1989). Autoantibody facilitated cleavage of C1-inhibitor in autoimmune angioedema. *J Clin Invest* 83(2):698-707.
- Jackson J, Sim RB, Whelan A, Feighery C. (1986). An IgG autoantibody which inactivates C1-inhibitor. *Nature* 323(6090):722-4.
- Jansen PM, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor FB, Jr., Hack CE. (1998). Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol* 160(1):475-84.

- Johnson AM, Alper CA, Rosen FS, Craig JM. (1971). C1 inhibitor: evidence for decreased hepatic synthesis in hereditary angioneurotic edema. *Science* 173(996):553-4.
- Kalmar L, Hegedus T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. (2005). HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat* 25(1):1-5.
- Kaplan AP, Silverberg M. (1987). The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood* 70(1):1-15.
- Kirschfink M, Nurnberger W. (1999). C1 inhibitor in anti-inflammatory therapy: from animal experiment to clinical application. *Mol Immunol* 36(4-5):225-32.
- Kramer J, Rosen FS, Colten HR, Rajczy K, Strunk RC. (1993). Transinhibition of C1 inhibitor synthesis in type I hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest* 91(3):1258-62.
- Kreuz W, Fischer D, Heller C, Martinez-Saguer I, Klarmann D. (1998). Substitution des C1-Esterase-Inhibitoren bei Hereditärem Angioödem. *Die gelben Hefte* 38:109-119.
- Lachmann PJ, Rosen FS. (1984). The catabolism of C1(-)-inhibitor and the pathogenesis of hereditary angio-edema. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl* 284:35-9.
- Liu D, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis AE, 3rd. (2003). C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J Immunol* 171(5):2594-601.
- Lomas DA, Carrell RW. (2002). Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet* 3(10):759-68.
- Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. (1992). The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357(6379):605-7.
- Lung CC, Chan EK, Zuraw BL. (1997). Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 99(1 Pt 1):134-46.
- Melamed J, Alper CA, Cicardi M, Rosen FS. (1986). The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 77(2):322-6.
- Minta JO. (1981). The role of sialic acid in the functional activity and the hepatic clearance of C1-INH. *J Immunol* 126(1):245-9.
- Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. (2001). Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 15(5):293-306.

- Nielsen EW, Johansen HT, Hogasen K, Wuillemin W, Hack CE, Mollnes TE. (1996). Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema. *Scand J Immunol* 44(2):185-92.
- Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, Thijs LG, Hack CE. (1989). Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 84(2):443-50.
- Nuijens JH, Huijbregts CC, Eerenberg-Belmer AJ, Abbink JJ, Strack van Schijndel RJ, Felt-Bersma RJ, Thijs LG, Hack CE. (1988). Quantification of plasma factor XIIa-C1(-)-inhibitor and kallikrein-C1(-)-inhibitor complexes in sepsis. *Blood* 72(6):1841-8.
- Nurnberger W, Heying R, Burdach S, Gobel U. (1997). C1 esterase inhibitor concentrate for capillary leakage syndrome following bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 75(3):95-101.
- Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. (1998). Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 351(9117):1693-7.
- Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. (1999). Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 104(6):1321-2.
- Osler W. (1888). Hereditary anioneurotic oedema. *Am J Med Sci* 95:362-367.
- Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. (1983). Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 309(12):694-8.
- Pappalardo E, Cicardi M, Duponchel C, Carugati A, Choquet S, Agostoni A, Tosi M. (2000). Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1inhibitor gene of patients with angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 106(6):1147-54.
- Pappalardo E, Zingale LC, Terlizzi A, Zanichelli A, Folcioni A, Cicardi M. (2002). Mechanisms of C1-inhibitor deficiency. *Immunobiology* 205(4-5):542-51.
- Parad RB, Kramer J, Strunk RC, Rosen FS, Davis AE, 3rd. (1990). Dysfunctional C1 inhibitor Ta: deletion of Lys-251 results in acquisition of an N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17):6786-90.
- Potempa J, Korzus E, Travis J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269(23):15957-60.
- Quastel M, Harrison R, Cicardi M, Alper CA, Rosen FS. (1983). Behavior in vivo of normal and dysfunctional C1 inhibitor in normal subjects and patients with hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest* 71(4):1041-6.

- Quincke Hv. (1882). On acute localised oedema of the skin. *Monatshefte Prakt Dermatol* 1:129-131.
- Radke A, Mottaghy K, Goldmann C, Khorram-Sefat R, Kovacs B, Janssen A, Klosterhalfen B, Hafemann B, Pallua N, Kirschfink M. (2000). C1 inhibitor prevents capillary leakage after thermal trauma. *Crit Care Med* 28(9):3224-32.
- Reboul A, Prandini MH, Colomb MG. (1987). Proteolysis and deglycosylation of human C1 inhibitor. Effect on functional properties. *Biochem J* 244(1):117-21.
- Roche O, Blanch A, Duponchel C, Fontan G, Tosi M, Lopez-Trascasa M. (2005). Hereditary angioedema: the mutation spectrum of SERPING1/C1NH in a large Spanish cohort. *Hum Mutat* 26(2):135-44.
- Rosen FS, Davis AE, 3rd. (2005). Deficiencies of C1 inhibitor. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19(2):251-61.
- Rosen FS, Pinsky J, Donaldson V, Charache P. (1965). Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants. *Science* 148:957-8.
- Schapira M, Silver LD, Scott CF, Schmaier AH, Prograis LJ, Jr., Curd JG, Colman RW. (1983). Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 308(18):1050-3.
- Schechter I, Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27(2):157-62.
- Schreiber AD, Zweiman B, Atkins P, Goldwein F, Pietra G, Atkinson B, Abdou NI. (1976). Acquired angioedema with lymphoproliferative disorder: association of C1 inhibitor deficiency with cellular abnormality. *Blood* 48(4):567-80.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW and others. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276(36):33293-6.
- Simonovic I, Patston PA. (2000). The native metastable fold of C1-inhibitor is stabilized by disulfide bonds. *Biochim Biophys Acta* 1481(1):97-102.
- Skriver K, Radziejewska E, Silbermann JA, Donaldson VH, Bock SC. (1989). CpG mutations in the reactive site of human C1 inhibitor. *J Biol Chem* 264(6):3066-71.
- Stoppa-Lyonnet D, Carter PE, Meo T, Tosi M. (1990). Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1551-5.

- Stoppa-Lyonnet D, Duponchel C, Meo T, Laurent J, Carter PE, Arala-Chaves M, Cohen JH, Dewald G, Goetz J, Hauptmann G and others. (1991). Recombinational biases in the rearranged C1-inhibitor genes of hereditary angioedema patients. *Am J Hum Genet* 49(5):1055-62.
- Strang CJ, Cholin S, Spragg J, Davis AE, 3rd, Schneeberger EE, Donaldson VH, Rosen FS. (1988). Angioedema induced by a peptide derived from complement component C2. *J Exp Med* 168(5):1685-98.
- Stryer L. 1996. *Biochemie*. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akad. Verl.
- Tarzi MD, Hickey A, Förster T, Longhurst HJ. (unpublished data). Normal complement C4 does not exclude hereditary angioedema: an evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency and description of novel disease-causing mutations.
- Tosi M. (1998). Molecular genetics of C1 inhibitor. *Immunobiology* 199(2):358-65.
- Tosi M, Duponchel C, Bourgarel P, Colomb M, Meo T. (1986). Molecular cloning of human C1 inhibitor: sequence homologies with alpha 1-antitrypsin and other members of the serpins superfamily. *Gene* 42(3):265-72.
- Verpy E, Biasotto M, Brai M, Misiano G, Meo T, Tosi M. (1996). Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angiodema. *Am J Hum Genet* 59(2):308-19.
- Verpy E, Couture-Tosi E, Eldering E, Lopez-Trascasa M, Spath P, Meo T, Tosi M. (1995). Crucial residues in the carboxy-terminal end of C1 inhibitor revealed by pathogenic mutants impaired in secretion or function. *J Clin Invest* 95(1):350-9.
- Wachtfogel YT, DeLa Cadena RA, Colman RW. (1993). Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res* 72(1):1-21.
- Zahedi R, MacFarlane RC, Wisnieski JJ, Davis AE, 3rd. (2001). C1 inhibitor: analysis of the role of amino acid residues within the reactive center loop in target protease recognition. *J Immunol* 167(3):1500-6.
- Zeerleder S, Caliezi C, Redondo M, Devay J, Wuillemin WA. (1999). Activation of plasma cascade systems in sepsis: role of C1 inhibitors. *Schweiz Med Wochenschr* 129(39):1410-7.
- Zuraw BL, Herschbach J. (2000). Detection of C1 inhibitor mutations in patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 105(3):541-6.

## 6 Anhang

### 6.1 Sequenz des C1-INH mit Nummerierung

Die traditionelle Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit M-22 und ist in dunkelblauen Zahlen über den Triplets angegeben.

Die systematische Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit M1 und ist in dunkelroten Zahlen über den Triplets angegeben.

Die cDNA-Nummerierung ist in orangenen Zahlen unter der Sequenz angegeben.

Die genomische Nummerierung ist in dunkelgrünen Zahlen unter der Sequenz angegeben.

Sowohl die erste als auch die letzte Base jeder Zeile ist beschriftet.

Die vier für die beiden Disulfidbrücken verantwortlichen Cysteine sind gelb unterlegt.

Das Triplet für das Aktive Zentrum in Exon 8 ist in roten Buchstaben dargestellt und zusätzlich rot unterstrichen.

Die bekannten Polymorphismen sind grau unterlegt.

### Exon 1

TGGCCTGGCCCACAAAGAAGACCAAGCGGTCAGTCCCATTCCGTCCCATCCTGATTTACAGG  
AACTCACACCAGCGATCAATCTTCCTTAATTTGTAAGTGGGCAGTGTCCCAGGCCAGCCAAT  
AGCTAAGACTGCCCCCCCCGCACCCACCCCTCCCTGACCCTGGGGGACTCTCTACTC

**AGTCTGC**ACTGGAGCTGCCTGGT**GACCAG**AAGTTTGG

g.1

**A**

g.38

GTAGGTTTGGTGCTGGGCAGGGGTGGGGAGTAGGGTGGAAAGCATGGAGTGAAGAGGTCTAGG  
GAGGGGGTCTCCTCACCCCGCCTTCTGCCCCTTGATCTCGGGGGTCTCTATAGGCTTGC  
TTCCACCTGGGACTTCTGCCTCCTACCCAGCCCTCCCGCCTCAGGCCTGTTGTGC



## Exon 3

TCCTGTGCACCCCACCCTCACCTGTATTGCCCTTCTCTGAGGAATTAGTGGTGGTGGTT  
 CTAAGACAGATTGCTCATCTGCTGCACTGTCAGAAATTA CTCTCTTGTACAGGACATTTTCC  
 ACATCCACACCTTCTCTTCTGCTTTGAGTATTTTAGAGGACTGTGCCTCGTAGTAAGAAAA  
 AAATGAAACTCAGTTTCTTGAACCACAG

18 -5	19 -4	20 -3	21 -2	22 -1	23 1	24 2	25 3	26 4
<b>GAT</b>	<b>AGA</b>	<b>GCC</b>	<b>TCC</b>	<b>TCA</b>	<b>AAT</b>	<b>CCA</b>	<b>AAT</b>	<b>GCT</b>
Asp	Arg	Ala	Ser	Ser	Asn	Pro	Asn	Ala
c.52 g.2196								c.78 g.2222
27 5	28 6	29 7	30 8	31 9	32 10	33 11	34 12	35 13
<b>ACC</b>	<b>AGC</b>	<b>TCC</b>	<b>AGC</b>	<b>TCC</b>	<b>CAG</b>	<b>GAT</b>	<b>CCA</b>	<b>GAG</b>
Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Pro	Gln
c.79 g.2223								c.105 g.2249
36 14	37 15	38 16	39 17	40 18	41 19	42 20	43 21	44 22
<b>AGT</b>	<b>TTG</b>	<b>CAA</b>	<b>GAC</b>	<b>AGA</b>	<b>GGC</b>	<b>GAA</b>	<b>GGG</b>	<b>AAG</b>
Ser	Leu	Gln	Asp	Arg	Gly	Gln	Gly	Lys
c.106 g.2250								c.132 g.2276
45 23	46 24	47 25	48 26	49 27	50 28	51 29	52 30	53 31
<b>GTC</b>	<b>GCA</b>	<b>ACA</b>	<b>ACA</b>	<b>GTT</b>	<b>ATC</b>	<b>TCC</b>	<b>AAG</b>	<b>ATG</b>
Val	Ala	Thr	Thr	Val	Ile	Ser	Lys	Met
c.133 g.2277								c.159 g.2303
54 32	55 33	56 34	57 35	58 36	59 37	60 38	61 39	62 40
<b>CTA</b>	<b>TTC</b>	<b>GTT</b>	<b>GAA</b>	<b>CCC</b>	<b>ATC</b>	<b>CTG</b>	<b>GAG</b>	<b>GTT</b>
Leu	Phe	Val	Gln	Pro	Ile	Leu	Gln	Val
c.160 g.2304								c.186 g.2330
63 41	64 42	65 43	66 44	67 45	68 46	69 47	70 48	71 49
<b>TCC</b>	<b>AGC</b>	<b>TTG</b>	<b>CCG</b>	<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>AAC</b>	<b>TCA</b>	<b>ACA</b>
Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr
c.187 g.2331								c.213 g.2357
72 50	73 51	74 52	75 53	76 54	77 55	78 56	79 57	80 58
<b>ACC</b>	<b>AAT</b>	<b>TCA</b>	<b>GCC</b>	<b>ACC</b>	<b>AAA</b>	<b>ATA</b>	<b>ACA</b>	<b>GCT</b>
Thr	Asn	Ser	Ala	Thr	Lys	Ile	Thr	Ala
c.214 g.2358								c.240 g.2384
81 59	82 60	83 61	84 62	85 63	86 64	87 65	88 66	89 67
<b>AAT</b>	<b>ACC</b>	<b>ACT</b>	<b>GAT</b>	<b>GAA</b>	<b>CCC</b>	<b>ACC</b>	<b>ACA</b>	<b>CAA</b>
Asn	Thr	Thr	Asp	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln
c.241 g.2385								c.267 g.2395



90 68 <b>CCC</b> Pro c.268 g.2400	91 69 <b>ACC</b> Thr	92 70 <b>ACA</b> Thr	93 71 <b>GAG</b> Gln	94 72 <b>CCC</b> Pro	95 73 <b>ACC</b> Thr	96 74 <b>ACC</b> Thr	97 75 <b>CAA</b> Gln	98 76 <b>CCC</b> Pro c.294 g.2438
99 77 <b>ACC</b> Thr c.295 g.2439	100 78 <b>ATC</b> Ile	101 79 <b>CAA</b> Gln	102 80 <b>CCC</b> Pro	103 81 <b>ACC</b> Thr	104 82 <b>CAA</b> Gln	105 83 <b>CCA</b> Pro	106 84 <b>ACT</b> Thr	107 85 <b>ACC</b> Thr c.321 g.2465
108 86 <b>CAG</b> Gln c.322 g.2466	109 87 <b>CTC</b> Leu	110 88 <b>CCA</b> Pro	111 89 <b>ACA</b> Thr	112 90 <b>GAT</b> Asp	113 91 <b>TCT</b> Ser	114 92 <b>CCT</b> Pro	115 93 <b>ACC</b> Thr	116 94 <b>CAG</b> Gln c.348 g.2492
117 95 <b>CCC</b> Pro c.349 g.2493	118 96 <b>ACT</b> Thr	119 97 <b>ACT</b> Thr	120 98 <b>GGG</b> Gly	121 99 <b>TCC</b> Ser	122 100 <b>TTC</b> Phe	123 101 <b>TGC</b> Cys	124 102 <b>CCA</b> Pro	125 103 <b>GGA</b> Gly c.375 g.2520
126 104 <b>CCT</b> Pro c.376 g.2521	127 105 <b>GTT</b> Val	128 106 <b>ACT</b> Thr	129 107 <b>CTC</b> Leu	130 108 <b>TGC</b> Cys	131 109 <b>TCT</b> Ser	132 110 <b>GAC</b> Asp	133 111 <b>TTG</b> Leu	134 112 <b>GAG</b> Gln c.402 g.2546
135 113 <b>AGT</b> Ser c.403 g.2547	136 114 <b>CAT</b> His	137 115 <b>TCA</b> Ser	138 116 <b>ACA</b> Thr	139 117 <b>GAG</b> Gln	140 118 <b>GCC</b> Ala	141 119 <b>GTG</b> Val	142 120 <b>TTG</b> Phe	143 121 <b>GGG</b> Gly c.429 g.2573
Beginn Serpindomäne								
144 122 <b>GAT</b> Asp c.430 g.2574	145 123 <b>GCT</b> Ala	146 124 <b>TTG</b> Leu	147 125 <b>GTA</b> Val	148 126 <b>GAT</b> Asp	149 127 <b>TTC</b> Phe	150 128 <b>TCC</b> Ser	151 129 <b>CTG</b> Leu	152 130 <b>AAG</b> Lys c.456 g.2600
153 131 <b>CTC</b> Leu c.457 g.2601	154 132 <b>TAC</b> Tyr	155 133 <b>CAC</b> His	156 134 <b>GCC</b> Ala	157 135 <b>TTC</b> Phe	158 136 <b>TCA</b> Ser	159 137 <b>GCA</b> Ala	160 138 <b>ATG</b> Met	161 139 <b>AAG</b> Lys c.483 g.2627
162 140 <b>AAG</b> Lys c.484 g.2628	163 141 <b>GTG</b> Val	164 142 <b>GAG</b> Gln	165 143 <b>ACC</b> Thr	166 144 <b>AAC</b> Asn	167 145 <b>ATG</b> Met	168 146 <b>GCC</b> Ala	169 147 <b>TTT</b> Phe	170 148 <b>TCC</b> Ser c.510 g.2654

