

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Höhn

Genetische Diagnostik bei Hämophilie A
und Hereditärem Angioödem:
eine retrospektive Studie

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Frieder Gauß

aus Stuttgart

Würzburg, November 2009

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2010

Der Promovend ist Arzt

Für meine Liebste, Julia

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Hämophilie A	1
1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund	1
1.1.2 Klinisches Bild	1
1.1.3 Therapie	2
1.1.4 Genetische Ursachen	3
1.2 Hereditäres Angioödem I	6
1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund	6
1.2.2 Klinisches Bild	6
1.2.3 Therapie	7
1.2.4 Genetische Ursachen	8
1.3 Ziel der Arbeit	9
2 Methoden	10
2.1 Southern Blot	10
2.2 PCR	10
2.3 DGGE	11
2.4 DHPLC	12
2.5 Sequenzierung	13
3 Fallbeispiele	15
3.1 Fall: Hämophilie A	15
3.2 Fall: Hämophilie A	16
3.3 Fall: Hämophilie A	16
3.4 Fall: Hereditäres Angioödem I	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Alle untersuchten Krankheitsbilder	19
4.1.1 Gruppen der Verdachtsdiagnosen	19

4.1.2 Geographische Verteilung der einweisenden Ärzte	21
4.2 Hämophilie A	23
4.2.1 Ergebnisse von 2000 bis 2004 im Durchschnitt und Verlauf	23
4.2.2 Geographische Verteilung der einweisenden Ärzte	31
4.3 Hereditäres Angioödem I	33
4.3.1 Ergebnisse der Jahre 2000 bis 2004 im Durchschnitt und Verlauf	33
4.3.2 Geographische Verteilung der einweisenden Ärzte	41
5 Diskussion	43
5.1 Alle untersuchten Krankheitsbilder	43
5.2 Hämophilie A	43
5.2.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation	45
5.2.2 Klinische Hämophilie ohne Nachweis einer Mutation im F8-Gen	47
5.2.3 Untersuchungsmethoden, die zur Diagnose führen im nationalen und internationalen Vergleich	48
5.2.4 Therapiekonzepte und deren Erfolg	49
5.3 Hereditäres Angioödem I	51
5.3.1 Spektrum neuer Mutationen bei Hereditärem Angioödem ..	51
5.3.2 Klinisches Hereditäres Angioödem ohne Nachweis einer Mutation	53
5.3.3 Therapiekonzepte und deren Erfolg	55
5.4 Ausblick	56
6 Zusammenfassung	57
7 Abstract	59
8 Literaturverzeichnis	61

9 Anhang	67
9.1 Abkürzungsverzeichnis	67
Danksagung	
Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Hämophilie A

1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die Hämophilie A (Bluterkrankheit) ist die schwerwiegendste erbliche Blutungsstörung des Menschen. Ihre Auswirkungen sind schon seit langer Zeit bekannt. Erstmals erwähnt wurde sie im zweiten Jahrhundert n. Chr. im Talmud. Demnach mussten Jungen nicht beschnitten werden, wenn diese zwei Brüder hatten, die an den Folgen der Beschneidung verstorben waren. [1] 1952 wurden erstmals zwei Typen der Bluterkrankheit unterschieden, Hämophilie A und Hämophilie B. Beide beruhen auf einem Mangel oder dem vollständigen Fehlen von Blutgerinnungsfaktoren. [1][2][3] Bei der Hämophilie A besteht ein Mangel an Faktor VIII (F8), bei Hämophilie B an Faktor IX. [1] Die Hämophilie A wird auch als „Krankheit der Könige“ bezeichnet, da Queen Victoria von England Trägerin der Mutation war. [1][2]

Da sowohl Krankheitsbild als auch genetische Grundlagen sowie die Therapie sehr gut beschrieben sind, kann die Hämophilie A als eines der führenden Modelle für Krankheitsbilder in der humangenetischen Medizin angesehen werden.

1.1.2 Klinisches Bild

Die Hämophilie A betrifft einen von 5000 Männern pro Jahr, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen Bevölkerungsgruppen gibt. [1][4] Wahrscheinlich ist die weltweite Zahl der Betroffenen höher, da in den Entwicklungsländern derzeit nicht alle Fälle diagnostiziert werden können. Somit ist die Hämophilie A eine der

bekanntesten Erbkrankheiten.

Beim Gesunden findet sich im Blut ein Plasmaspiegel von ca. 100 bis 200 mg/dl F8. [5] Eine Verminderung der Aktivität des F8 durch eine Mutation führt zur Verschlechterung der Blutgerinnungsaktivität und dadurch zu unkontrollierten Blutungen in Gelenke, Muskeln oder innere Organe. Immer wiederkehrende Blutungen in Gelenke haben chronische Gelenkentzündungen zur Folge. In Entwicklungsländern sind Blutungen im Gehirn bei Hämophilie A-Patienten die häufigsten Todesursachen. Des weiteren stellen sie dort beinahe 20% aller nicht-infektiösen Todesursachen dar. [1]

In Abhängigkeit von der Restaktivität des F8 werden eine milde, eine mäßige und eine schwere Form der Erkrankung unterschieden. 50% der Betroffenen leiden an der milden Form, bei der eine Restaktivität des F8 von 5-30% besteht, 10% an der mäßigen Form, bei der eine Restaktivität von 2-5% besteht und 40% an der schweren Form mit einer Restaktivität von unter 1%. [1][6] Die Restaktivität des F8 bei weiblichen Überträgerinnen ist normalerweise etwa 50%. Allerdings kann die Aktivität in manchen Fällen pathologische Werte erreichen, was sich dann in Form von starken Blutungen bei der Menstruation manifestiert. Homozygote Trägerinnen sind zwar selten, leiden aber in ähnlicher Form wie hemizygoten männlichen Träger. [1]

1.1.3 Therapie

Der zur Behandlung eingesetzte F8 wurde 1983 erstmals aus Blut isoliert. [1] Leider waren die F8-Konzentrate, die in den 1980er Jahren zur intravenösen Therapie eingesetzt wurden häufig mit HIV infiziert. Jedoch wurde mit der Entdeckung des F8-Gens 1984 eine Therapie mit dem rekombinanten F8 seit 1993 möglich, welche heute zum Standard gehört. [1]

Durch die starke Zunahme an diagnostizierten Fällen gibt es inzwischen eine Fülle von Informationen über verschiedene Allele für F8. Weltweit gibt es zur Zeit über 940 einzelne Mutationen unterschiedlicher Art, die in einer Datenbank gesammelt werden. [1] Das größte Problem bei der Substitutionstherapie ist die Bildung von so genannten Hemmkörpern, die den Effekt des substituierten F8 fast vollständig aufheben können. Bei schweren Verlaufsformen wie Stop-Mutationen, großen Deletionen und intrachromosomalen Rekombinationen bilden sich in 20-80% der Fälle Hemmkörper. Bei milden und moderaten Formen treten in 5% der Fälle Hemmkörper auf, vor allem bei Missense-Mutationen (Austausch einer Aminosäure). [7]

Bei milden Verlaufsformen besteht die Möglichkeit der Behandlung mit DDAVP (1-desamino-8-d-arginine vasopressin) [8], einem Analogon des natürlichen antidiuretischen Hormons Vasopressin, welches zu einer erhöhten Freisetzung von F8 führt. Selten kam es bei vorwiegend älteren Patienten mit Atherosklerose unter dieser Therapie zu Herzinfarkten und Schlaganfällen. Bei älteren Patienten sollte DDAVP daher nur mit besonderer Vorsicht eingesetzt werden. [9]

1.1.4 Genetische Ursachen

Das menschliche F8-Gen liegt auf dem distalsten Abschnitt des langen Arms des X-Chromosoms. [3][10] Das Gen ist 168 kb lang und beinhaltet 26 Exons. Es kodiert für ein Vorläuferprotein, bestehend aus 2351 Aminosäuren, von dem 19 N-terminale Reste des Signalpeptids abgespalten werden, um das fertige funktionstüchtige Produkt herzustellen. [1]

Sechs Introns des menschlichen F8-Gens sind außergewöhnlich groß. Intron 1 und Intron 22 sind hervorzuheben, da diese häufig in

pathologische Inversionen verwickelt sind. Grund hierfür ist die Rekombination mit entsprechender Regionen außerhalb des F8-Gens. [1]