171	172	173	174	175	176	177	178	179
149	150	151	152	153	154	155	156	157
<b>CCA</b>	<b>TTC</b>	<b>AGC</b>	<b>ATC</b>	<b>GCC</b>	<b>AGC</b>	<b>CTC</b>	<b>CTT</b>	<b>ACC</b>
Pro	Phe	Ser	Ile	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr
c.511								c.537
g.2655								g.2681

180	181	182	183	184
158	159	160	161	162
<b>CAG</b>	<b>GTC</b>	<b>CTG</b>	<b>CTC</b>	<b>G</b>
Gln	Val	Leu	Leu	
c.538			c.550	
g.2682			g.2694	

**GTAAGACCCTGCTTGAATTCTCTCCAGGTCATTTGTTGGACACTCCATAAGAGTCACCAATC**  
**CAGACACTTACAAAGCCATGCCTCTGGGAAGAAGCTGTAAAAATGGGCTATTATATATTGGGG**  
**GTGGGGTAGAGGGATGTATCTTTTCATTCTTGAACATTCATCATTTCACAGTGATGTAATAG**  
**GCACGATTGCTTGTA AAACTCTGTGACTATAACAAGACATATAAAAATAAGGTCGCAGCCACTA**  
**ACCATGTTTCATGGCAAGGAGAGGTGATAAGAAAGATGAAATTAGGCGCAGTGGCTCACGCCT**  
**GTAATCCCA**

## Exon 4

GAGATTGCACCACTGCATTCCAGCCTGGGCCAACAAAGCAAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAAAGAGAGAGATTGAGAGAACATTCCAGCTCAGATGATCTGTGATCCCCTCCA  
 AAGCAGGGAATACCCTCCATTCCAGCCTGGTCCCCAACCTCATTCCCAAGGAAGGCCCCCG  
 ACTCATCCTGCAAGTATCTTTCATCTCTGCCCTTTGTTGCAG

184	185	186	187	188	189	190	191	192
162	163	164	165	166	167	168	169	170
<b>GG</b>	<b>GCT</b>	<b>GGG</b>	<b>GAG</b>	<b>AAC</b>	<b>ACC</b>	<b>AAA</b>	<b>ACA</b>	<b>AAC</b>
Gly	Ala	Gly	Gln	Asn	Thr	Lys	Thr	Asn
c.551 g.4351								c.576 g.4376

193	194	195	196	197	198	199	200	201
171	172	173	174	175	176	177	178	179
<b>CTG</b>	<b>GAG</b>	<b>AGC</b>	<b>ATC</b>	<b>CTC</b>	<b>TCT</b>	<b>TAC</b>	<b>CCC</b>	<b>AAG</b>
Leu	Gln	Ser	Ile	Leu	Ser	Tyr	Pro	Lys
c.577 g.4377								c.603 g.4403

202	203	204	205	206	207	208	209	210
180	181	182	183	184	185	186	187	188
<b>GAC</b>	<b>TTC</b>	<b>ACC</b>	<b>TGT</b>	<b>GTC</b>	<b>CAC</b>	<b>CAG</b>	<b>GCC</b>	<b>CTG</b>
Asp	Phe	Thr	Cys	Val	His	Gln	Ala	Leu
c.604 g.4404								c.630 g.4430

211	212	213	214	215	216	217	218	219
189	190	191	192	193	194	195	196	197
<b>AAG</b>	<b>GGC</b>	<b>TTC</b>	<b>ACG</b>	<b>ACC</b>	<b>AAA</b>	<b>GGT</b>	<b>GTC</b>	<b>ACC</b>
Lys	Gly	Phe	Thr	Thr	Lys	Gly	Val	Thr
c.631 g.4431								c.657 g.4457

220	221	222	223	224	225	226	227	228
198	199	200	201	202	203	204	205	206
<b>TCA</b>	<b>GTC</b>	<b>TCT</b>	<b>CAG</b>	<b>ATC</b>	<b>TTC</b>	<b>CAC</b>	<b>AGC</b>	<b>CCA</b>
Ser	Val	Ser	Gln	Ile	Phe	His	Ser	Pro
c.658 g.4458								c.684 g.4484

229

207

**G**

c.685  
g.4485

GTGAGTGCCAGGAATGGGCAGTGTCTGCAGAGGAGGGTCTGAGAGGACTCTGAAGGGGGA  
 CCCAGCGCTGGGGAAAGAAAGGACAGAGGGGAATGTTGGAGCTACAGTATCAGGGATGGACTG  
 CAGAGCAGGTGAAGACCTTGGCAGGAGCATTAGGTCCTCCAGGAAGTACTGTTCTTCTA  
 AT

## Exon 5

GCCACATCTGTAAGAGGAGTGGGCTGGACCGCGCTCCACCATGCCGTATTCACCTAAGTGAGC  
 AGATAGAACCATAGAAAGCATGCTCACTCTCAAATCGTGCTCATGGAAAGAACGACGTGTTC  
 AGGACTCATGCCTCCCTTTCTCAACATACCCCCAG

229	230	231	232	233	234	235	236	237
207	208	209	210	211	212	213	214	215
<b>AC</b>	<b>CTG</b>	<b>GCC</b>	<b>ATA</b>	<b>AGG</b>	<b>GAC</b>	<b>ACC</b>	<b>TTT</b>	<b>GTG</b>
Asp	Leu	Ala	Ile	Arg	Asp	Thr	Phe	Val
c.686								c.711
g.8325								g.8350

238	239	240	241	242	243	244	245	246
216	217	218	219	220	221	222	223	224
<b>AAT</b>	<b>GCC</b>	<b>TCT</b>	<b>CGG</b>	<b>ACC</b>	<b>CTG</b>	<b>TAC</b>	<b>AGC</b>	<b>AGC</b>
Asn	Ala	Ser	Arg	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser
c.712								c.738
g.8351								g.8377

247	248	249	250	251	252	253	254	255
225	226	227	228	229	230	231	232	233
<b>AGC</b>	<b>CCC</b>	<b>AGA</b>	<b>GTC</b>	<b>CTA</b>	<b>AGC</b>	<b>AAC</b>	<b>AAC</b>	<b>AGT</b>
Ser	Pro	Arg	Val	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser
c.739								c.765
g.8378								g.8404

256	257	258	259	260	261	262	263	264
234	235	236	237	238	239	240	241	242
<b>GAC</b>	<b>GCC</b>	<b>AAC</b>	<b>TTG</b>	<b>GAG</b>	<b>CTC</b>	<b>ATC</b>	<b>AAC</b>	<b>ACC</b>
Asp	Ala	Asn	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr
c.766								c.792
g.8405								g.8431

265	266	267	268	269	270	271	272	273
243	244	245	246	247	248	249	250	251
<b>TGG</b>	<b>GTG</b>	<b>GCC</b>	<b>AAG</b>	<b>AAC</b>	<b>ACC</b>	<b>AAC</b>	<b>AAC</b>	<b>AAG</b>
Trp	Val	Ala	Lys	Asn	Thr	Asn	Asn	Lys
c.793								c.819
g.8432								g.8458

274	275	276	277	278	279	280	281	282
252	253	254	255	256	257	258	259	260
<b>ATC</b>	<b>AGC</b>	<b>CGG</b>	<b>CTG</b>	<b>CTA</b>	<b>GAC</b>	<b>AGT</b>	<b>CTG</b>	<b>CCC</b>
Ile	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro
c.820								c.846
g.8459								g.8485

283	284	285	286	287	288	289	290	291
261	262	263	264	265	266	267	268	269
<b>TCC</b>	<b>GAT</b>	<b>ACC</b>	<b>CGC</b>	<b>CTT</b>	<b>GTC</b>	<b>CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>AAT</b>
Ser	Asp	Thr	Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Asn
c.847								c.873
g.8486								g.8512

292	293	294	295	296	297
270	271	272	273	274	275
<b>GCT</b>	<b>ATC</b>	<b>TAC</b>	<b>CTG</b>	<b>AGT</b>	<b>G</b>
Ala	Ile	Tyr	Leu	Ser	
c.874				c.889	
g.8513				g.8528	

---

GTAAGGGTGCCCTTAGCCAGTTAGTCTTCCCATTCTGGGTCCTTCTTCCCCTCCTGGCTTCA  
AAGCCCACTTAACCCCAAGTTCTACAATCGGATCTCAATGTCCCTGCACTACTCTTTGCTAA  
CAAGGCTTTTAGCTCCTCTTCATCCTTTTCTACCTGCATTAGAGCAACCCTCCCACCTCTT  
CCCTCTAGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCAAGAAAACCA

## Exon 6

TTCTGGGTCCTTCTTCCCCTCCTGGCTTCAAAGCCCCTTAACCCCAAGTTCTACAATCGGA  
 TCTCAATGTCCCTGCACTACTCTTTGCTAACAAGGCTTTTAGCTCCTCTTCATCCTTTTCT  
 ACCTGCATTAGAGCAACCCTCCCACCTCTTCCCTCTAG

297 275	298 276	299 277	300 278	301 279	302 280	303 281	304 282	305 283
<b>CC</b>	<b>AAG</b>	<b>TGG</b>	<b>AAG</b>	<b>ACA</b>	<b>ACA</b>	<b>TTT</b>	<b>GAT</b>	<b>CCC</b>
Ala	Lys	Trp	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Pro
c.890 g.8723								c.915 g.8748
306 284	307 285	308 286	309 287	310 288	311 289	312 290	313 291	314 292
<b>AAG</b>	<b>AAA</b>	<b>ACC</b>	<b>AGA</b>	<b>ATG</b>	<b>GAA</b>	<b>CCC</b>	<b>TTT</b>	<b>CAC</b>
Lys	Lys	Thr	Arg	Met	Gln	Pro	Phe	His
c.916 g.8749								c.942 g.8775
315 293	316 294	317 295	318 296	319 297	320 298	321 299	322 300	323 301
<b>TTC</b>	<b>AAA</b>	<b>AAC</b>	<b>TCA</b>	<b>GTT</b>	<b>ATA</b>	<b>AAA</b>	<b>GTG</b>	<b>CCC</b>
Phe	Lys	Asn	Ser	Val	Ile	Lys	Val	Pro
c.943 g.8776								c.969 g.8802
324 302	325 303	326 304	327 305	328 306	329 307	330 308	331 309	332 310
<b>ATG</b>	<b>ATG</b>	<b>AAT</b>	<b>AGC</b>	<b>AAG</b>	<b>AAG</b>	<b>TAC</b>	<b>CCT</b>	<b>GTG</b>
Met	Met	Asn	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Val
c.970 g.8803								c.996 g.8829
333 311	334 312	335 313	336 314	337 315	338 316	339 317	340 318	341 319
<b>GCC</b>	<b>CAT</b>	<b>TTC</b>	<b>ATT</b>	<b>GAC</b>	<b>CAA</b>	<b>ACT</b>	<b>TTG</b>	<b>AAA</b>
Ala	His	Phe	Ile	Asp	Gln	Thr	Leu	Lys
c.997 g.8830								c.1023 g.8856
342 320	343 321							
<b>GCC</b>	<b>AAG</b>							
Ala	Lys							
c.1024 g.8857	c.1029 g.8862							

GTAAGTTCTTAACCTTTCCTTCTCCTGTTTTGAAACCTACTTGAGTCTCCTGACTTTTTTTCTG  
 CTGTAGTCCCATCATTTTGGGGTACATGCTTACAAATTCATCACTTCTACTCCTTCCATCTGT  
 ATTTCCACCCTATCTTTTCTCCTTCTCCTTTCTCTAGCCTTGGCCAAGGCAGACATTGTATA

## Exon 7

CACTGTTACCCAGCTGGTATCCCATTTTCATGGTAAAGCCTGGAAGCTTAGGTCTGACTGA  
 TGCTTGGTTGAAATACAGACTGTGGGAGCAGACTGCAGGACAGCATTGTGACAGAGGGTGGGG  
 CCAGGAGAGAGATGCGGTAGGAAGACTGTTAAGATGCATCTCTTATTTTCTAG

344 322	345 323	346 324	347 325	348 326	349 327	350 328	351 329	352 330
<b>GTG</b>	<b>GGG</b>	<b>CAG</b>	<b>CTG</b>	<b>CAG</b>	<b>CTC</b>	<b>TCC</b>	<b>CAC</b>	<b>AAT</b>
Val	Gly	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	His	Asn
c.1030 g.14031								c.1056 g.14057
353 331	354 332	355 333	356 334	357 335	358 336	359 337	360 338	361 339
<b>CTG</b>	<b>AGT</b>	<b>TTG</b>	<b>GTG</b>	<b>ATC</b>	<b>CTG</b>	<b>GTA</b>	<b>CCC</b>	<b>CAG</b>
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Pro	Gln
c.1057 g.14058								c.1083 g.14084
362 340	363 341	364 342	365 343	366 344	367 345	368 346	369 347	370 348
<b>AAC</b>	<b>CTG</b>	<b>AAA</b>	<b>CAT</b>	<b>CGT</b>	<b>CTT</b>	<b>GAA</b>	<b>GAC</b>	<b>ATG</b>
Asn	Leu	Lys	His	Arg	Leu	Gln	Asp	Met
c.1084 g.14085								c.1110 g.14111
371 349	372 350	373 351	374 352	375 353	376 354	377 355	378 356	379 357
<b>GAA</b>	<b>CAG</b>	<b>GCT</b>	<b>CTC</b>	<b>AGC</b>	<b>CCT</b>	<b>TCT</b>	<b>GTT</b>	<b>TTC</b>
Gln	Gln	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Val	Leu
c.1111 g.14112								c.1137 g.14138
380 358	381 359	382 360	383 361	384 362	385 363	386 364	387 365	388 366
<b>AAG</b>	<b>GCC</b>	<b>ATC</b>	<b>ATG</b>	<b>GAG</b>	<b>AAA</b>	<b>CTG</b>	<b>GAG</b>	<b>ATG</b>
Lys	Ala	Ile	Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Met
c.1138 g.14139								c.1164 g.14165
389 367	390 368	391 369	392 370	393 371	394 372	395 373	396 374	397 375
<b>TCC</b>	<b>AAG</b>	<b>TTC</b>	<b>CAG</b>	<b>CCC</b>	<b>ACT</b>	<b>CTC</b>	<b>CTA</b>	<b>ACA</b>
Ser	Lys	Phe	Gln	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr
c.1165 g.14166								c.1191 g.14192
398 376	399 377	400 378	401 379	402 380	403 381	404 382	405 383	406 384
<b>CTA</b>	<b>CCC</b>	<b>CGC</b>	<b>ATC</b>	<b>AAA</b>	<b>GTG</b>	<b>ACG</b>	<b>ACC</b>	<b>AGC</b>
Leu	Pro	Arg	Ile	Lys	Val	Thr	Thr	Ser
c.1192 g.14193								c.1218 g.14219
407 385	408 386	409 387	410 388	411 389	412 390	413 391	414 392	415 393
<b>CAG</b>	<b>GAT</b>	<b>ATG</b>	<b>CTC</b>	<b>TCA</b>	<b>ATC</b>	<b>ATG</b>	<b>GAG</b>	<b>AAA</b>
Gln	Asp	Met	Leu	Ser	Ile	Met	Gln	Lys
c.1219 g.14220								c.1245 g.14246

416 417  
394 395  
**TTG G**  
Leu  
c.1246 c.1249  
g.14247 g.14250

GTGAGCTCTGGCAGCTTAGGGTACTCCCAGGCCATCAGAGGAGAAAGGGGGATCCCTAAGA  
TGTAGTTAGCATTCTCTAGAGTATTTTTTACATCCATAATCTCAGTTTGTCTGCAACCCTG  
CAAGTTAGAGGGGTAGGTGCTATTATCCCATGGATCATTGTGGAAATGGAGGCTCAGAAGC  
TTTATGTGACTTACCCAGAGATTCCATGATTTACCCTTGAGCTAGTCAGAGGCAAACCAGAA  
CACCGACCCAGGTCTCCAGCTCTCCTGAGTTT





489	490	491	492	493	494	495	496	497
467	468	469	470	471	472	473	474	475
<b>CCT</b>	<b>GTC</b>	<b>TTC</b>	<b>ATG</b>	<b>GGG</b>	<b>CGA</b>	<b>GTA</b>	<b>TAT</b>	<b>GAC</b>
Pro	Val	Phe	Met	Gly	Arg	Val	Tyr	Asp
c.1465								c.1491
g.16857								g.16883

498	499	500
476	477	478
<b>CCC</b>	<b>AGG</b>	<b>GCC</b>
Pro	Arg	Ala
c.492		c.1500
g.16884		g.16892

TGAGACCTGCAGGATCAGGTTAGGGCGAGCGCTACCTCTCCAGCCTCAGCTCTCAGTTGCAGC  
 CCTGCTGCTGCCTGCCTGGACTTGGCCCTGCCACCTCCTGCCTCAGGTGTCCGCTATCCACC  
 AAAAGGGCTCCCTGAGGGTCTGGGCAAGGGACCTGCTTCTATTAGCCCTTCTCCATGGCCCTG  
 CCATGCTCTCCAAACCACTTTTTGCAGCTTTCTCTAGTTCAAGTTCACCAGACTCTATAAATA  
 AAACCTGACAGACCATGACTTTCTCTGCTTTGCCTTTGTTTTTTTTATTTTTTATTTTTTATTT  
 TTTTTAGGCAGGGTCTCAATCTGTCAACCCAGGCTAGAGTACAGTGGTGAGATCATGGTTCCT  
 GCAGCCTTAACCTCCTGAGCTCAAACAATCCTCCCATCTCAGCCTCCTATGTAGGTGGGACCA  
 CATGGGCTTGCCACCATGCCAGCTAAATTTTTAAATTTTTGTAAAGACAGGGTCTTACTATG  
 TTGCCTAGGCTGGTCTCCAACCTCCTGGGCTCAAGCAATCATCCTAACACAGCCTCCCGAAGTG  
 CTGGGATTGTAGGCACACCATACCTCTCCTTTGCCTTTGAATATCAG





### 6.3 3D-Modelle der verschiedenen C1-INH-Mutationen

Im folgenden sind die 3D-Modelle der rekombinant exprimierten C1-INH-Varianten einzeln im „Cartoon-Modus“ dargestellt.