Intron 22 des F8-Gens enthält zwei verschachtelte Gene, F8A und F8B, die durch einen bidirektionalen Promotor gesteuert werden. Die Region, die F8A enthält, wird als int22h1 bezeichnet. Zusätzlich gibt es ungefähr 500 kb in Richtung der Telomere zwei Regionen, int22h2 und int22h3, die int22h1 zu 99,9% entsprechen. Kommt es zu einer Rekombination von int22h1 und einer dieser Regionen, führt dies zu einer Inversion der entsprechenden Teile des F8-Gens. Diese Inversion ist in Abbildung 1 dargestellt. Sie ist in ungefähr 35% der Hämophilie A Fälle ursächlich und führt zu einer schweren Verlaufsform. [1]

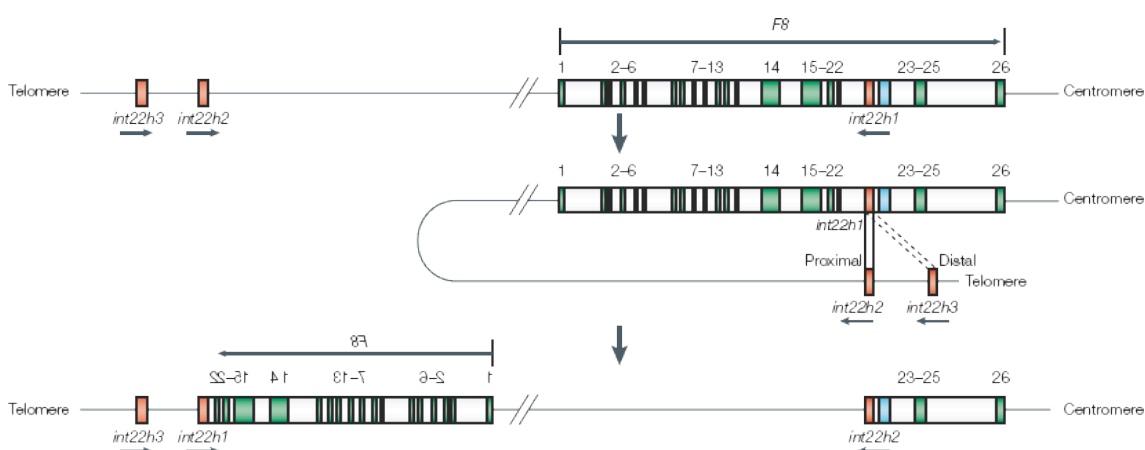


Abbildung 1: Intron 22 Inversion [1]

Die Region, die int1h1 des Intron 1 entspricht, liegt ebenfalls in Richtung der Telomere, jedoch ungefähr 140 kb entfernt vom F8-Gen und wird als int1h2 bezeichnet. Sie unterscheidet sich nur in einem einzigen Nukleotid von int1h1. Die Rekombination dieser Regionen verlagert Exon 1 des F8-Gens in Richtung der Telomere. Diese Inversion ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie ist bei ungefähr 1% der

Patienten mit Hämophilie A zu finden und führt ebenfalls zu einer schweren Verlaufsform. [1]

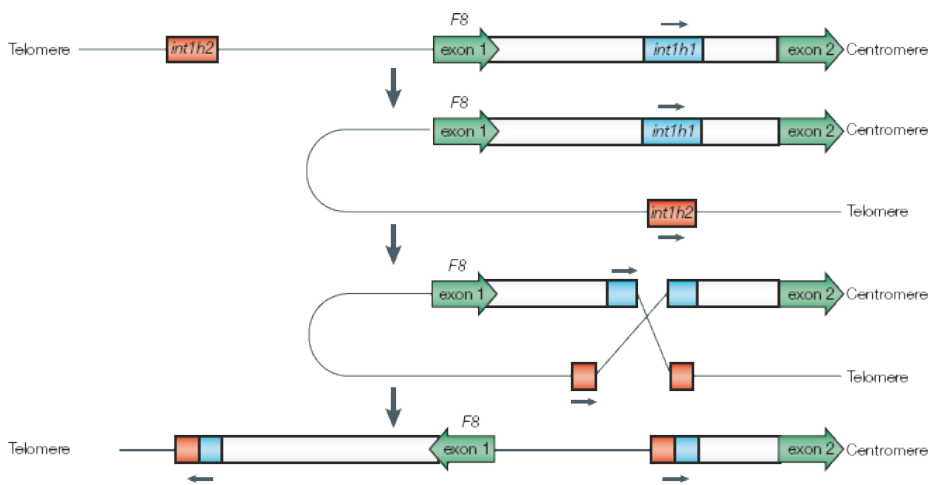


Abbildung 2: Intron 1 Inversion [1]

Bevorzugt an CpG Dinucleotiden kommt es häufig zu Punktmutationen. Vier von sechs Arginin-Codons enthalten CpG Dinucleotide, was erklärt, warum Arginin am häufigsten mutiert. In den meisten Fällen kommt es zu Missense-Mutationen. [1] Diese mäßigen bis milden Formen sind für die meisten Erkrankungen ursächlich. [11] Schwere Formen werden durch die Entstehung eines Stop-Kodons hervorgerufen. [1]

Andere häufige Mutationen sind kleine Deletionen oder Insertionen. Diese führen zu Verschiebungen des Leserasters bei der Translation und damit zu schweren Formen der Hämophilie A. Deletionen über 50 bp sind große Deletionen. Auf weitere seltene Mutationen soll hier nicht weiter eingegangen werden. [1]

In einigen wenigen Fällen mäßiger und milder Formen konnte selbst mit den hochsensitiven Methoden wie DHPLC, DGGE oder Sequenzierung keine ursächliche Mutation gefunden werden. [3][12]

1.2 Hereditäres Angioödem I

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die Krankheit Hereditäres Angioödem (HAE) ist seit über 100 Jahren bekannt. In den letzten 40 Jahren wurden die klinischen Zeichen und Symptome herausgearbeitet, das teilweise Fehlen des C1-Inhibitors bzw. eine unzureichende Funktion des selben wurde als Ursache für die Krankheit identifiziert, die Pathophysiologie beschrieben, und es wurden große Schritte in der Behandlung erzielt. [13] C1-Inhibitor ist ein Protein zur Hemmung des Komplementsystems. Es werden zwei verschiedenen Formen des HAE unterschieden. 85% der Patienten leiden am Typ I, bei dem ein Mangel an C1-Inhibitor vorliegt. Bei 15% der Patienten ist die Funktion des C1-Inhibitor gestört. Hierbei ist die Menge an C1-Inhibitor normal oder sogar erhöht. [14]

Patienten mit C1-Inhibitor-Mangel steht nicht genügend funktionsfähiges Protein zur Verfügung, um über die Maßen bei körperlichem oder psychischem Stress entstehende Entzündungsprozesse zu kontrollieren. Das Komplementsystem wird aktiviert, und große Mengen an Bradykinin werden produziert, welches wahrscheinlich für die Ödembildung verantwortlich ist. [15] [16]

1.2.2 Klinisches Bild

Das Hereditäre Angioödem betrifft zwischen einem von 10000 und einem von 50000 Menschen. [15][16] Beim Gesunden findet sich ein Plasmaspiegel von 15 bis 35 mg/dl C1-Inhibitor. Auch in den asymptomatischen Intervallen ist beim Typ I der Plasmakonzentration um bis zu 50% vermindert. Während einer Attacke kann der C1-Inhibitor-Spiegel noch weiter absinken. [14]

Das Hereditäre Angioödem ist gekennzeichnet durch phasenweise auftretende scharf begrenzte Ödeme, meist an den Extremitäten, kann allerdings jede Körperregion betreffen. Attacken dauern häufig um die drei Tage und verlaufen gewöhnlich ohne Erythem, Juckreiz oder Urticaria. Manche Patienten bemerken, meist am Anfang der Attacke, ein Erythema marginatum, das sie als Kreise auf der Haut beschreiben. Zusätzlich klagen Patienten häufig über Bauchschmerzen aufgrund der Schleimhautschwellung im Magen-Darm-Trakt, die gleichzeitig mit den peripheren Ödemen, Durchfall und Erbrechen einhergehen können. [13][15] Zwischen den Attacken ist der Magen-Darm-Trakt schmerzfrei. Es wurde berichtet, dass die Schwellung Invaginationen verursacht hat, die jedoch konventionell behandelt werden konnten. In sehr seltenen Fällen gibt es Patienten, die Schmerzen außerhalb der Ödembildung haben, was die Diagnose erschwert. Wenn die Ödeme in den Luftwegen auftreten, kann die Erkrankung tödlich sein. Die Patienten berichten oft von Betroffenen in der Familie, die erstickt waren. [13] Obwohl die Krankheit normalerweise im Kindesalter mild und viel schwerer ab der Pubertät verläuft, wird die Diagnose immer häufiger im Kindesalter gestellt, so dass die Erkrankung immer mehr Aufmerksamkeit gewinnt. Tatsächlich werden die Attacken in der Pubertät bei Jungen und Mädchen viel heftiger. Bei manchen Frauen treten die Attacken sogar ausschließlich während der Menstruation auf. Auch die Gabe von Östrogen verschlimmert die Krankheit deutlich. Weiterhin können ACE-Hemmer zum Ausbruch der Erkrankung führen. [13]

1.2.3 Therapie

1960 wurden erste Versuche zur Therapie des Hereditären Angioödems mit Testosteron unternommen. Androgene steigern die

Synthese von C1-Inhibitor in der Leber. [14] Heute weiß man, dass Androgene zwar eine längerfristige Prophylaxe bieten, jedoch für eine akute Attacke nicht effektiv sind. Schwierigkeiten gibt es auch bei der Behandlung von Kindern, da Androgene die körperliche Entwicklung beeinflussen und den Schluss der Epiphysenfugen fördern. Auch in der Schwangerschaft sind Androgene nicht zu empfehlen. [13]

C1-Inhibitor-Infusionen, die aus gespendetem Blut gewonnen werden können, konnten in vielen Studien eine Attacke beenden. Die Wirkung setzte meistens innerhalb von 30-90 Minuten ein. [15] Die Therapie mit einem rekombinanten C1-Inhibitor ist zur Zeit in der klinischen Erprobung. [13]

Ein Kallikrein-Antagonist wird ebenfalls getestet. Dadurch wird die Bildung von Bradykinin gehemmt. Auch Bradykinin-Rezeptoren direkt zu antagonisieren wird demnächst getestet. Diese Studien scheinen sehr vielversprechend zu sein. [13]

1.2.4 Genetische Ursachen

Ursache für das Hereditäre Angioödem ist ein Mangel an intaktem C1-Inhibitor. 85% der Patienten leiden am Typ I der Erkrankung, bei dem ein Mangel an C1-Inhibitor vorliegt. Bei 15% der Patienten ist die Funktion des C1-Inhibitor gestört. Hierbei ist die Menge an C1-Inhibitor normal oder sogar erhöht. [14] Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt. [13][16][17] Alle Patienten mit dieser Erkrankung, sind heterozygot. Es wurde kein Patient mit komplettem Fehlen des C1-Inhibitors beschrieben. Wie bei vielen autosomal dominant vererbten Erkrankungen, sind Neumutationen häufig und eine leere Familienanamnese nicht selten. 1986 wurde das Gen auf Chromosom 11 entdeckt und eine große Vielfalt von krankheitsverursachenden Deletionen, Translokationen, Stop-Kodons

und Punktmutationen sind beschrieben. [13] Neuerdings gibt es jedoch klinische Fälle, in denen kein Mangel an funktionierendem C1-Inhibitor vorliegt. [18]

1.3 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll für den Zeitraum von 2000 bis 2004 überprüft werden, wie viele Patienten am Institut für Humangenetik Würzburg auf bestimmte Genveränderungen untersucht wurden, welche Untersuchungsmethoden am häufigsten zur Diagnose geführt haben, wie sich das Durchschnittsalter der Patienten entwickelt hat und aus welchen Großräumen in Deutschland die Patienten an das Institut für Humangenetik Würzburg zur Untersuchung überwiesen wurden. Untersucht wurden mehrere Gruppen von Krankheitsbildern. Hier soll im wesentlichen auf die Gruppe der Gerinnungsstörungen eingegangen werden. Auf der Grundlage dieser Erhebung sollen Empfehlungen für die Weiterführung der Diagnostik gegeben werden.

2 Methoden

2.1 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine molekularbiologische Untersuchungsmethode zum Nachweis von Gensequenzen eines DNA-Abschnitts, ohne alle Sequenzen des Genoms zu entschlüsseln.

Durch die Behandlung mit Restriktionsenzymen wird die DNA geschnitten. Die DNA-Stücke werden anschließend mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Fragmente werden durch Alkalien in Einzelstränge gespalten und auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran geblotet und das entstandene Trennmuster auf diese Weise fixiert.

Mit einer chemisch oder radioaktiv markierten komplementären Gensonde aus einzelsträngiger DNA, die eine feste Bindung mit den DNA-Fragmenten eingeht, werden diese hybridisiert.

Nach dem Abwaschen aller übrigen unspezifischen Bindungen erfolgt die Detektion durch Auflegen der Membran auf einen Röntgenfilm, Fotopapier oder Phospho-Imager-Platten.

2.2 PCR

Bei der Methode der PCR (polymerase chain reaction) handelt es sich um eine in vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen flankiert werden, amplifizieren kann. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94°C in ihre Einzelstränge überführt, was als Denaturierung bezeichnet wird. Als Starthilfe für die Vervielfältigung der DNA benötigt man zwei Oligonukleotidprimer, kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten DNA-Sequenz sind und jeweils mit einem der beiden Stränge der DNA-

Matrize hybridisieren. Die Anlagerung der beiden Oligonukleotide wird als Annealing bezeichnet und erfordert eine für die jeweiligen Primer spezifische Temperatur, welche meist zwischen 50°C und 60°C liegt.

Hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien, wie die häufig benutzte Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, verlängern in Gegenwart von Desoxynukleotiden die Primer entlang der einzelsträngigen Matrize und synthetisieren so den komplementären Strang des gewünschten DNA-Abschnittes. Die Elongation erfolgt bei einer Temperatur von 72°C, die für die Taq-Polymerase spezifisch ist.

Die Reaktionsbedingungen für eine Standard-PCR sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

first delay	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	40 sec	30 Zyklen
Annealing	primerspezifisch	40 sec	
Elongation	72°C	40 sec	
last delay	72°C	4 min	

Tabelle 1: PCR-Bedingungen

2.3 DGGE

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) stellt eine Screeningmethode zur Detektion von Punktmutationen dar. Zunächst werden GC-Klammern am 3'-Ende der DNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden auf ein Polyacrylamidgel mit einem denaturierenden Gradienten wie Harnstoff oder Formamid aufgetragen. Dabei bricht die DNA unregelmäßig auf. Die CG-Klammern verhindern das komplette Auseinanderbrechen der beiden Einzelstränge, so dass verschiedene Schmelzdomänen entstehen. Die Schmelzdomänen denaturieren in Abhängigkeit von der

Konzentration des denaturierenden Stoffes und ihrer spezifischen Basenabfolge unterschiedlich. In der anschließenden Elektrophorese wandern die aufgebrochenen DNA-Moleküle langsamer als die übrigen durch das Polyacrylamidgel. Liegt eine Punktmutation vor, so ändert sich die Schmelzeigenschaft der Domäne und damit die zum Aufbruch notwendige Konzentration des denaturierenden Stoffes und letztlich die Geschwindigkeit in der Elektrophorese. Durch die anschließende Silberfärbung wird das Ergebnis sichtbar. DNA-Fragmente mit nur einer unterschiedlichen Base lassen sich mit dieser Methode differenzieren. Der Vergleich der Banden von Wildtyp und Probe bestätigen eine Punktmutation oder schließen diese aus.

2.4 DHPLC

Die Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC, denaturing high performance liquid chromatography) stellt eine hochempfindliche und vollautomatisierte Analyseverfahren zur Detektion von Mutationen dar. Grundlage für diese Methode ist die Tatsache, dass doppelsträngige (ds)DNA-Fragmente, welche Basenfehlpaarungen enthalten, Heteroduplexe ausbilden.

TEA- (Triethylammonium) Kationen fungieren während der Analyse als Brückenmoleküle, indem sie mit der negativ geladenen DNA einerseits und mit der hydrophoben Oberfläche einer polymeren Trennmatrix andererseits Wechselwirkungen eingehen. Die dsDNA wird im Laufe der Analyse durch eine steigende Acetonitrilkonzentration von der Matrix eluiert. Der angewendete Acetonitrilgradient ist abhängig von der Fragmentgröße und wird für jedes untersuchte Fragment individuell bestimmt. Eine weitere wichtige Komponente dieser Methode ist die Denaturierungstemperatur, bei der sich dsDNA-Fragmente in

Einzelstränge auftrennen. Da Einzelstränge bzw. teilweise denaturierte Fragmente früher eluieren als Doppelstränge, können die durch De- und Renaturierung entstandenen Heteroduplices von den Homoduplices getrennt werden. Die Detektion der eluierten Fragmente erfolgt mittels UV-Licht. Die Unterscheidung zwischen Hetero- und Homoduplices erfolgt aufgrund unterschiedlicher Retentionsprofile, in denen die UV-Intensität (mV) gegen die Retentionszeit (min) aufgetragen ist. Ein Peak repräsentiert dabei den Zeitpunkt der Elution.