$\alpha$ -Helices werden als gewundene Strukturen in gelb dargestellt.

Die drei  $\beta$ -Faltblätter A, B und C sind als Pfeile in rot, grün und blau dargestellt.

Der „reactive center loop“ (RCL) ist in orange gefärbt und bildet eine exponierte Schleife, die aus dem Molekül hervorsticht.

Die veränderten Aminosäuren werden in lila und der „Stick-Form“ angezeigt

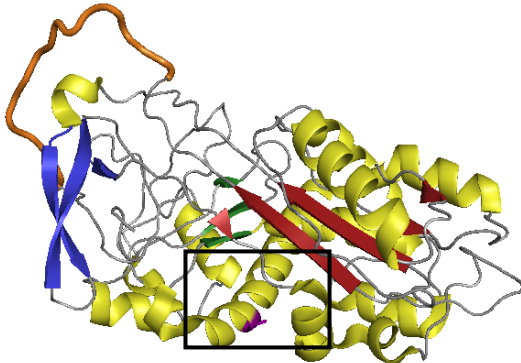
Auf der linken Seite ist zuerst das WT-Protein in der Übersicht dargestellt. Ein schwarzer Kasten zeigt den vergrößerten Ausschnitt an, der darunter angezeigt wird.

Auf der rechten Seite ist das mutante Protein ebenfalls zuerst in der Übersicht dargestellt. Ein schwarzer Kasten zeigt auch hier den vergrößerten Ausschnitt an.

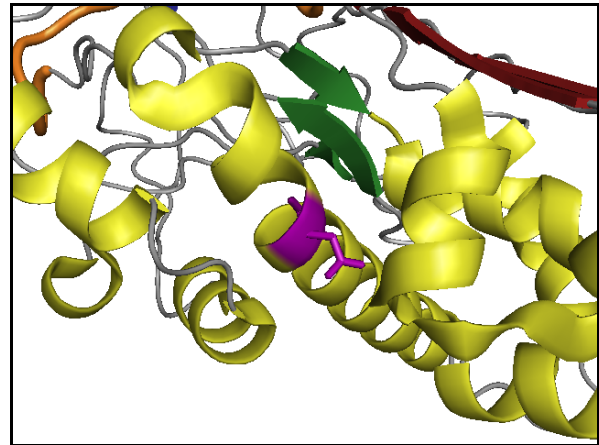
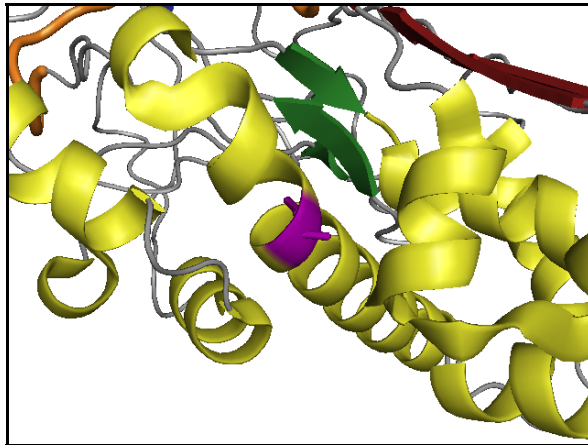
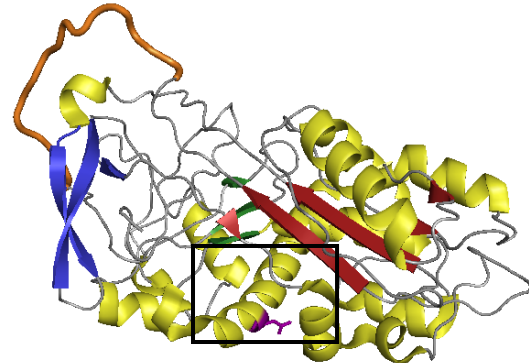
Unter den Abbildungen sind die hauptsächlichen Merkmale der einzelnen Variante noch einmal zusammengefasst. Ebenfalls wird ein Ausschnitt aus dem Homologie-Vergleich verschiedener Species, der die betreffende Variante enthält, dargestellt.

## Mutation A134D

C1-INH WT



C1-INH A134D

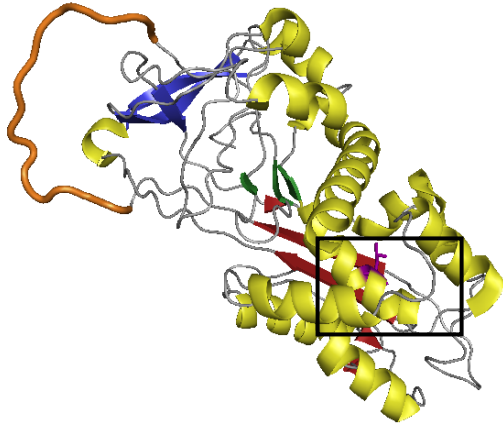


- < 20 % Aktivität
- Austausch neutrale Aminosäure gegen saure
- Befindet sich in Ex 3 am vorderen Teil der Serpindomäne
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Zwischen verschiedenen humanen Serpinen keine Homologie
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

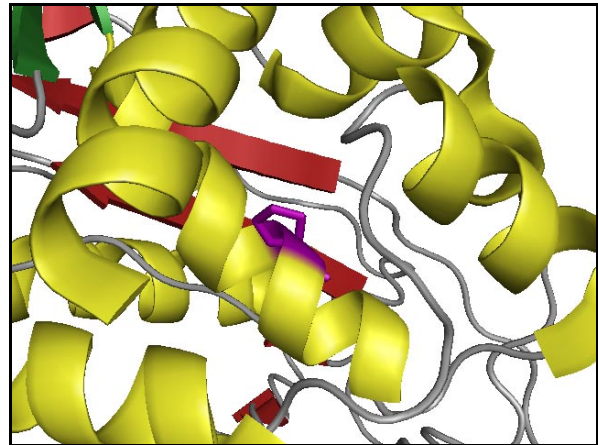
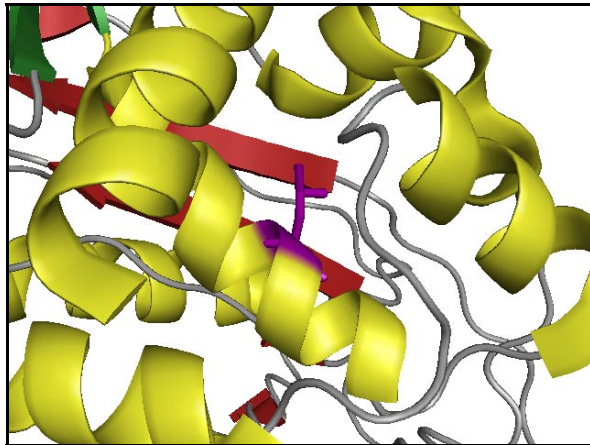
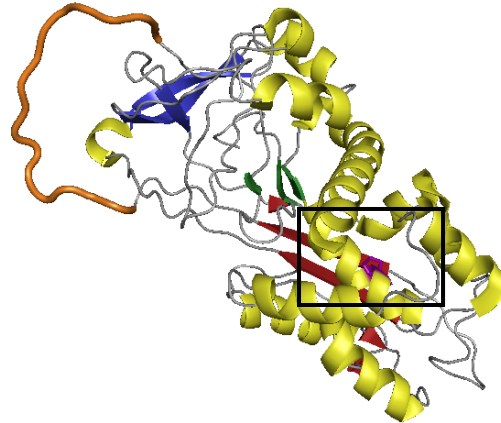
		H114D		A134D	142
H	GPVTLCSDLE	SH	STEAVLGD	ALVDFSLKLY	HAFSAMKKVE
P	GPVTLCSDLE	SH	STEAMLGD	ALVDFSLKLY	HAFSAMKKVE
M	EPLAQCSDD	RD	SSEAKLSE	ALTDFSVKLY	HAFSATKMAK
B	APVTSKSDSE	IR	SAEAVLGE	ALTDFSLRLY	QDFSVLKKRE
T	E-WKPCLDQD	SR	SDEAVLQE	SLAEFSMKLY	-SFLRESLPS
G			M	ALGTFALRFY	QHMAESAKPD

## Mutation L156P

C1-INH WT



C1-INH L156P



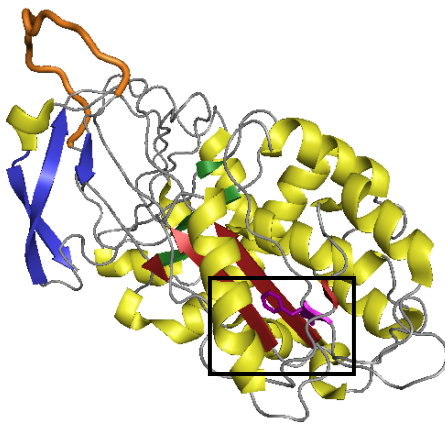
- < 20 % Aktivität
- Austausch hydrophober, neutraler AS durch heterozyklische mit disubstituierter Aminogruppe
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Stark konserviert zwischen humanen Serpinen
- befindet sich am Ende Exon 3
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

	143	L156P		
H	TNMAFSPFSI	ASILLTQVLLG	AGQNTKTNLE	SILSYPKDFT
P	TNMAFSPFSI	ASILLTQVLLG	AGENTKTNLE	SILSYPKDFT
M	TNMAFSPFSI	ASILLTQVLLG	AGDSTKSNLE	SILSYPKDFA
B	TNFIFSPFSI	ASILLTQILLG	AGGETRVSLE	HLLSYQNFNS
T	DNILVSPLSI	STILLSHLLLG	ARGKTQRAIE	SALSVPHEFS
G	TNLLFSPVNV	ALGLSHLLLG	ARGETQQRLA	AILGYQPGLA

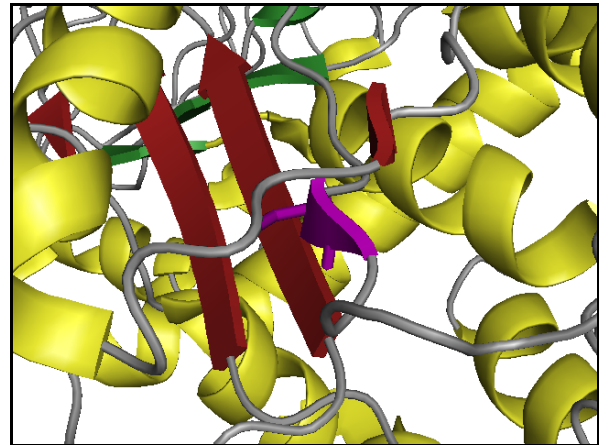
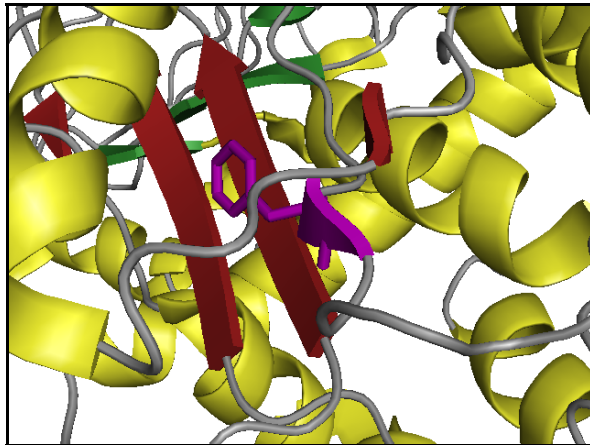
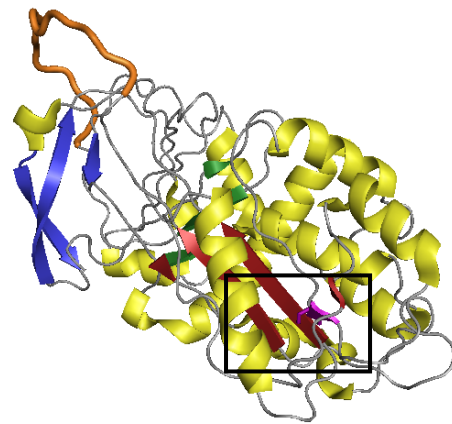


## Mutation F203S

C1-INH WT



C1-INH F203S



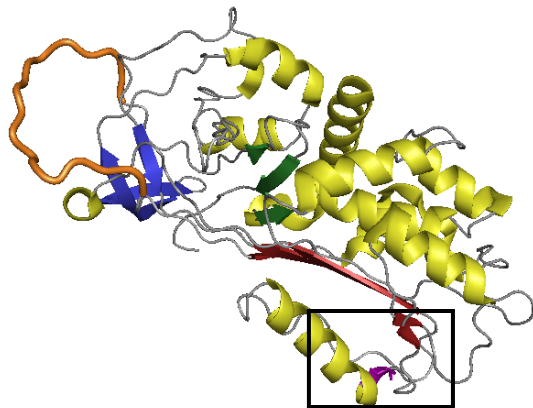
- < 20 % Aktivität
- Austausch hydrophober, aromatischer AS durch kleine hydrophile
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- konserviert zwischen humanen Serpinen
- befindet sich im zentralen  $\beta$ -Faltblatt A
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

	F203S			S233T
H	SQI <b>F</b> HSPDLA	IRDTFVNASR	TLYSSSPRVL	SNN <b>S</b> DANLEL
P	SQI <b>F</b> HSPDLA	IRDTFVNASR	TLYSSSPRVL	SNN <b>S</b> DANLEL
M	SQI <b>F</b> HSPDLA	IRDYVNASQ	SLYGSSPRVL	GPD <b>S</b> AANLEL
B	SQI <b>F</b> HSSDLT	IKDTFAEASQ	RLYGSSPRPL	GND <b>S</b> TASLEL
T	SQI <b>Y</b> HPDIN	LSEFTNHSI	QFYEAVPTRL	LET <b>S</b> EENTNM
G	TVI <b>F</b> HHPDLH	LRPRFLNESW	RFYKARPREL	SGN <b>G</b> SLDLQR

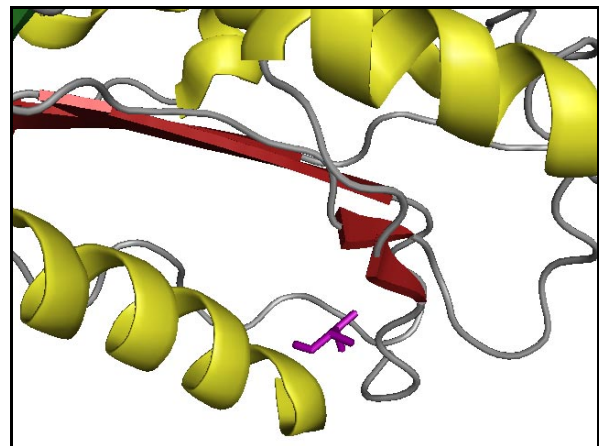
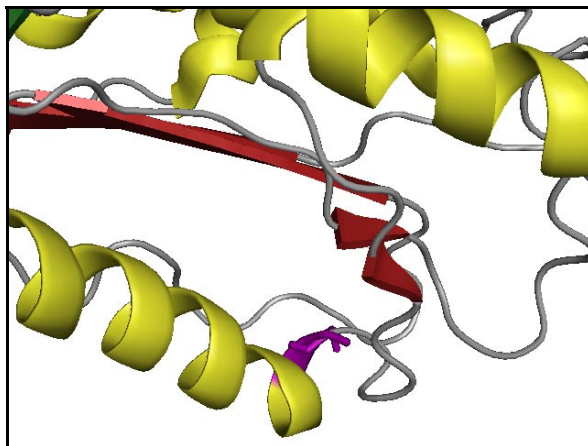
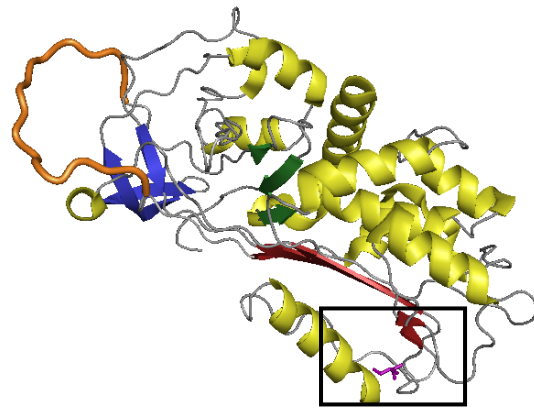


## S233T

C1-INH WT



C1-INH S233T

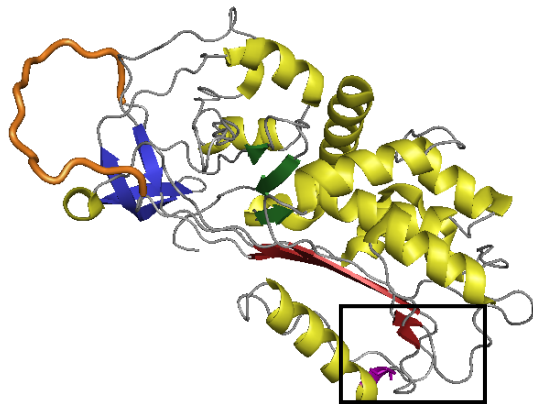


- Aktivität ~ 85 %
- Austausch zweier sehr ähnlicher AS
- Befindet sich in  $\alpha$ -Helix kurz vor  $\beta$ -FaltblattA
- Patient hat auch noch Deletion eines Nukleotids in Exon 7
- **deutliche Auswirkung im Modell, Unterbrechung der Struktur**

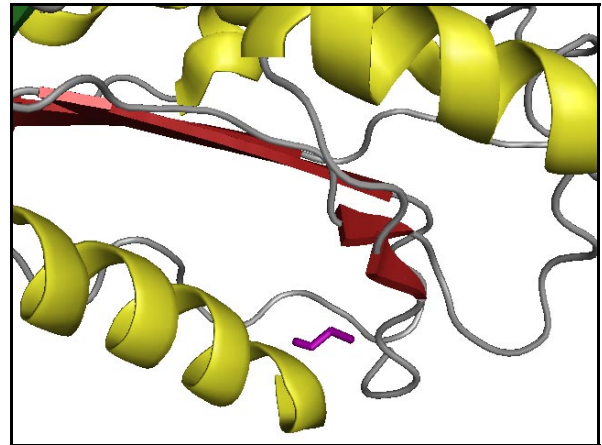
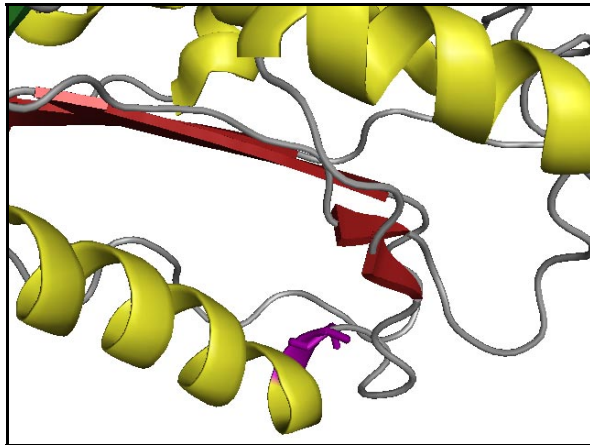
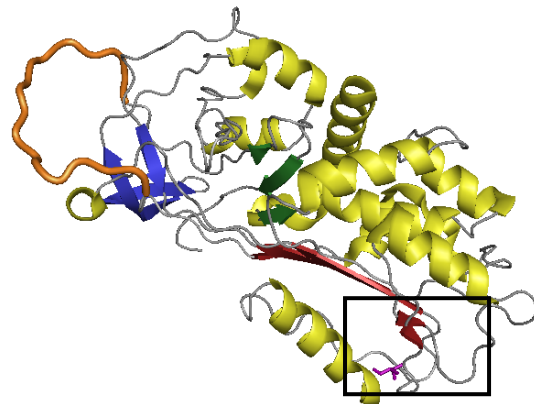
			S233T	
H	IRDTFVNASR	TLYSSSPRVL	SNNSDANLEL	INTWVAKNTN
P	IRDTFVNASR	TLYSSSPRVL	SNNSDANLEL	INTWVAKNTN
M	IRDTYVNASQ	SLYGSSPRVL	GPDSAANLEL	INTWVAENTN
B	IKDTFAEASQ	RLYGSSPRPL	GNDSTASLEL	INDWVAKKTN
T	LSESEFTNHSI	QFYEAVPTRL	LETSEENTNM	INSWVANKTN
G	LRPRFLNESW	RFYKARPREL	SGNCSLDLQR	INEWVRKATH

## S233G

C1-INH WT



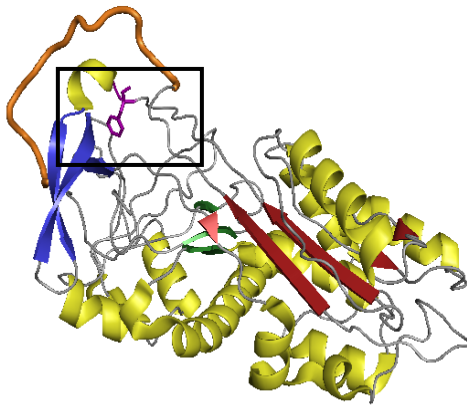
C1-INH S233G Gallus



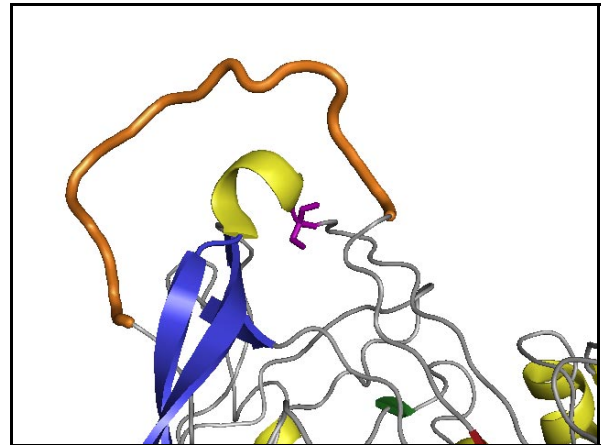
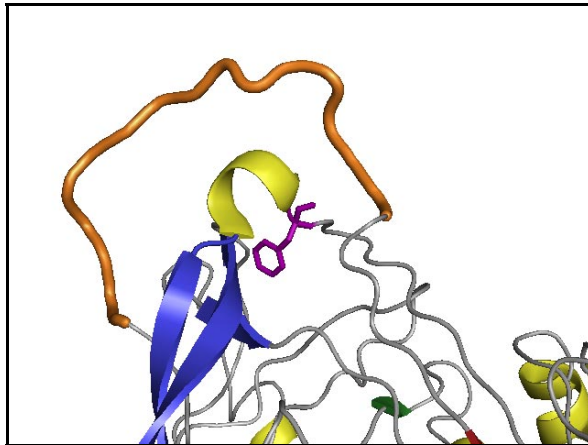
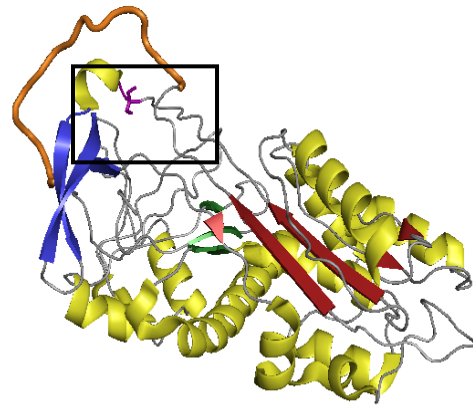
- ~ 70 % Aktivität
- S233G kommt natürlich bei Gallus vor
- **starke Veränderung im Modell, Unterbrechung der Struktur**

## F281S

C1-INH WT



C1-INH F281S

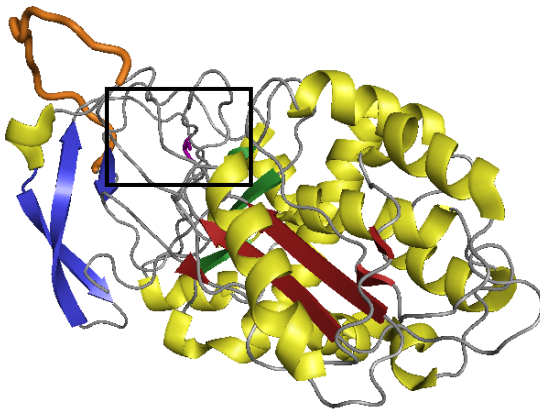


- Aktivität < 20 %
- Austausch hydrophober aromatischer AS mit kleiner hydrophiler
- Hoch konserviert zwischen den Spezies
- Hoch konserviert zwischen verschiedenen humanen Serpinen
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

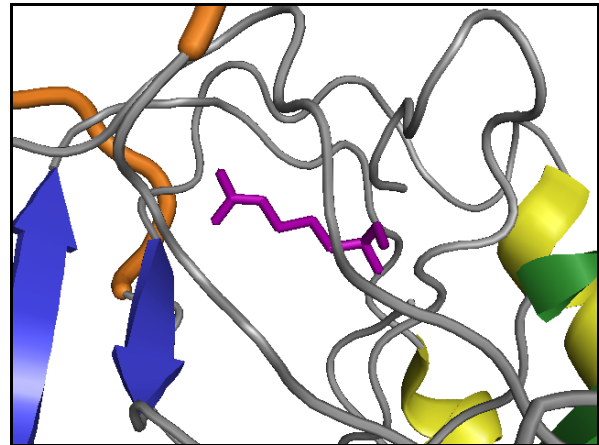
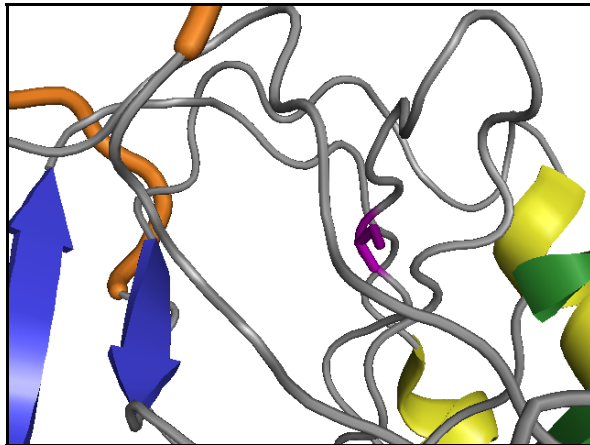
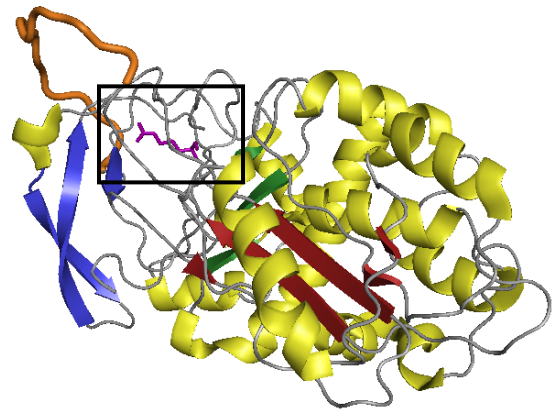
		F281S		
H	A1YLSAKWKT	T	FDPKKT	RME PFHFKNSV-I KVPMMNSKKY
P	AIYLSAKWKT	T	FDPKKT	RME PFHFKNSV-I KVPMMNSKKY
M	AVYLSAKWKI	T	FEPK	KM-MA PFFYKNSM-I KVPMMSSVKY
B	AVALSAKWKI	A	FDKGR	TSTK PFHLKSSA-I KVPMMNSKKY
T	AVSFKGQWEL	K	FDSK	PKKRH FTKPNGDL-V SVWVLYHQSY
G	AVHFQARWQK	P	E	FKTKHTVLL PFMRHGHRPV DVLTMTSKKY

## G323R

C1INH WT



C1INH G323R

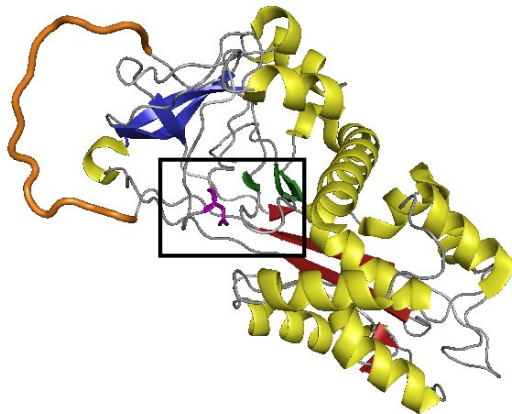


- Aktivität < 20 %
- Austausch kleiner hydrophiler AS durch basische AS mit großer Seitenkette
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Keine Homologie zwischen humanen Serpinen
- befindet sich am Anfang Exon 7
- **Störung des Modells durch Mutation**
- Räumliche Verschiebung des RCL oder des beta-sheets B möglich!

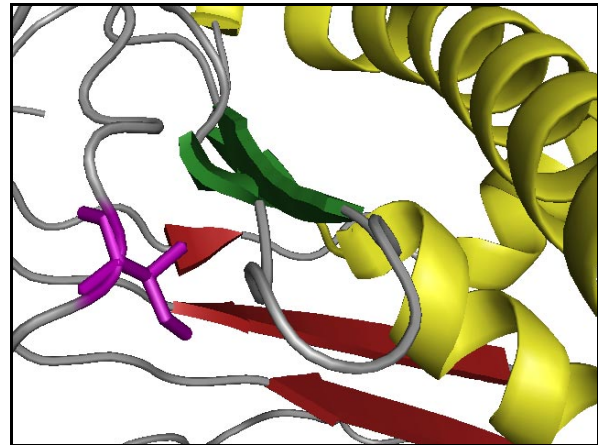
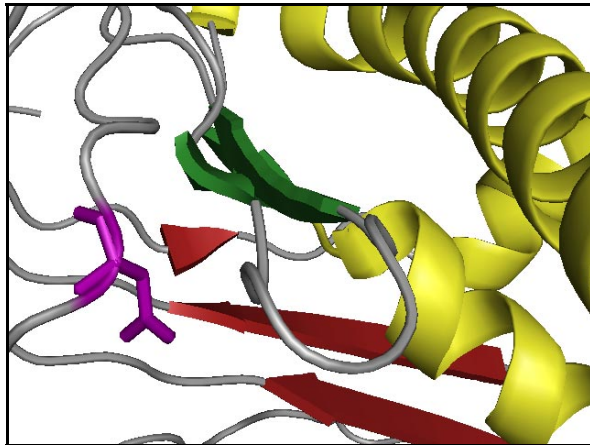
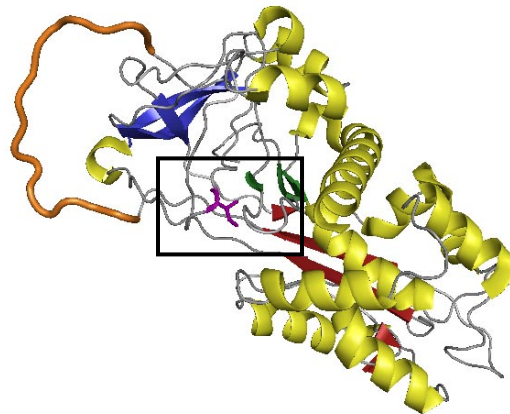
		G323R	N330I	L331P	
H	PVAHFIDQTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSLVILVP	QN-LKHRL <b>E</b> D	
P	PVAHFIDQTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSLVILVP	QN-LKHRL <b>E</b> D	
M	PVAQFDDHTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSFVIVVP	VF-PKHQL <b>K</b> D	
B	PVASFTDRTL	NRPG <b>G</b> RLQLS	H <b>N</b> LSFVILVP	QT-VKHHL <b>Q</b> D	
T	PLAMTLDTDL	KAMV <b>A</b> RFALT	G <b>E</b> TSLYVLLP	ASHTMADL <b>Q</b> Q	
G	PVASFTDPRL	QVQV <b>G</b> RLELS	G <b>G</b> LSLVVILVP	RG-PPEAL <b>E</b> A	

## N330I

C1INH WT



C1INH N330I

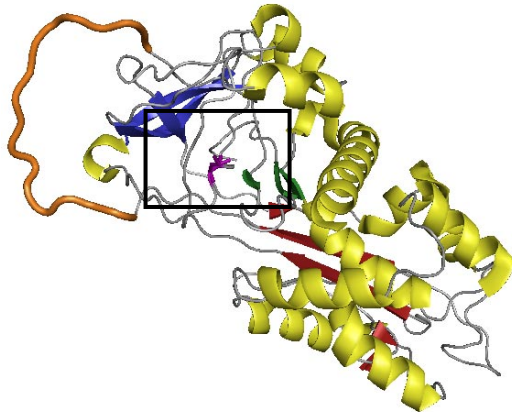


- Aktivität < 20%
- Substitution saurer AS mit hydrophober AS mit verzweigter Seitenkette
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Sehr hohe Homologie zwischen Serpinen
- befindet sich in Exon 7
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