2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs der DNA nach dem Einbau von Didesoxynukleotiden. Hierbei sind zusätzlich zu den normalen Desoxynukleotiden basenspezifische Didesoxynukleotide im Ansatz vorhanden. Diesen fehlt im Gegensatz zu den Desoxynukleotiden die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoff. Deshalb kann ein Didesoxynukleotid nach Bindung mit seinem 5'-Kohlenstoff an die wachsende DNA-Kette keine Phosphodiesterbindung an seinem 3'-Kohlenstoffatom ausbilden, wodurch die DNA-Synthese abgebrochen wird.

Es werden parallel vier basenspezifische Reaktionen durchgeführt, wobei jeder Ansatz vier Desoxynukleotide und eine geringe Menge an einem der vier Didesoxynukleotide enthält. Da die Konzentration der Didesoxynukleotide im Vergleich zu den Desoxynukleotiden geringer ist, kommt es nur teilweise zum Kettenabbruch. Auf diese Weise entstehen DNA-Fragmente verschiedener Größen, die das gleiche, durch den Primer festgelegte 5'-Ende, aber variable 3'-Enden besitzen, was durch das jeweilige Didesoxynukleotid festgelegt ist. Die DNA-Stücke, deren Längen nur um eine einzige Base variieren können, lassen sich in einem denaturierenden PAA-

Gel auftrennen.

Die Sequenzierung nach der Didesoxymethode kann entweder mit Hilfe radioaktiv markierter Didesoxynukleotide erfolgen, was der herkömmlichen Methode entspricht, oder durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden, was eine Automatisierung des Verfahrens möglich macht, da die Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Detektors gemessen und aufgezeichnet werden können.

3 Fallbeispiele

3.1 Fall: Hämophilie A

Im März 2004 wurde eine EDTA-Blutprobe eines sechs Monate Patienten zur Faktor-8-Genanalyse in das Institut für Humangenetik Würzburg eingeschickt. Es wurde mittels PCR nach einer Intron-22-Inversion gesucht und diese bestätigt. Nun stellte sich die Frage, ob die Mutter Konduktorin der Mutation war, oder ob es sich um eine Neumutation handelte. Die PCR ergab, dass auch die Mutter heterozygote Trägerin der Mutation und somit sichere Überträgerin der Hämophilie A war. Bei der untersuchten Tante und der Großmutter konnte die gleiche Konstellation festgestellt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3 dargestellt. Die mit „?“ gekennzeichneten Familienangehörigen wurden nicht untersucht.

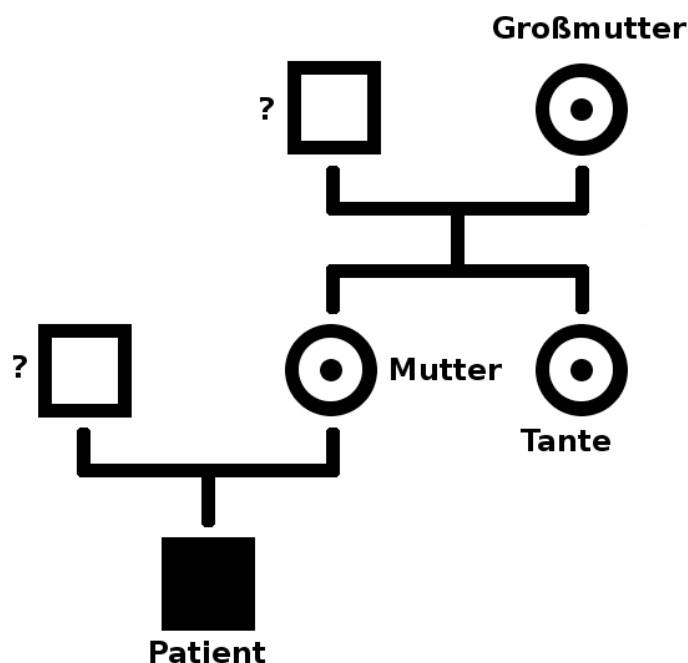


Abbildung 3: Stammbaum

3.2 Fall: Hämophilie A

Im November 2002 wurde eine EDTA-Blutprobe eines zweijährigen Patienten zur Faktor-8-Genanalyse in das Institut für Humangenetik Würzburg eingeschickt. Zunächst wurde mittels Southern Blot nach einer Intron-22-Inversion gesucht, jedoch ohne Erfolg. Die anschließende PCR bestätigte eine Intron-1-Inversion als Ursache der Hämophilie A. Nun stellte sich die Frage, ob die Mutter Konduktorin der Mutation war, oder ob es sich um eine Neumutation handelte. Die PCR ergab, dass auch die Mutter heterozygote Trägerin der Mutation und somit sichere Überträgerin der Hämophilie A war. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 4 dargestellt. Die mit „?“ gekennzeichneten Familienangehörigen wurden nicht untersucht.

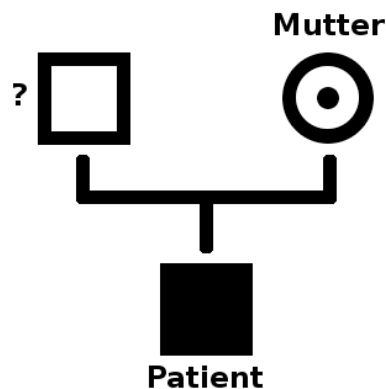


Abbildung 4: Stammbaum

3.3 Fall: Hämophilie A

Im August 2000 wurde eine EDTA-Blutprobe eines vierjährigen Patienten zur Faktor-8-Genanalyse in das Institut für Humangenetik Würzburg eingeschickt. Zunächst wurde mittels Southern Blot nach einer Intron-22-Inversion gesucht, jedoch ohne Erfolg. Auch eine

Intron-1-Inversion konnte durch eine PCR ausgeschlossen werden. Nun folgten zwei Screeningverfahren, eine DGGE und eine DHPLC. Bei der erneuten Durchführung einer DGGE zwei Jahre später ergab sich nun doch eine Auffälligkeit in Exon 16. Die Komplettssequenzierung konnte den Verdacht einer Spleißmutation IVS 15-1 G>A bestätigen. Die Mutation war in der Hämophilie-Datenbank bisher nicht vorbeschrieben. Aufgrund der Art und der Lokalisation der Mutation konnte aber davon ausgegangen werden, dass sie die Ursache der Hämophilie A darstellte. Der Patient konnte wie schon zuvor mit biotechnologisch hergestelltem Faktor 8 als Dauerprophylaxe behandelt werden. Die anschließende Untersuchung der Mutter mittels Sequenzierung ergab, dass auch die Mutter heterozygote Trägerin der Mutation und somit sichere Überträgerin der Hämophilie A war. Bei den zwei untersuchten Schwestern konnte die selbe Konstellation festgestellt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 5 dargestellt. Die mit „?“ gekennzeichneten Familienangehörigen wurden nicht untersucht.

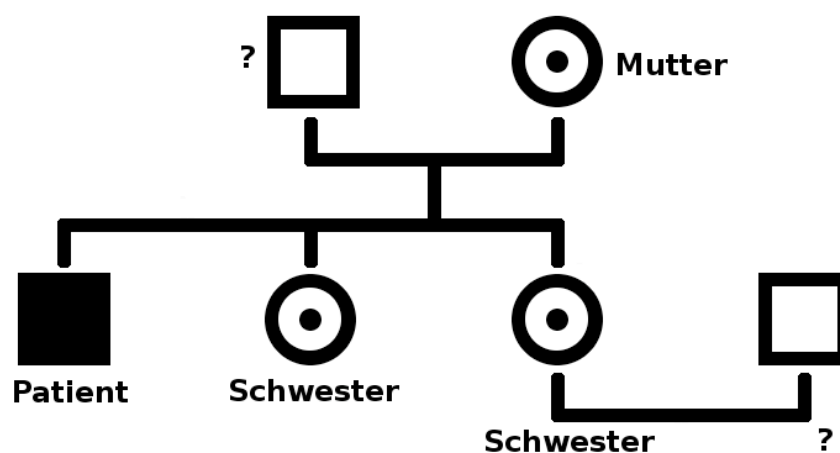


Abbildung 5: Stammbaum

3.4 Fall: Hereditäres Angioödem I

Im April 2001 wurde eine EDTA-Blutprobe einer 36-jährigen Patientin aus Frankfurt zur C1-Inhibitor-Genanalyse in das Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Würzburg eingeschickt. Zunächst wurde mittels der Screeningmethode DGGE nach Veränderungen im C1-Inhibitor-Gen gesucht. Es ergab sich eine Auffälligkeit im Exon 7. Die nachfolgende Sequenzierung zeigte die Deletion eines Adenins an der Codonposition 384 Ser(AGC). Durch die Deletion und die daraus folgende Verschiebung des Leserahmens konnte die Funktionseinschränkung des Proteins erklärt werden. Bei der nun untersuchten Tochter konnte die Deletion ebenfalls nachgewiesen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Alle untersuchten Krankheitsbilder