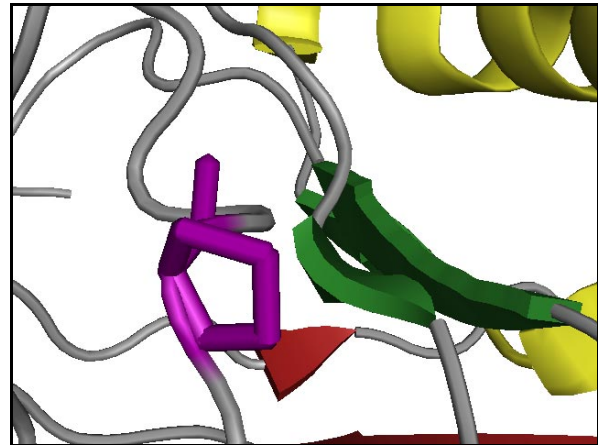
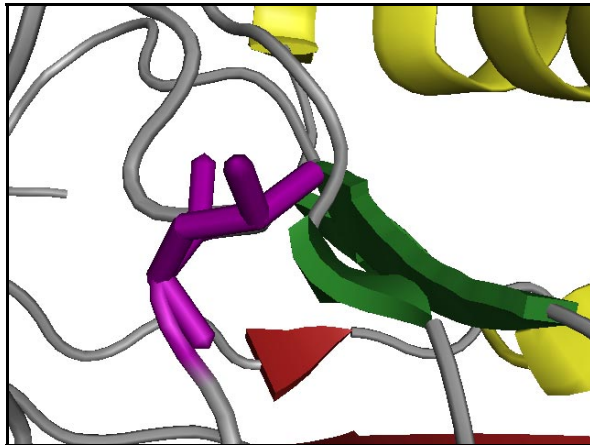
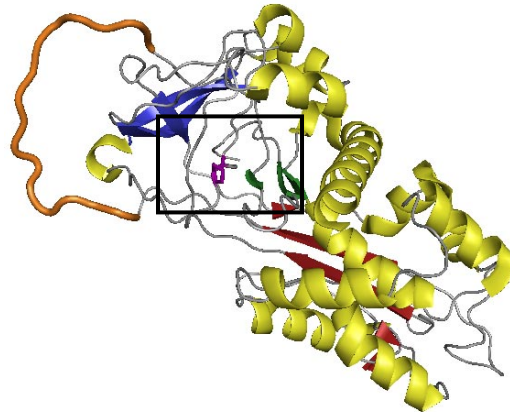
		C323R	N330I	L331P	
H	PVAHFIDQTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSLVILVP		QN-LKHRLED
P	PVAHFIDQTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSLVILVP		QN-LKHRLED
M	PVAQFDDHTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSFVIVVP		VF-PKHQLKD
B	PVASFTDRTL	NRP <b>G</b> RQLQLS	H <b>N</b> LSFVILVP		QT-VKHHLQD
T	PLAMTLDIDL	KAMV <b>A</b> RFALT	<b>G</b> ETSLYVLLP		ASHTMADLQQ
G	PVASFTDPRL	QVQ <b>V</b> GRLELS	<b>G</b> LSLVVLP		RG-PPEALEA

## Mutation L331P

C1INH WT



C1INH L331P



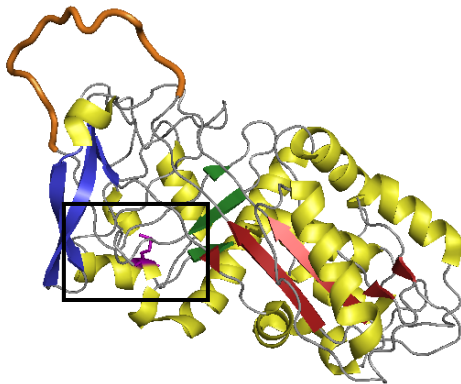
- Aktivität < 20 %
- Substitution hydrophober, neutraler AS durch heterozyklische
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Keine Homologie zwischen Serpinen
- befindet sich in Exon 7
- liegt benachbart zu  $\beta$ -Faltblatt B, evtl. sterische Behinderung möglich
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

		G323R	N330I	L331P	
H	PVAHFIDQTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSLVILVP	QN-LKHRL <b>E</b> D	
P	PVAHFIDQTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSLVILVP	QN-LKHRL <b>E</b> D	
M	PVAQFDDHTL	KAKV <b>G</b> QLQLS	H <b>N</b> LSFVIVVP	VF-PKHQL <b>K</b> D	
B	PVASFTDRTL	NRPG <b>G</b> RLQLS	H <b>N</b> LSFVILVP	QT-VKHHL <b>Q</b> D	
T	PLAMTLDTDL	KAMV <b>A</b> RFALT	<b>G</b> ETSLYVLLP	ASHTMADL <b>Q</b> Q	
G	PVASFTDPRL	QVQV <b>G</b> RLELS	<b>G</b> GLSLVVLVP	RG-PPEALE <b>A</b>	

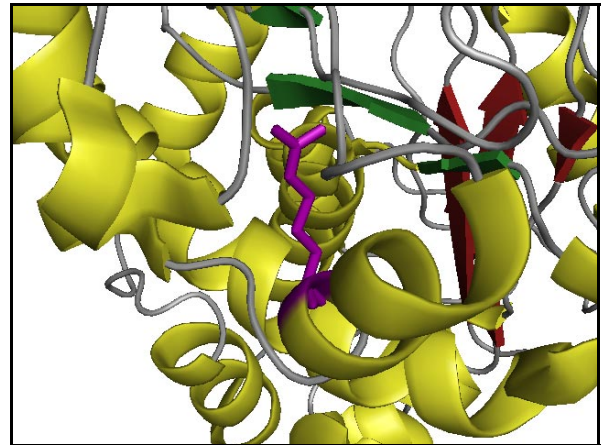
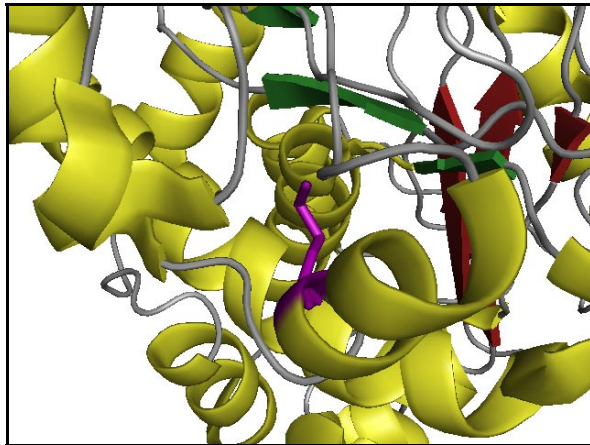
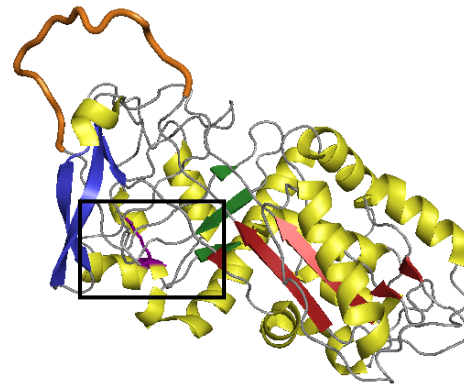


## Mutation M348R

C1INH WT



C1INH M348R

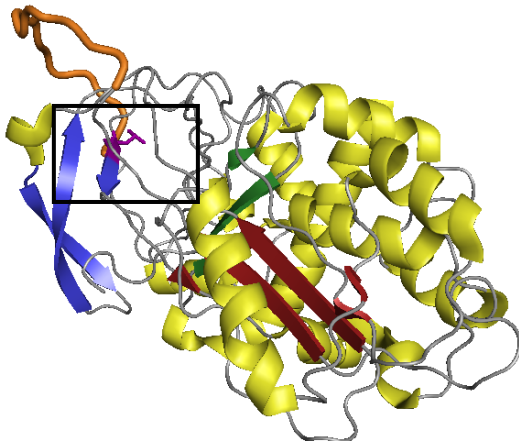


- Aktivität < 20 %
- Substitution hydrophober AS durch basische mit großer Seitenkette
- Homologie zwischen Spezies gering
- Keine Homologie zwischen humanen Serpinen
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

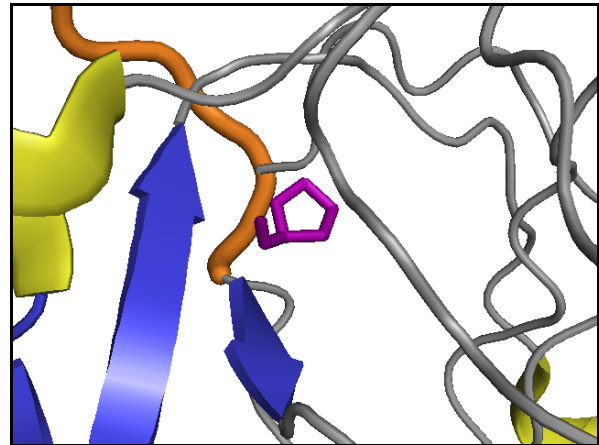
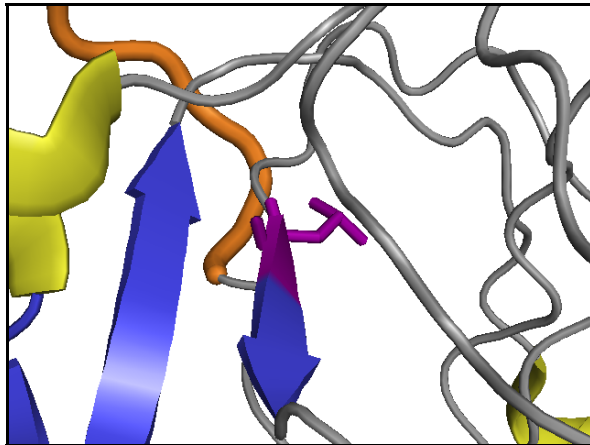
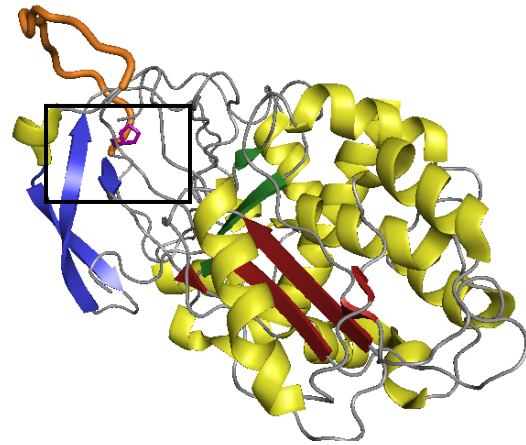
		M348R			L347P	L376P
H	QN-LKHRL	MEQALSPSVF	KAIMEKLEMS	KFQPTIL	LLP	RI
P	QN-LKHRL	MEQALSPSVF	KAIMKKLEMS	KFQPTIL	LLP	RI
M	VF-PKHQLKD	VEKALNPTVF	KAIMKKLELS	KFLPTYL	LIMP	HI
B	QT-VKHHLQD	LEQALSTAVF	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LIMP	RI
T	ASHTMADLQQ	VEERM	LRMIHNMKTI	VPQKAEV	LIP	RI
G	RG-PPEALEA	VERALDPPTF	LALLQRAANT	PVRPTT	VLP	RL
					L376Q	P377L

## Mutation L374P

C1-INH WT



C1-INH L374P



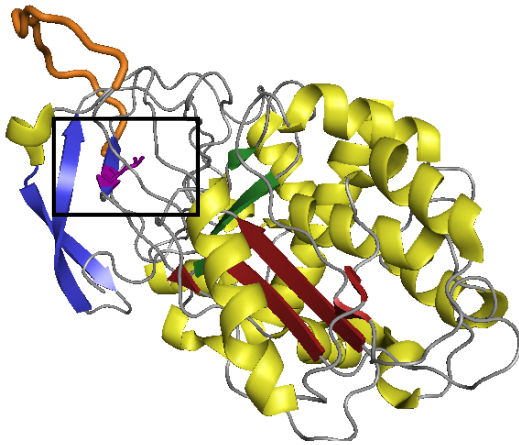
- Aktivität < 20 %
- Substitution hydrophober, neutraler AS durch heterozyklische
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Homologie zwischen humanen Serpinen hoch
- Befindet sich in Exon 7
- **Deutliche Auswirkung im Modell,  $\beta$ -Faltblatt C wird durch Mutation unterbrochen**

		L347P	L376P	R378C	L388P
H	KAIMEKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
P	KAIMKKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
M	KAIMKKLELS	KFLPTY	LIMP	HIKVKSSQDM	LSVMEKLEFF
B	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LIMP	RIKVQSSQDM	L-----DYF
T	LRMIHNMKTI	VPQKAE	VILP	RIKLDVKPDM	FMLMKKLGIM
G	LALLQRAANT	PVRPTT	VALP	RLHLDLAVDV	VAKVHDMDF
		L376Q	P377L	R378H	

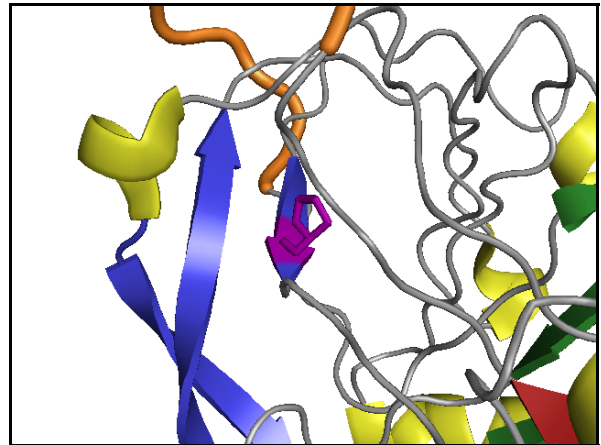
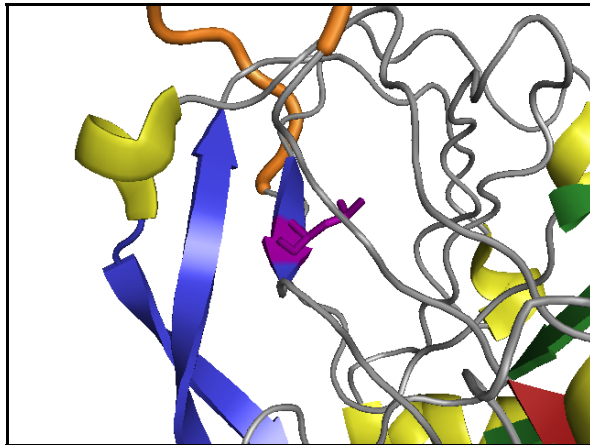
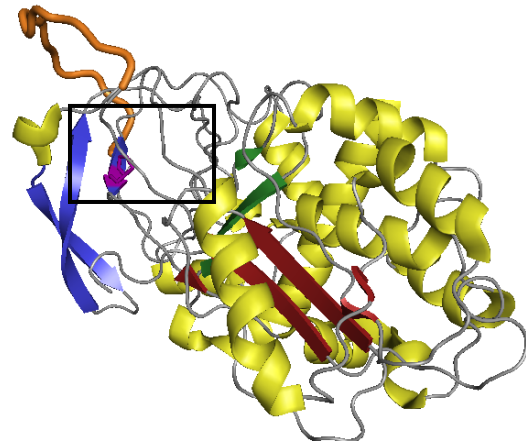


## Mutation L376P

C1-INH WT



C1-INH L374P

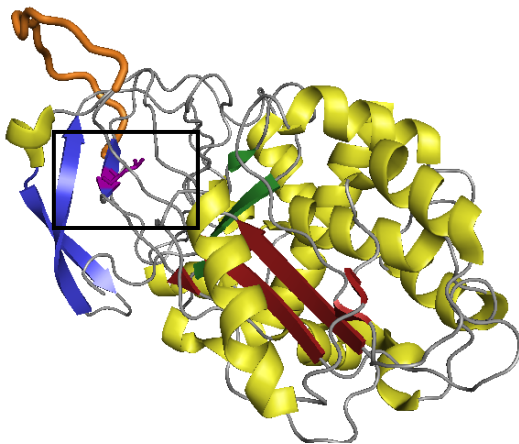


- Aktivität < 20 %
- Austausch hydrophober, neutraler AS mit durch heterozyklische
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Homologie zwischen humanen Serpinen hoch
- befindet sich in Exon 7
- Befindet sich in  $\beta$ -Faltblatt C
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

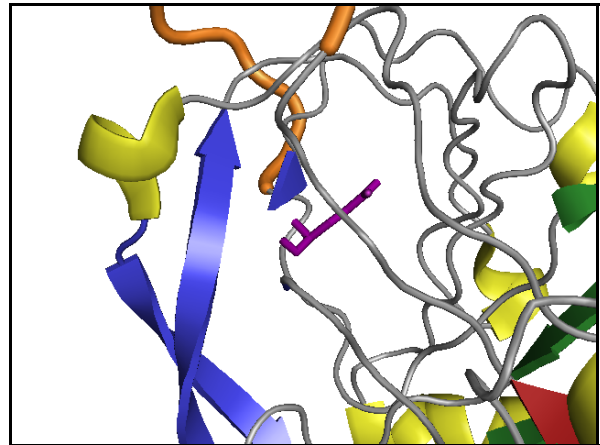
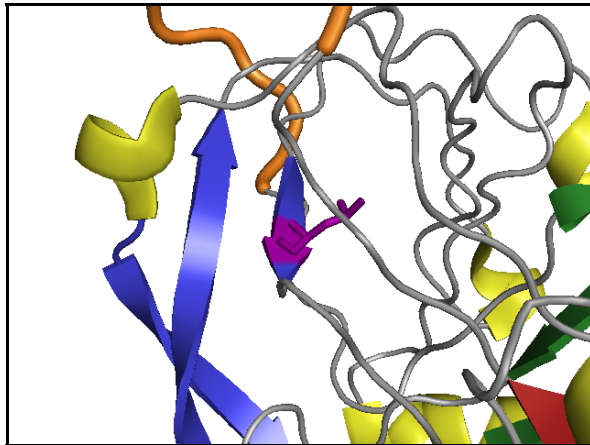
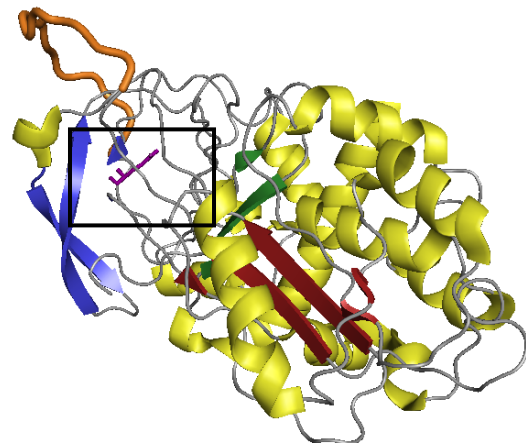
		L347P	L376P	R378C	L388P
H	KAIMEKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
P	KAIMKKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
M	KAIMKKLELS	KFLPTY	LIMP	HIKVKSSQDM	LSVMEKLEFF
B	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LIMP	RIKVQSSQDM	L-----DYF
T	LRMIHNMKTI	VPQKAE	VILP	RIKLDVKPDM	FMLMKKLGFM
G	LALLQRAANT	PVRPTT	VALLP	RLHLDLAVDV	VAKVHDMDF
		L376Q	P377L	R378H	

## Mutation L376Q

C1-INH WT



C1-INH L376Q

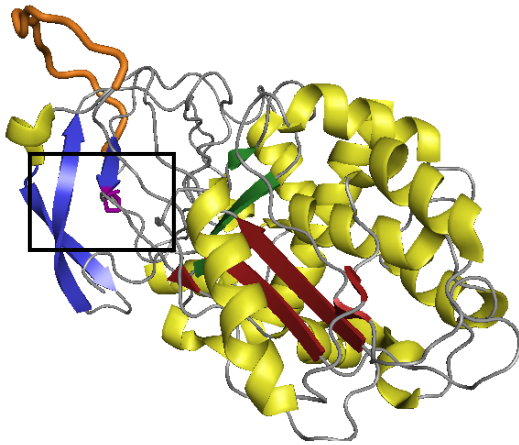


- Aktivität < 20 %
- Substitution hydrophober, neutraler AS durch hydrophile AS mit zusätzlicher NH<sub>2</sub>-Gruppe
- Homologie zwischen Spezies hoch
- Homologie zwischen humanen Serpinen hoch
- befindet sich in Exon 7
- **Deutliche Auswirkung im Modell,  $\beta$ -Faltblatt C wird zerstört**

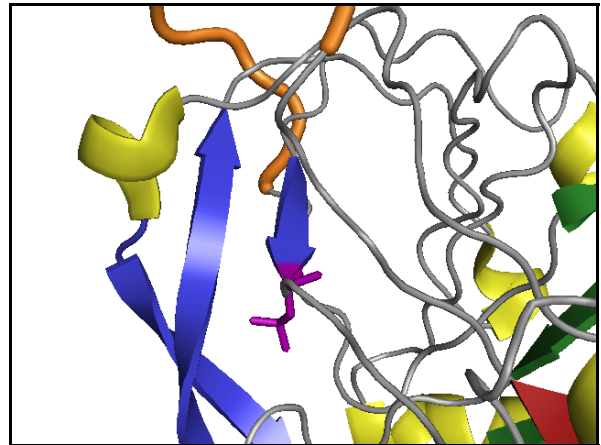
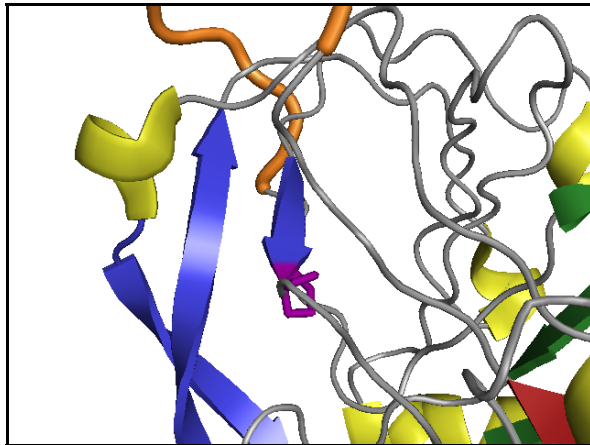
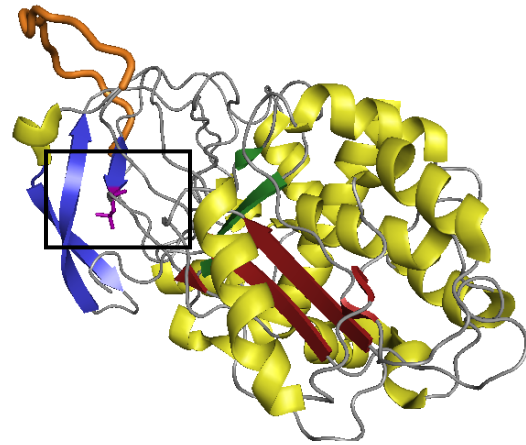
		L347P	L376P	R378C	L388P
<b>H</b>	KAIMEKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
<b>P</b>	KAIMKKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
<b>M</b>	KAIMKKLELS	KFLPTY	LIMP	HIKVKSSQDM	LSVMEKLEFF
<b>B</b>	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LIMP	RIKVQSSQDM	L-----DYF
<b>T</b>	LRMIHNMKTI	VPQKAE	VILP	RIKLDVKPDM	FMLMKKLGIM
<b>G</b>	LALLQRAANT	PVRPTT	VALP	RLHLDLAVDV	VAKVHDMDF
		L376Q	P377L	R378H	

## Mutation P377L

C1-INH WT



C1-INH P377L

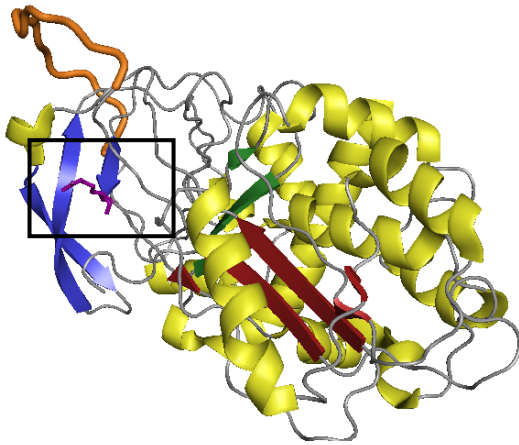


- Aktivität < 10 %
- Substitution heterozyklischer AS durch basische
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Homologie zwischen humanen Serpinen sehr hoch
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

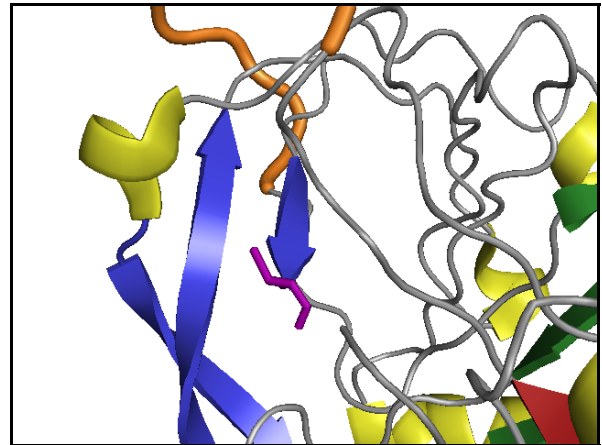
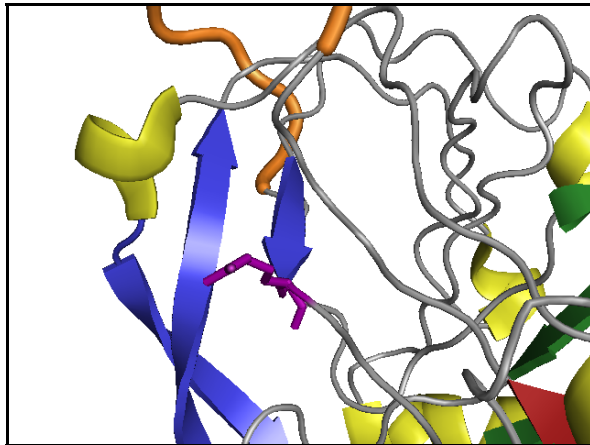
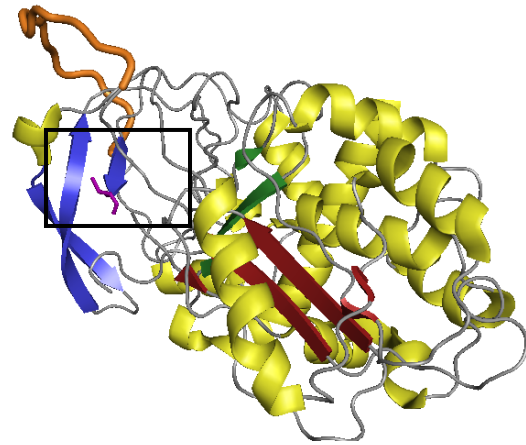
		L347P	L376P	R378C	L388P	
H	KAIMEKLEMS	KFQPTI	LTL	LP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
P	KAIMKKLEMS	KFQPTI	LTL	LP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
M	KAIMKKLELS	KFLPTY	LIMP	HIKVKSSQDM	LSVMEKLEFF	
B	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LIMP	RIKVQSSQDM	L-----DYF	
T	LRMIHNMKTI	VPQKAE	VIL	LP	RIKLDVKPDM	FMLMKKLGLM
G	LALLQRAANT	PVRPTT	VALL	LP	RLHLDLAVDV	VAKVHDMD-F
		L376Q	P377L	R378H		

## Mutation R378C

C1-INH WT



C1-INH R378C

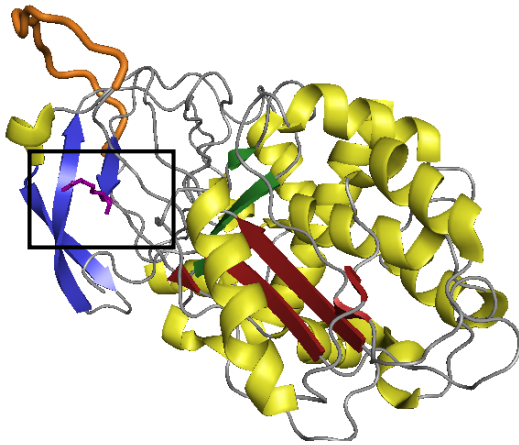


- Aktivität ~ 40%
- Substitution basischer AS durch Schwefelhaltige
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Homologie zwischen humanen Serpinen gering
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

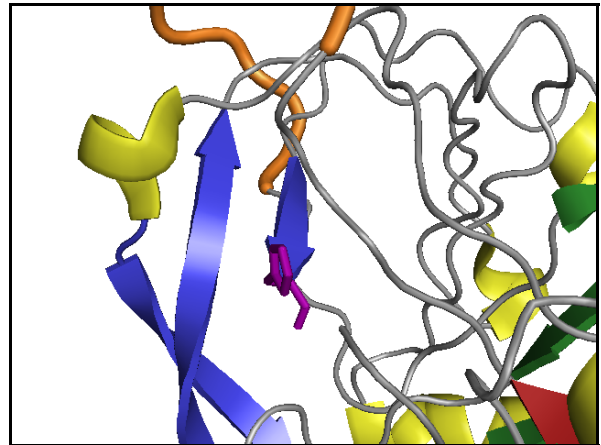
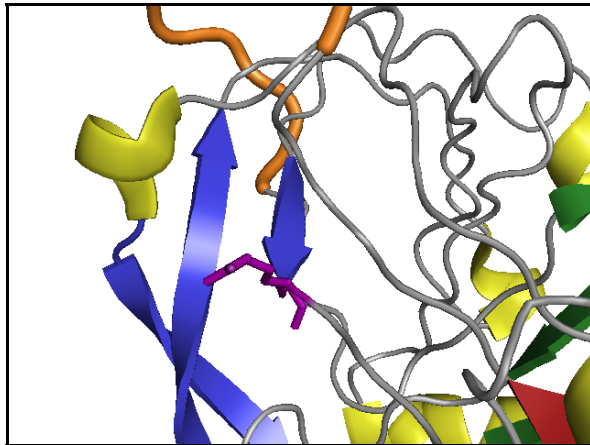
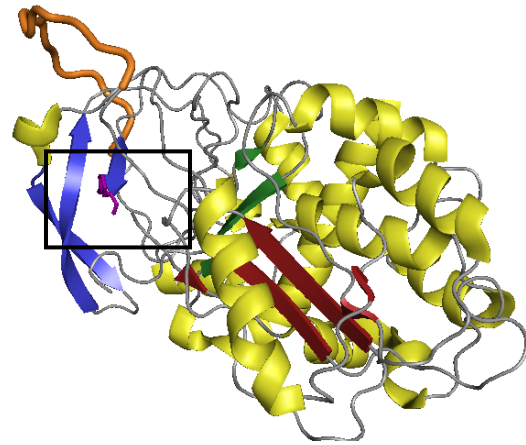
		L347P	L376P	R378C	L388P	
H	KAIMEKLEMS	KFQPTI	LTL	LP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
P	KAIMKKLEMS	KFQPTI	LTL	LP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF
M	KAIMKKLELS	KFLPTY	LTM	P	HIKVKSSQDM	LSVMEKLEFF
B	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LTM	P	RIKVQSSQDM	L-----DYF
T	LRMIHNMKTI	VPQKAE	VIL	LP	RIKLDVKPDM	FMLMKKLGLM
G	LALLQRAANT	PVRPTT	VAL	LP	RLHLDLAVDV	VAKVHDMD-F
		L376Q	P377L	R378H		

## Mutation R378H

C1-INH WT



C1-INH R378H

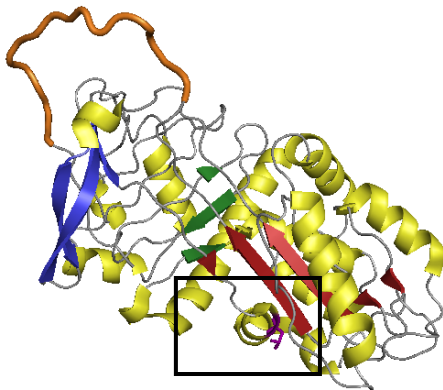


- Aktivität ~ 80%,
- Murine Variante
- Substitution basischer AS durch heterozyklische
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

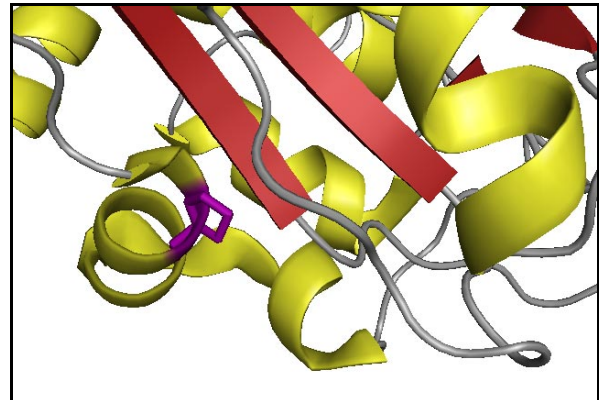
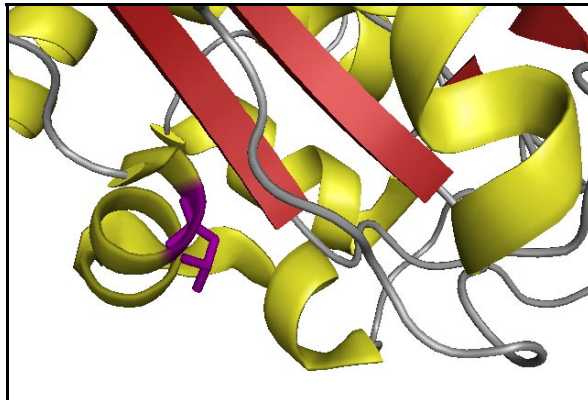
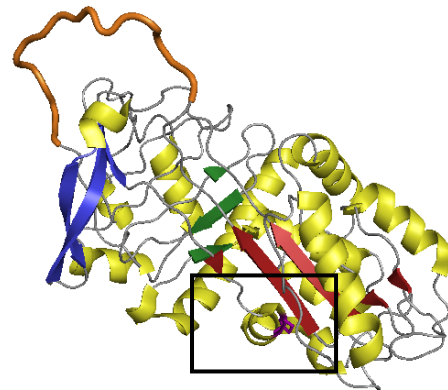
		L347P	L376P	R378C	L388P	
<b>H</b>	KAIMEKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF	
<b>P</b>	KAIMKKLEMS	KFQPTI	LTLP	RIKVTTSQDM	LSIMEKLEFF	
<b>M</b>	KAIMKKLELS	KFLPTY	LIMP	HIKVKSSQDM	LSVMEKLEFF	
<b>B</b>	KAVIKKLEMT	KFHPTH	LIMP	RIKVQSSQDM	L-----DYF	
<b>T</b>	LRMIHNMKTI	VPQAEV	ILP	RIKLDVKPDM	FMLMKKLGLM	
<b>G</b>	LALLQRAANT	PVRPTT	VALP	RLHLDLAVDV	VAKVHMD-F	
		L376Q	P377L	R378H		