4.1.1 Gruppen der Verdachtsdiagnosen

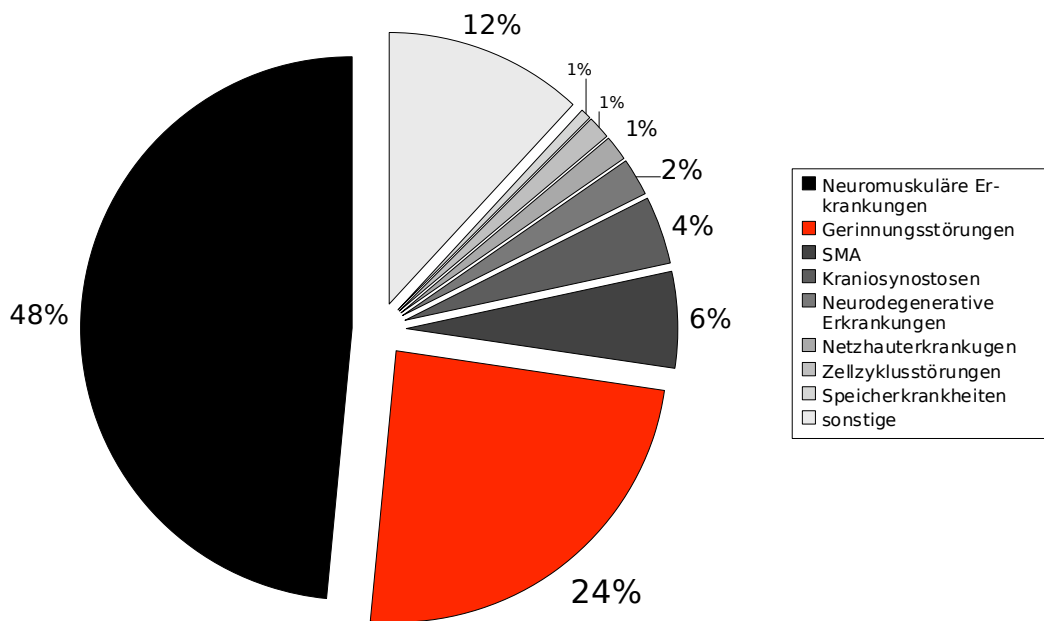


Abbildung 6: Anteil der Gerinnungsstörungen

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Gruppen von Krankheitsbildern untersucht, zu denen das Institut für Humangenetik Würzburg Genanalytik anbietet. Wie in Abbildung 6 dargestellt, sind 24% der untersuchten Krankheitsbilder Gerinnungsstörungen.

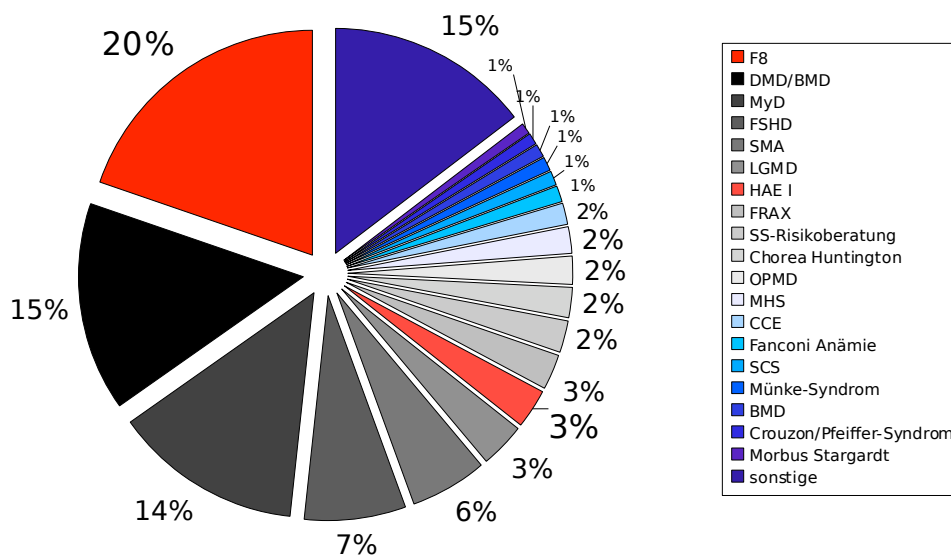


Abbildung 7: Anteil von Hämophilie und Hereditärem Angioödem

Die Anteile der einzelnen Krankheitsbilder an der Untersuchung zeigt Abbildung 7. Hämophilie A hat einen Anteil von 20% und Hereditäres Angioödem Typ I hat einen Anteil von 3%. Auf diese beiden Krankheitsbilder wird in dieser Arbeit genauer eingegangen.

4.1.2 Geographische Verteilung der einweisenden Ärzte

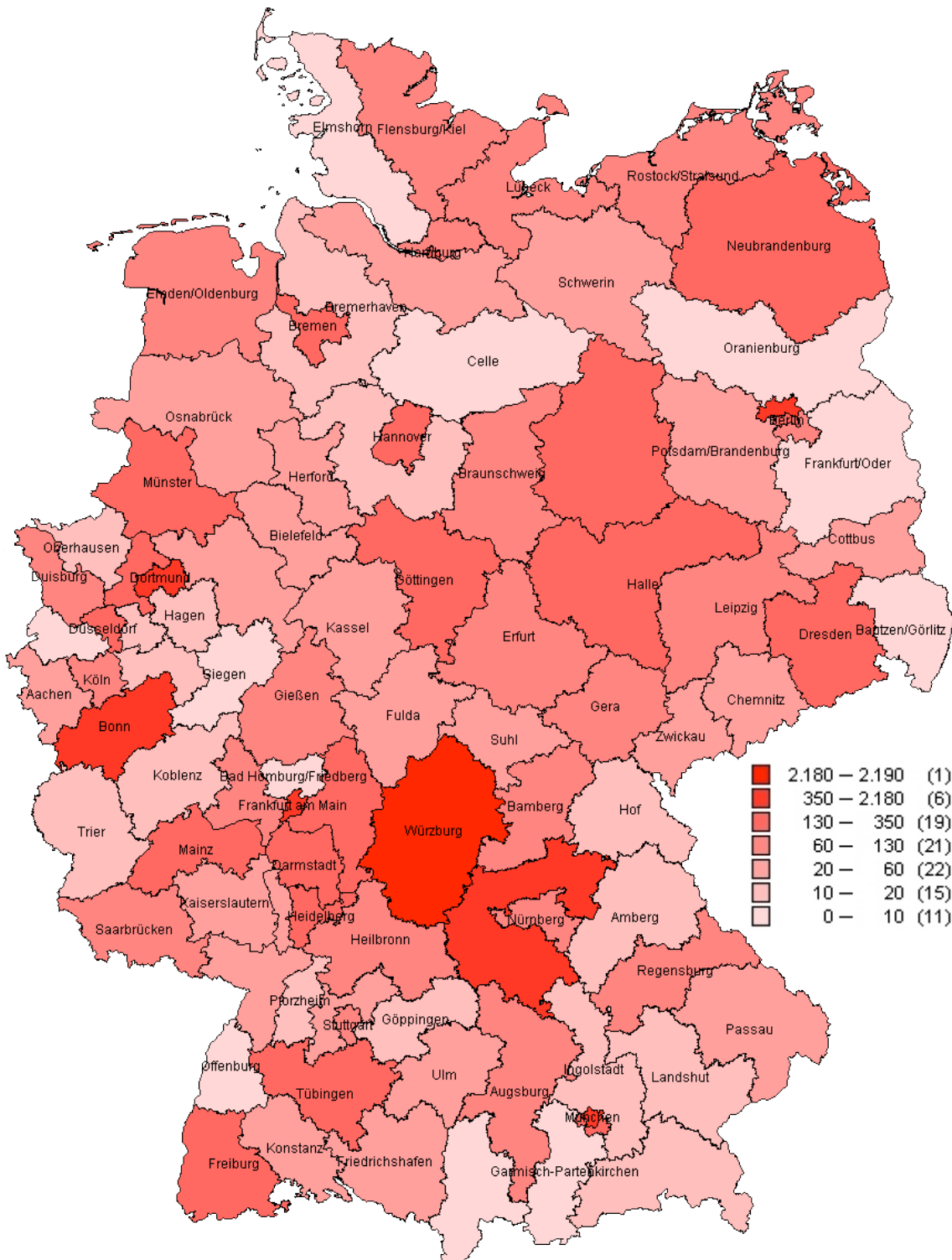


Abbildung 8: Geographische Verteilung der Verdachtsdiagnosen aller untersuchten Krankheitsbilder

Die Anfragen zur Genanalytik am Institut für Humangenetik Würzburg stammen aus den verschiedensten Gebieten Deutschlands. Abbildung 8 zeigt die Gewichtung der Einsendegebiete auf.