## Mutation L388P

C1-INH WT



C1-INH L388P



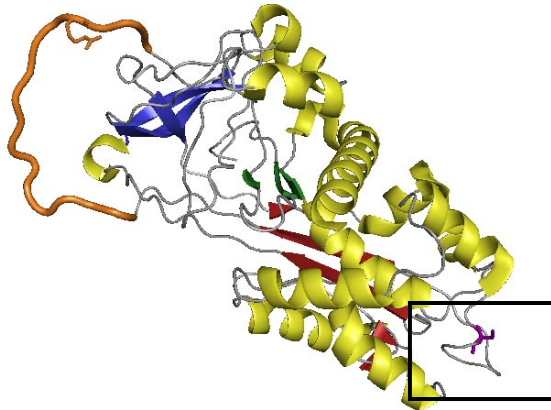
- Aktivität < 20 %
- Substitution hydrophober AS durch heterozyklische
- Homologie zwischen Spezies hoch
- Keine Homologie zwischen humanen Serpinen
- befindet sich in Exon 7
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**
- Befindet sich in  $\alpha$ -Helix in Nachbarschaft zu zentralem  $\beta$ -Faltblatt A, evtl. Verschiebung möglich

		L347P	L376P	L376P	R378C	L388P		
H	KAIMEKLEMS	KFQPTI	L	L	LP	RIKVTTSQDM	L	SIMEKLEFF
P	KAIMKKLEMS	KFQPTI	L	L	LP	RIKVTTSQDM	L	SIMEKLEFF
M	KAIMKKLELS	KFLPTY	L	L	MP	HIKVKSSQDM	L	SVMEKLEFF
B	KAVIKKLEMT	KFHPTH	L	L	MP	RIKVQSSQDM	L	-----DYF
T	LRMIHNMKTI	VPQKAE	V	L	LP	RIKLDVKPDM	F	MLMKKLGIM
G	LALLQRAANT	PVRPTT	V	L	LP	RLHLDLAVDV	V	AKVHDMDF
			L376Q	P377L	R378H			

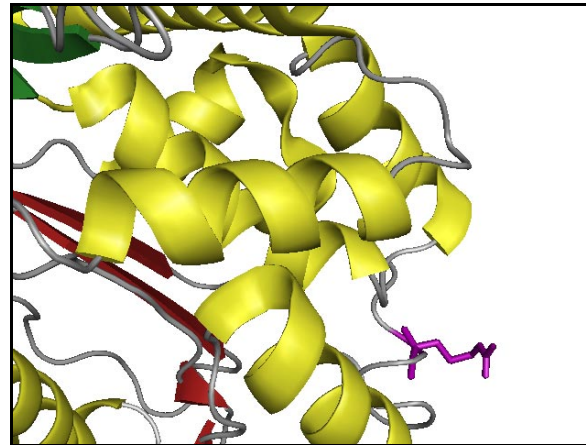
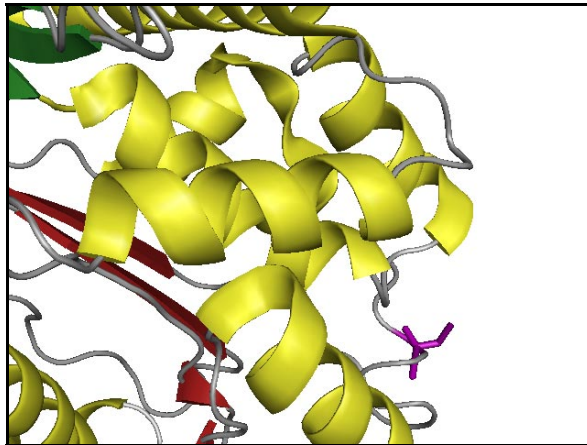
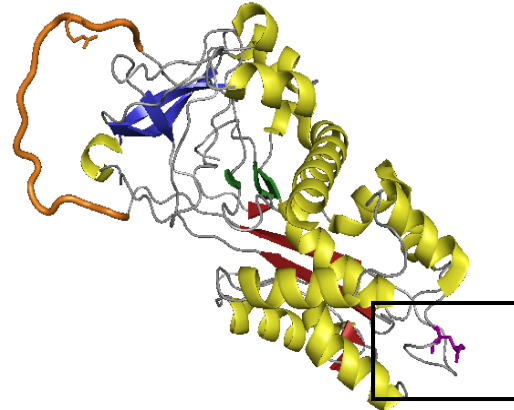


## Mutation C406R

C1-INH WT



C1-INH C406R

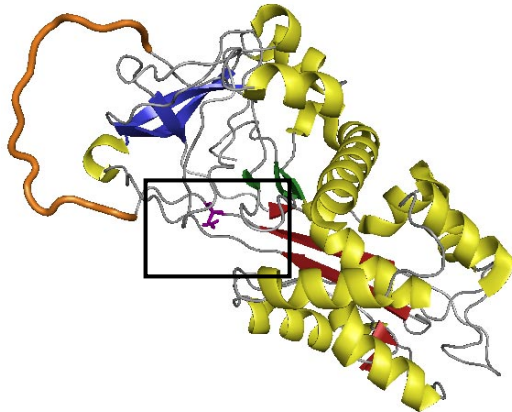


- Aktivität ~ 40 %
- Substitution hydrophiler AS durch Basische
- Cys406 bildet im WT Disulfidbrücke mit Cys101 aus und verbindet so N-terminalen Bereich mit Serpindomäne, kann durch Arginin nicht gebildet werden
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Keine Homologie zwischen verschiedenen humanen Serpinen
- **Keine Veränderung an der Sekundärstruktur im Modell**
- Genau gegenüber des Arginin im Aktiven Zentrum

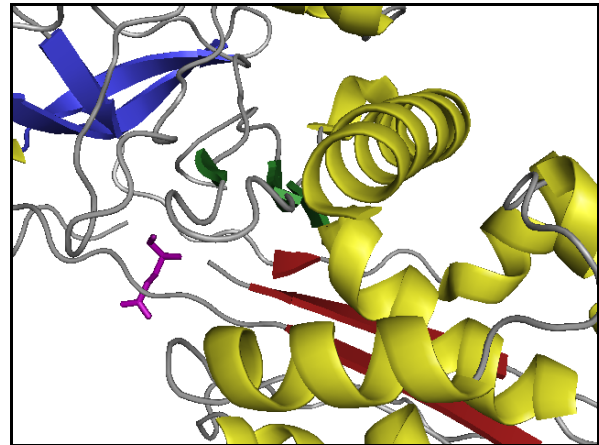
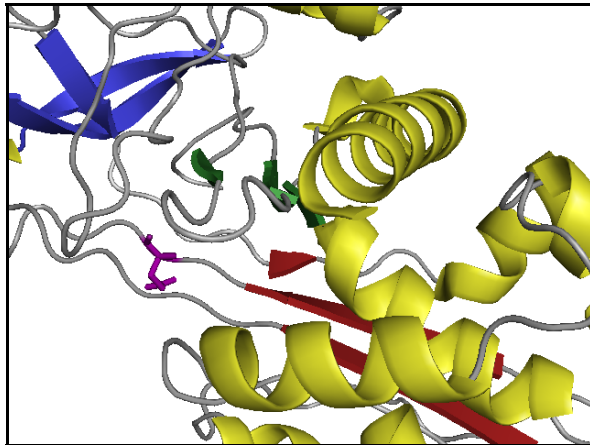
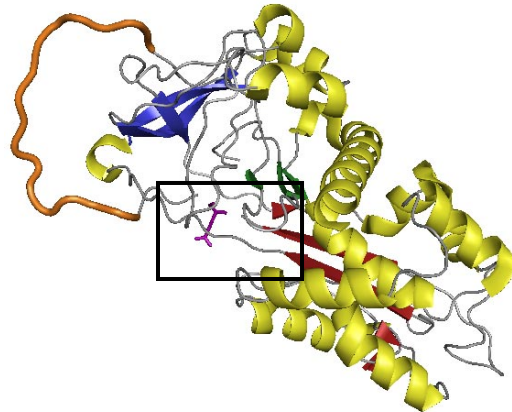
	398	C406R		E426Q	
H	DFS	YDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMQHQT	VLEEL TETGVEAAAA
P	DFS	YDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMQHQT	VLEEL TETGVEAAAA
M	DFT	YDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMKHET	VLEEL TETGVEAAAA
B	DFI	YDVNLCG	LTEDPDVQVS	GIRHQAT	LLEL TETGVDATAA
T	SLF	DANLCG	LYSEDRLVLD	EVRHRGF	LAL TEQGVEAVAV
G	GLF	DAELCG	LAQGPEVAVD	AAQHRAV	LTL DEKGVEAAGA

## Mutation E426Q

C1-INH WT



C1-INH E426Q



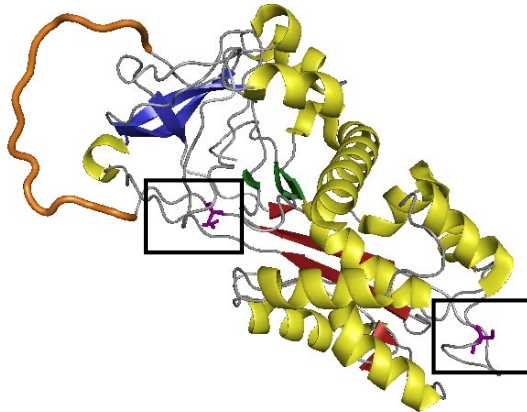
- Aktivität ~ 50 %
- Substitution saurer AS durch hydrophile
- Homologie zwischen Spezies hoch
- Homologie zwischen verschiedenen humanen Serpinen hoch
- **Deutliche Auswirkung im Modell**

	398	C406R		E426Q
H	DFSYDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMQHQTVLEL	TETGVEAAAA
P	DFSYDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMQHQTVLEL	TETGVEAAAA
M	DFTYDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMKHETVLEL	TESGVEAAAA
B	DFIYDVNLCG	LTEDPDVQVS	GIRHQATLEL	TESGVDATAA
T	SLFEDANLCG	LYSEDRLVLD	EVRHRGFLAL	TEQGVEAVAV
G	GLFLDAELCG	LAQGPEVAVD	AAQHRAVLT	DEKGVEAAGA

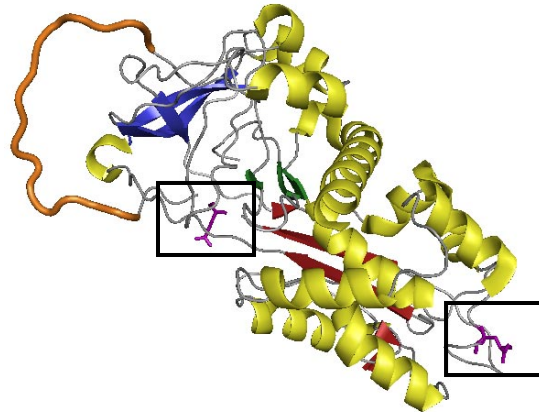


## Mutationen C406R und E426Q

C1-INH WT



C1-INH C406R und E426Q

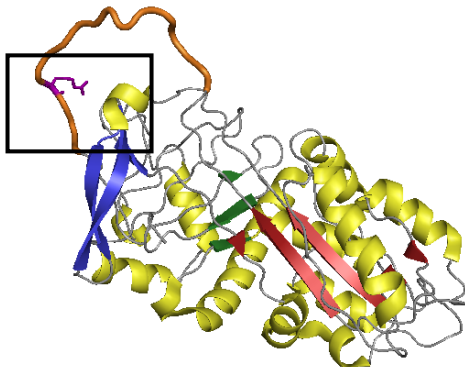


- E426Q ~ 50% Aktivität
- C406R ~ 40% Aktivität
- Zusammen ~ 12% Aktivität

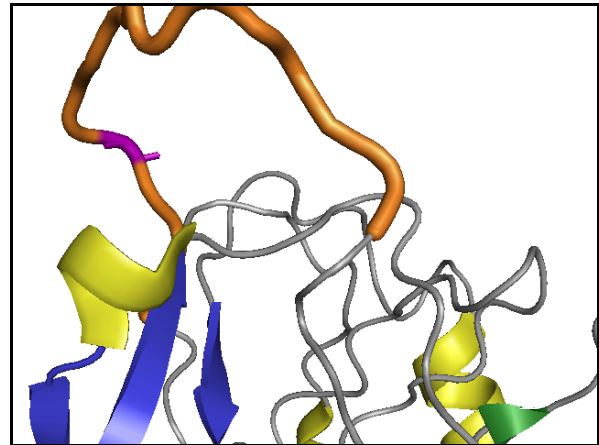
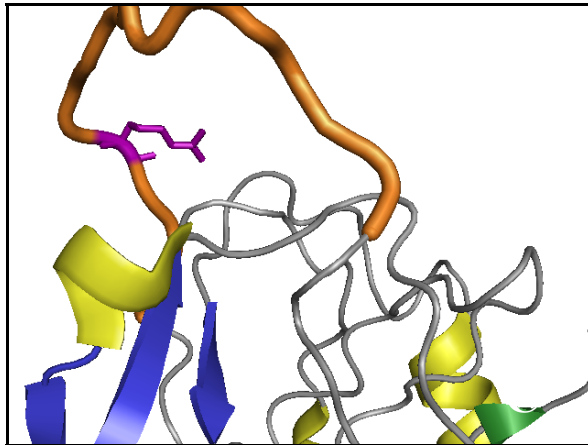
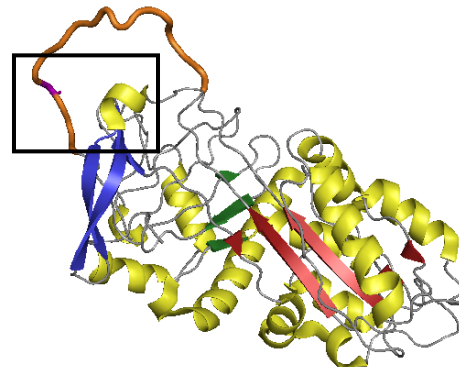
	398	C406R		E426Q	
<b>H</b>	DFS	YDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMQHQTVLEL	TETGVEAAAA
<b>P</b>	DFS	YDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMQHQTVLEL	TETGVEAAAA
<b>M</b>	DFT	YDLNLCG	LTEDPDLQVS	AMKHETVLEL	TESGVEAAAA
<b>B</b>	DFI	YDVNLCG	LTEDPDVQVS	GIRHQATLEL	TESGVDATAA
<b>T</b>	SLF	EANLCG	LYSEDRLVLD	EVRHRGFLLAL	TEQGVEAVAV
<b>G</b>	GLF	LDAELCG	LAQGPEVAVD	AAQHRAVLTLL	DEKGVEAAGA

## Mutation R444G

C1-INH WT



C1-INH R444G

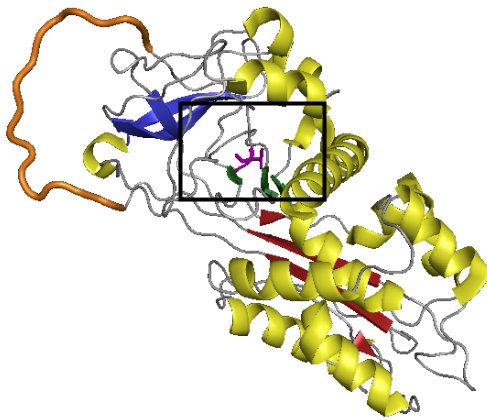


- Aktivität < 10 %
- Substitution der P1 AS durch kleine hydrophile
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Keine Homologie zwischen verschiedenen humanen Serpinen
- **Keine Veränderung an der Sekundärstruktur im Modell, jedoch keine Erkennung durch die Zielprotease mehr möglich**