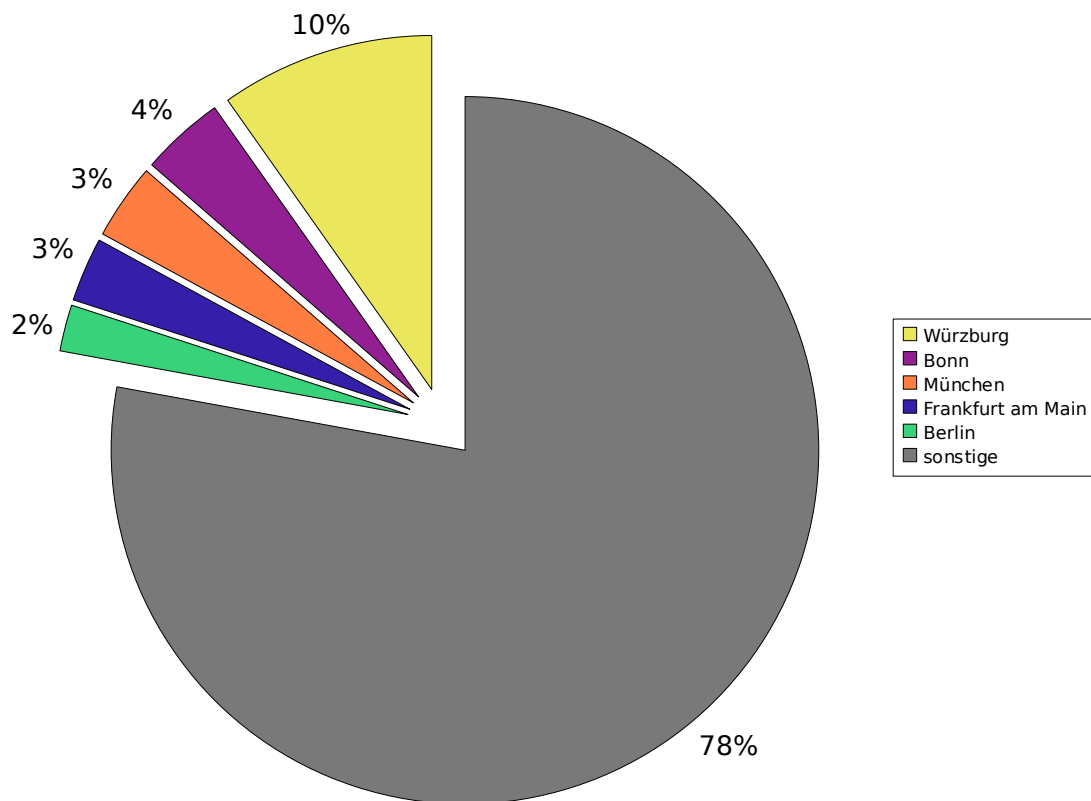


Abbildung 9: Anteil der fünf Großräume mit der höchsten Zahl an Untersuchungsanfragen

Die fünf Orte, aus denen die meisten Anfragen zur Untersuchung aller Krankheitsbilder stammen, sind in Abbildung 9 gezeigt.

4.2 Hämophilie A

4.2.1 Ergebnisse von 2000 bis 2004 im Durchschnitt und Verlauf

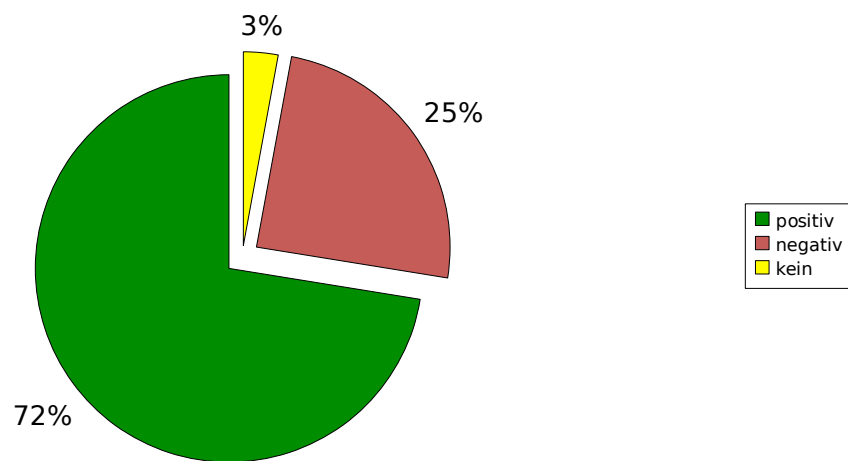


Abbildung 10: Untersuchungsergebnisse

Knapp drei Viertel der am Institut für Humangenetik Würzburg untersuchten Patienten mit klinischem Verdacht auf Hämophilie A konnte die Diagnose durch Genanalytik bestätigt werden. Dies ist in Abbildung 10 veranschaulicht.

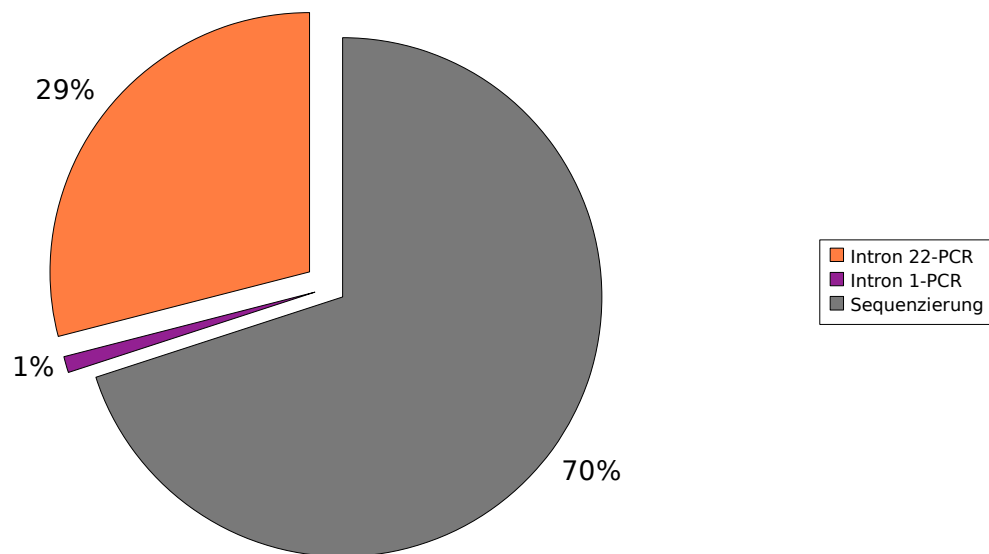


Abbildung 11: Untersuchungsmethoden mit positivem Ergebnis

In den meisten Fällen führte eine Sequenzierung zur Sicherung der Diagnose. Abbildung 11 zeigt, dass 29% der Patienten eine Intron 22 Inversion als Grundlage der Hämophilie A aufweisen, die durch eine PCR erkannt werden kann. 70% der Mutationen werden durch eine Sequenzierung erkannt.