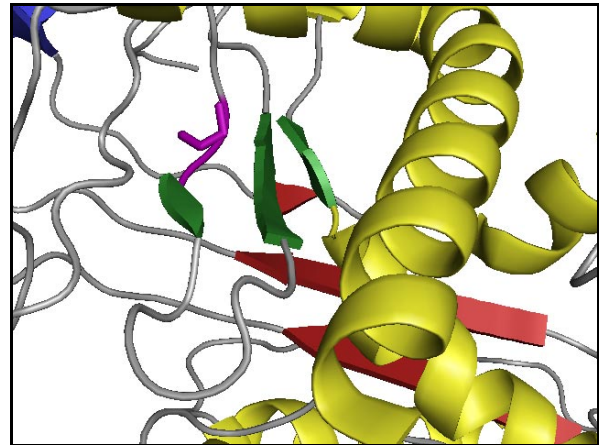
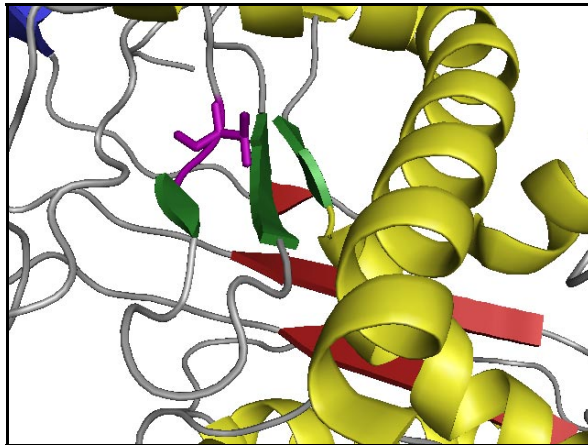
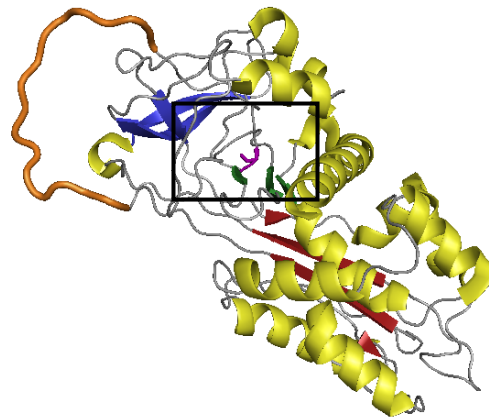
	R444G	V458M	V458G	P476L	
H	SAISVARTLL	VFEVQQPFLF	VLWDQQHKFP	VFMGRVYDPR	A
P	SAISVARTLL	IFEVQQPFLF	VLWDQQHKFP	VFMGRVYDPR	A
M	SAISFGRSLP	IFEVQRPFLL	LLWDQQHRFP	VFMGRVYDPR	G
B	SVVSVARNLL	LFEVQQPFLF	LLWDQQHKFP	VFMGRVYDPR	K G
T	TSVSFSRTYI	SFSALQPFVF	LLWSDQANVP	LFVGRVIDPR	
G	MATSLARIAL	QLEALQPFLL	VLWDEGNAIP	LFMGRLSDPQ	A

## Mutation V458G

C1-INH WT



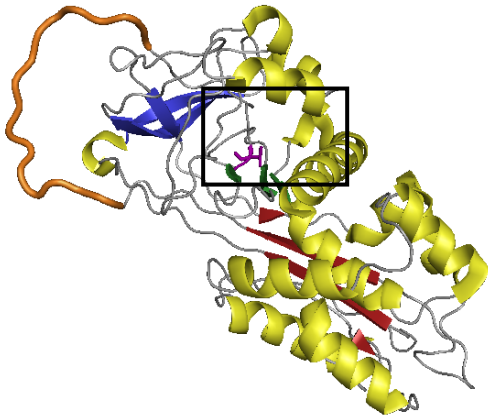
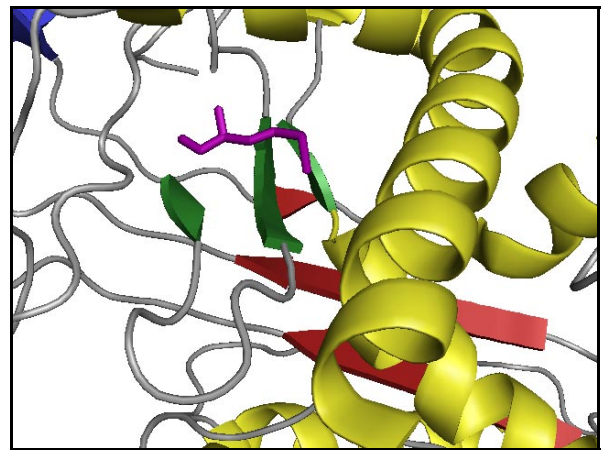
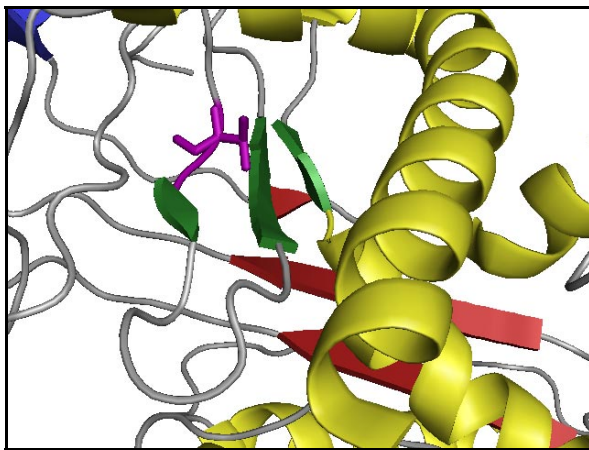
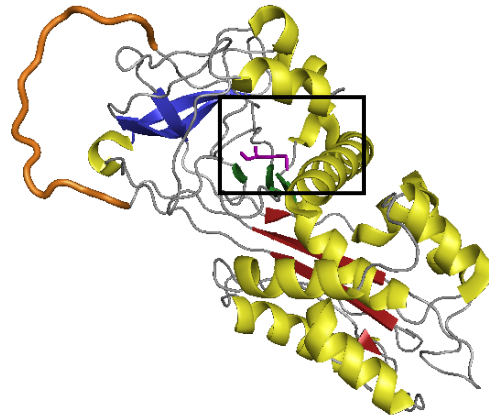
C1-INH V458G



- Aktivität < 20 %
- Geringe Homologie zwischen Spezies
- Befindet sich in „distal hinge“ Region kurz vor  $\beta$ -FaltblattB
- **Keine sichtbare Veränderung im Modell**

	R444G		V458M	V458G		P476L					
H	SAISVA	R	TLL	VFEVQQ	PFLF	V	LWDQQHKFP	VFMGRVYD	P	R	A
P	SAISVA	R	TLL	IFEVQQ	PFLF	V	LWDQQHKFP	VFMGRVYD	P	R	A
M	SAISFG	R	SLP	IFEVQR	PFLF	L	LWDQQHRFP	VFMGRVYD	P	R	G
B	SVVSVA	R	NLL	LFEVQQ	PFLF	L	LWDQQHKFP	VFMGRVYD	P	K	G
T	TSVSFS	R	TYI	SFSALQ	PFVF	L	LWSDQANVP	LFVGRVID	P		
G	MATSLA	R	IAL	QLEALQ	PFLF	V	LWDEGNAIP	LFMGRLSD	P	Q	A

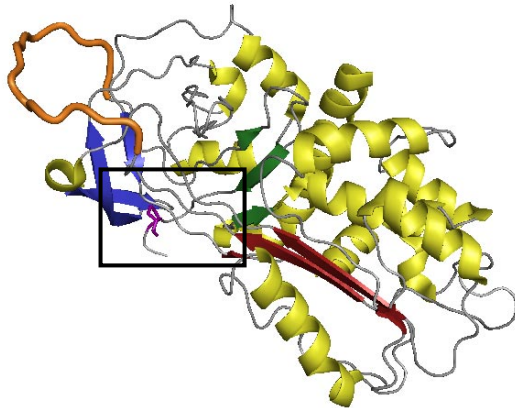
## Polymorphismus V458M

**C1-INH WT****C1-INH V458M**

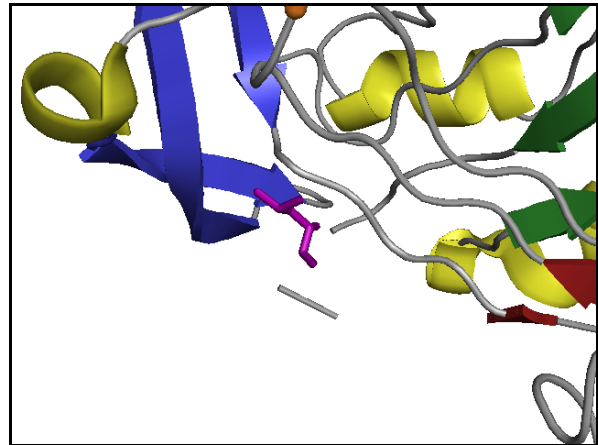
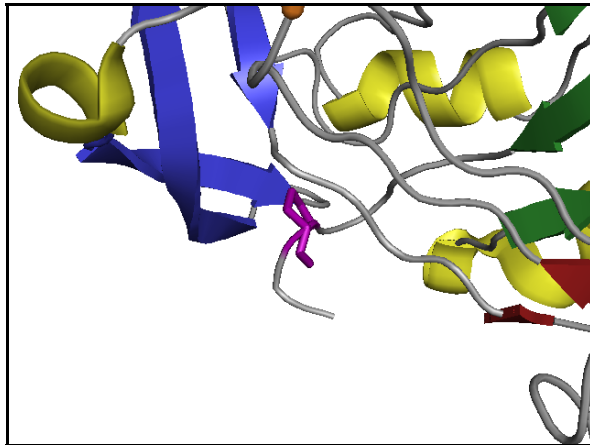
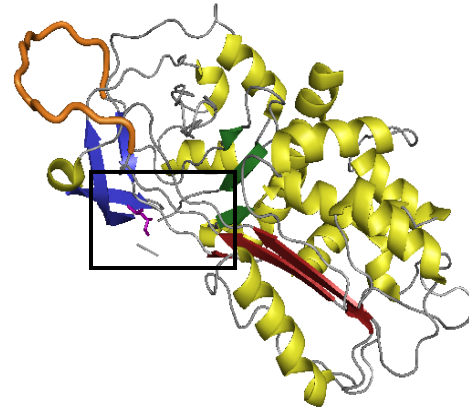
- Aktivität ~ 100 %
- **Deutliche Auswirkung im Modell, obwohl V458M ein natürlich vorkommender Polymorphismus ist**

## Mutation P476L

C1-INH WT



C1-INH P476L



- Aktivität < 10 %
- Substitution heterozyklischer AS durch aliphatische
- Homologie zwischen Spezies sehr hoch
- Befindet sich nach  $\beta$ -Faltblatt B am Ende des Moleküls
- Eldering (Eldering et al., 1995) postuliert, dass Mutation P476S zu Multimerisierung des C1-INH führt
- **Deutliche Auswirkung im Modell**

	R444G		V458M	V458G		P476L					
H	SAISVA	R	TLL	VFEVQQ	PFLF	VLWDQQ	QHKFP	VFMGRVYD	P	R	A
P	SAISVA	R	TLL	IFEVQQ	PFLF	VLWDQQ	QHKFP	VFMGRVYD	P	R	A
M	SAISFG	R	SLP	IFEVQR	PFLF	LLWDQQ	QHRFP	VFMGRVYD	P	R	G
B	SVVSVA	R	NLL	LFEVQQ	PFLF	LLWDQQ	QHKFP	VFMGRVYD	P	K	G
T	TSVSFS	R	TYI	SFSALQ	PFVF	LLWSDQ	ANVP	LFVGRVID	P		
G	MATSLA	R	IAL	QLEALQ	PFLF	VLWDEG	NAIP	LFMGRVYD	P	Q	A

## 7 Posterpräsentationen und Vorträge

### 7.1 Posterpräsentationen

Förster T, Oldenburg J, Müller C.R.

**Recombinant expression and 3-D modell of C1-Inhibitor protein variants**

17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e. V., **2006**, Heidelberg

Förster T, Oldenburg J, Müller C.R

**Recombinant expression and 3-D modelling of C1-Inhibitor protein variants**

European Human Genetics Conference **2006**, Amsterdam

Förster T, Kocot A, Schröder J, Kreuz W, Aygören-Pürsün E, Martinez-Saguer I, Müller CR, Oldenburg J

**Recombinant Expression of the C1-Inhibitor Protein in Human Cells**

16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e. V, **2005**, Halle

T. Förster, W. Kreuz, I. Martinez-Saguer, E. Aygören-Pürsün, C.R. Müller, J. Oldenburg

**Expression analysis of C1-Inhibitor mutants confirms causality of missense mutations for Hereditary Angioedema**

4th C1-INH Deficiency Workshop, **2005**, Budapest (Ungarn)

Förster T, Müller C.R., Oldenburg J

**Expression Analysis of C1-Inhibitor Mutants Confirms Causality of Missense Mutations for Hereditary Angioedema**

36. Hämophilie-Symposion **2005**, Hamburg

Förster T, Kocot A, Schröder J, Aygören-Pürsün E, Martinez-Saguer I, Kreuz W, Bork K, Scharrer I, Müller C.R, Oldenburg J

**Mutation analysis in Hereditary Angioedema identifies patients at risk for developing acute and life threatening edema**

European Human Genetics Conference **2004**, München

Förster T, Kocot A, Schröder J, Aygören-Pürsün E, Martinez-Saguer I, Kreuz W, Bork K, Scharrer I, Müller C.R, Oldenburg J

**Mutation analysis in Hereditary Angioedema identifies patients at risk for developing acute and life threatening edema**

Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (GTH) Kongress **2004**, Hamburg

Förster T, Kocot A, Schröder J, Aygören-Pürsün E, Martinez-Saguer I, Kreuz W, Bork K, Scharrer I, Müller C.R, Oldenburg J

**Mutation Analysis of the C1 inhibitor gene**

34. Hämophilie-Symposion **2003**, Hamburg

Förster, Tanja, Guttenbach, M., Müller, C.R., Oldenburg. J

**FISH for carrier detection of large deletions in the Factor VIII gene**

33. Hämophilie-Symposion **2002**, Hamburg

## **7.2 Vorträge**

### **Mutation analysis of patients with Hereditary Angioedema in Germany**

4th C1-INH Deficiency Workshop, **2005**, Budapest (Ungarn)

und Einsatz als Chairperson

### **Expression Analysis of C1-Inhibitor Mutants Confirms Causality of Missense Mutations for Hereditary Angioedema**

35. Hämophilie-Symposion **2004**, Hamburg

### **Mutation analysis in the C1-inhibitor gene**

3th C1-INH Deficiency Workshop, **2003**, Budapest (Ungarn)

### **Molekulargenetik des hereditären Angioödems**

8. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Angioödeme e.V **2003**, Mainz



## 8 Curriculum Vitae

**TANJA ROSA-MARIA FÖRSTER**

DIPLOM-BIOLOGIN

GEBOREN AM 03.10.1975 IN HAMMELBURG

---

### SCHUL- UND BERUFSAUSBILDUNG

- 1988-1992 Realschule Hammelburg  
Abschluss: *Mittlere Reife*
- 1992-1995 Ausbildung zur Chemielaborantin  
Institut Dr. Nuss, Institut für Wasser-, Umwelts- und Qualitätskontrolle  
Bad Kissingen  
Abschluss: *Gesellenbrief*
- 1995-1997 Berufsoberschule-Technik-  
Franz-Oberthür-Schule, Würzburg  
Abschluss: *Allgemeine Hochschulreife*

---

### STUDIUM UND PROMOTION

- 1997-1999 Grundstudium Biologie  
Universität Würzburg
- 1999-2001 Hauptstudium Biologie  
Universität Würzburg  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Humangenetik, Biochemie
- 2001-2002 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, Universität Würzburg  
Thema: *Detektion von Mikrodeletionen und Inversionen des Faktor VIII Gens*
- 2002-2006 Doktorarbeit am Institut für Humangenetik, Universität Würzburg  
Thema: *Molekulargenetik des Hereditären Angioödems*
-

## Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. **Clemens Müller-Reible** für die Möglichkeit die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für die Bereitstellung des Themas, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die tatkräftige Unterstützung und Hilfe am Fortgang dieser Arbeit.

Vielen Dank an Prof. Dr. **Johannes Oldenburg**, der mich schon als studentische Hilfskraft in die Arbeitsgruppe geholt und die Doktorarbeit engagiert betreut hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. **Jörg Schulz** für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation.

Ein ganz großes Dankeschön an **Simone Rost** und **Andreas Fregin**, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, und mich immer wieder aufgebaut haben, wenn mal was nicht so funktionierte, wie es sollte.

Natürlich bedanke ich mich auch bei den „Mädels aus 302“ **Simone Löffler**, **Gitta Endres** und **Katja Schrooten**, die immer Zeit für einen kleinen Plausch hatten und mit denen interessante Themen ausgiebig diskutiert wurden.

Weiterhin bedanke ich mich natürlich beim Rest der Arbeitsgruppe, die für das tolle Arbeitsklima beigetragen haben.

Ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie, meine **Mutter** und meinen Bruder **Matthias** und vor allem an meinen Freund **Oliver**, der mir immer bei technischen Schwierigkeiten geholfen und nie die Geduld mit mir verloren hat.