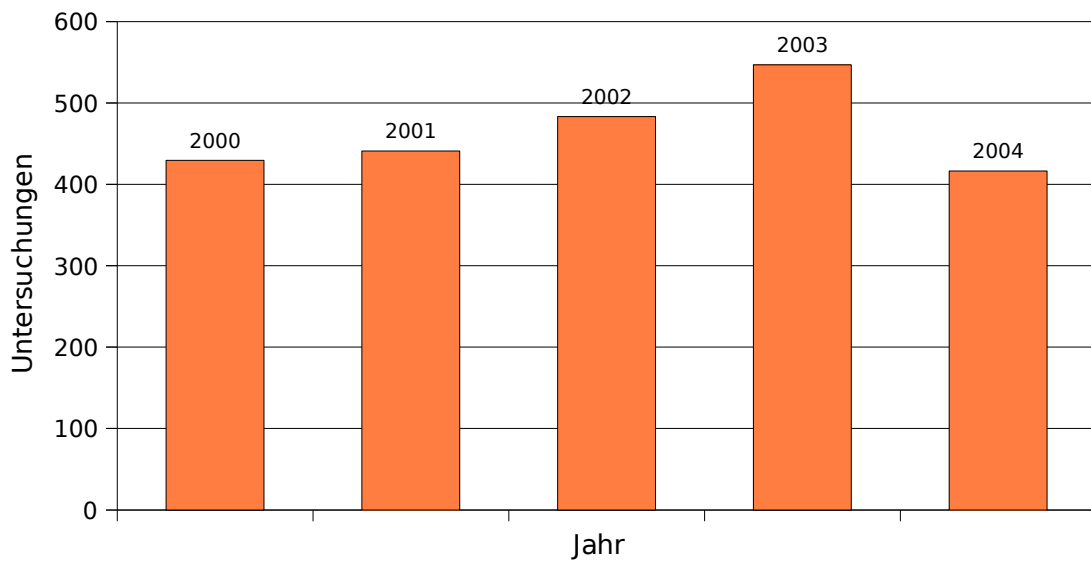


Abbildung 12: Anzahl der Untersuchungen

Wie in Abbildung 12 dargestellt steigt die Zahl der Anfragen zur Genanalytik von Hämophilie A in den Jahren 2000 bis 2003 stetig. Erst im Jahr 2004 wird ein Rückgang der Anfragen beobachtet.

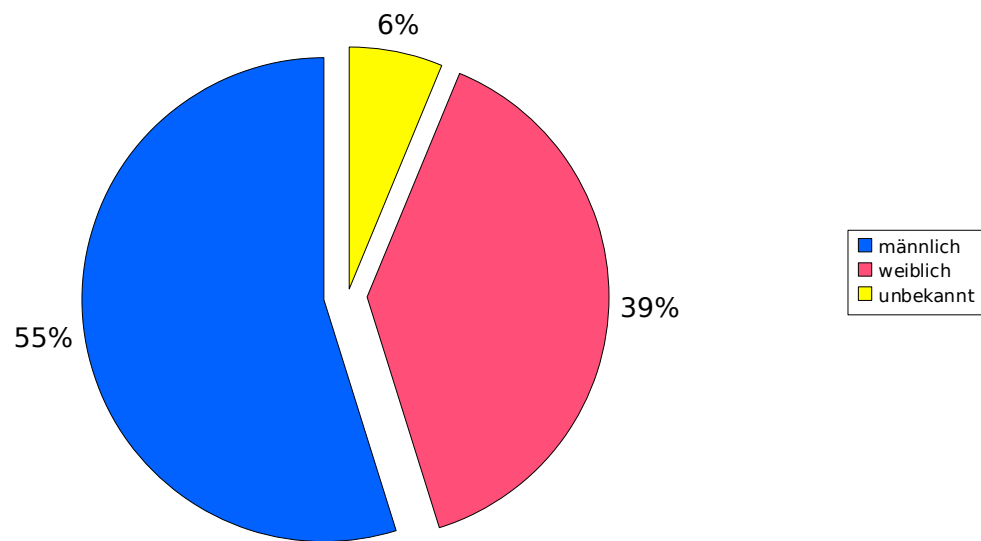


Abbildung 13: Geschlecht der untersuchten Patienten

Die meisten untersuchten Patienten sind männlich. Wie in Abbildung 13 illustriert, sind dies 55%. 39% sind weiblich, bei 6% ist das Geschlecht nicht zu eruieren.

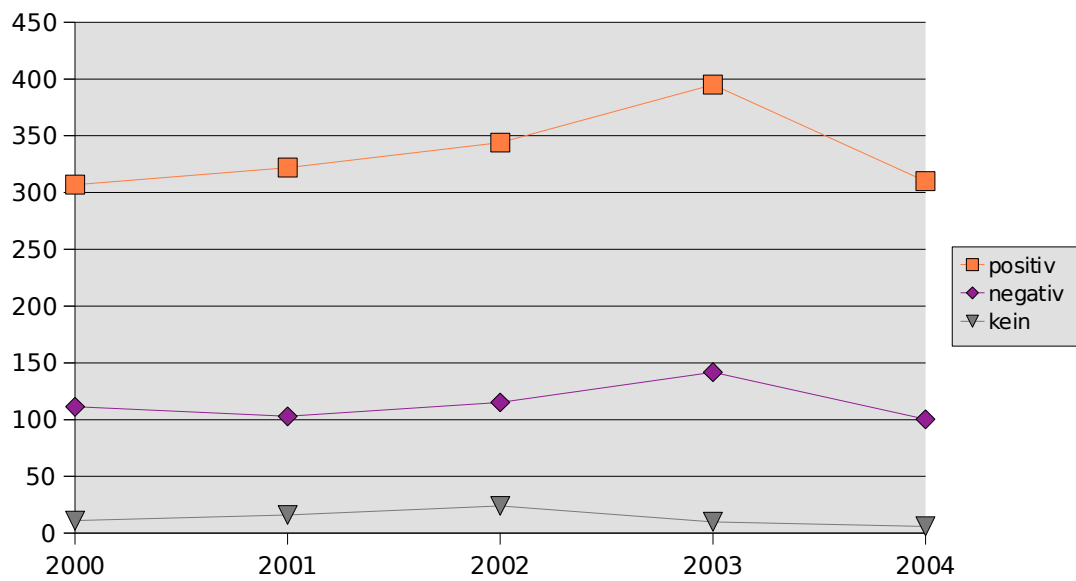


Abbildung 14: Fünfjahresüberblick der Untersuchungsergebnisse

Die Übersicht der Untersuchungsergebnisse von fünf Jahren in Abbildung 14 zeigt eine Zunahme der positiven Ergebnisse. Der klinische Verdacht einer Hämophilie A kann häufiger durch Genanalyse erklärt werden.

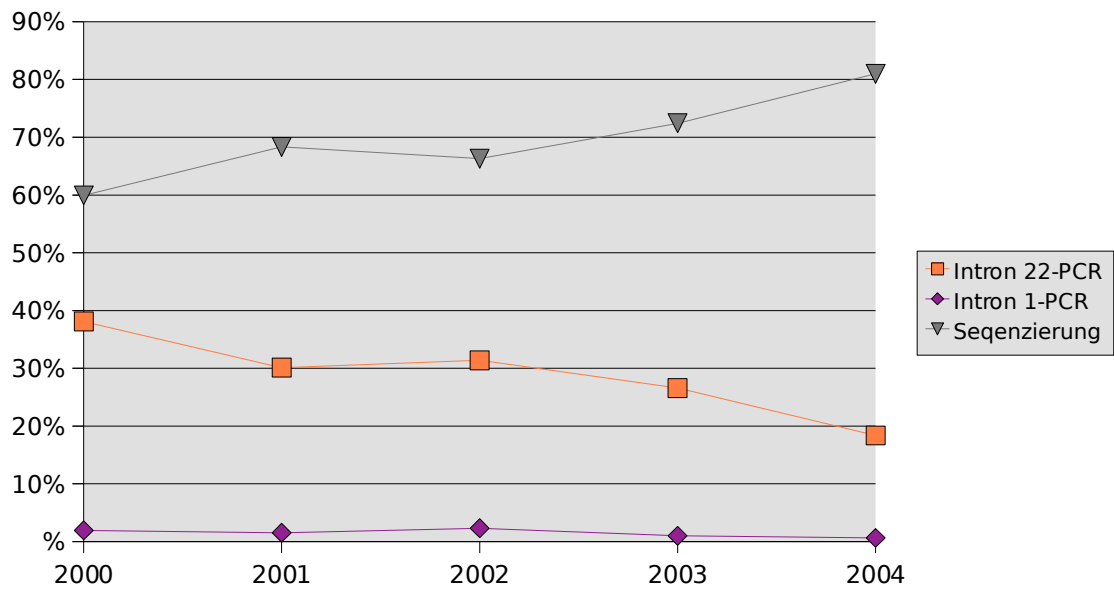


Abbildung 15: Fünfjahresüberblick der Methoden mit positivem Ergebnis

Die zu Beginn häufig detektierte Intron 22 Inversion stellt immer seltener das Endergebnis der Diagnostik dar. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, gewinnt die Sequenzierung zunehmend an diagnostischer Bedeutung.

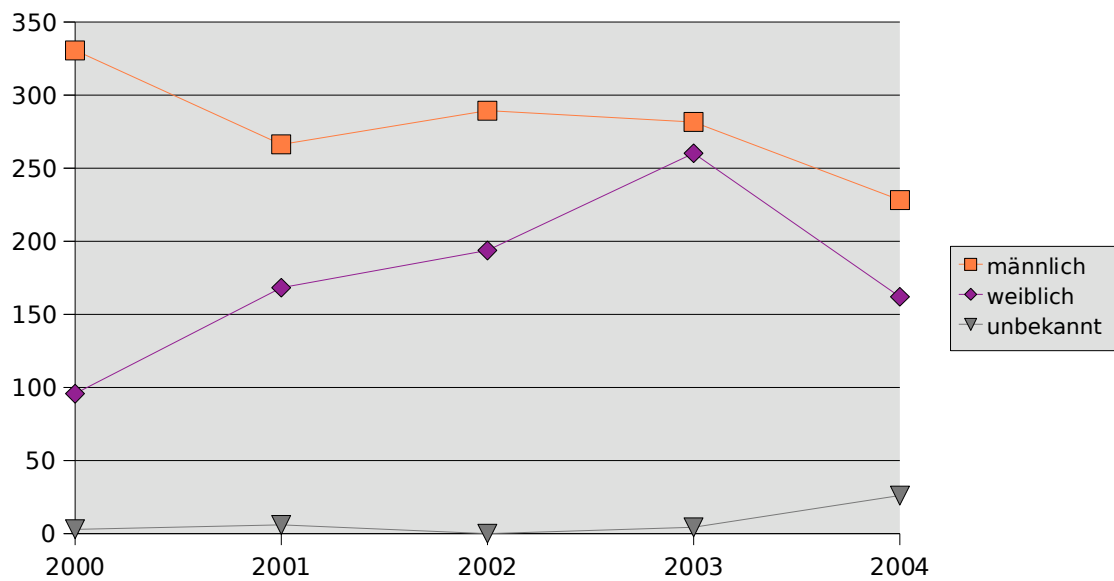


Abbildung 16: Geschlecht der untersuchten Patienten im Fünfjahresüberblick

Im Verlauf der fünf Jahre werden immer häufiger Frauen auf Mutationen untersucht. Abbildung 16 veranschaulicht, dass sich die Zahl der untersuchten Patientinnen im Verlauf nahezu verdoppelt hat.

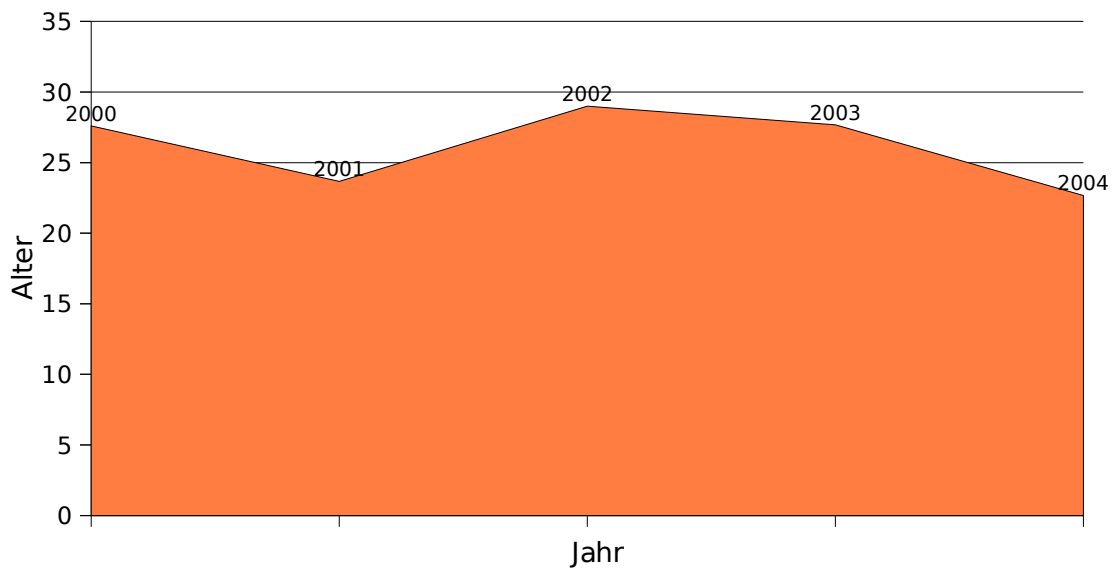


Abbildung 17: Durchschnittsalter der Patienten im Fünfjahresüberblick

In Abbildung 17 wird deutlich, dass das Durchschnittsalter der Patienten in dem eine Genanalytik aufgrund des Verdachts einer Hämophilie A durchgeführt wird im Laufe der Jahre etwa gleichbleibt.

4.2.2 Geographische Verteilung der einweisenden Ärzte

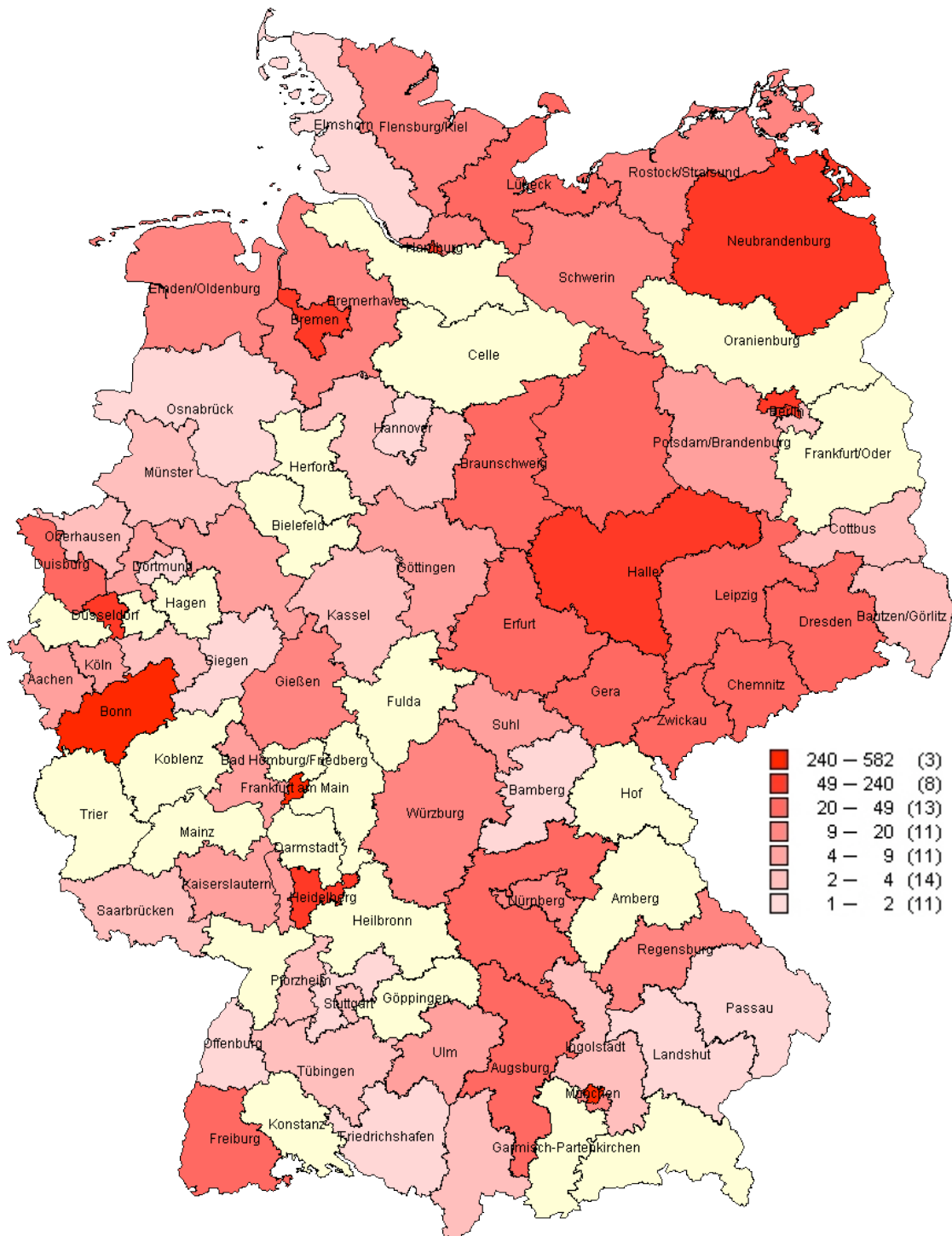


Abbildung 18: Geographische Verteilung der Verdachtsdiagnose Hämophilie A

In Abbildung 18 wird die Verteilung der Untersuchungsaufträge innerhalb Deutschlands zur Hämophilie A-Analytik dargestellt.

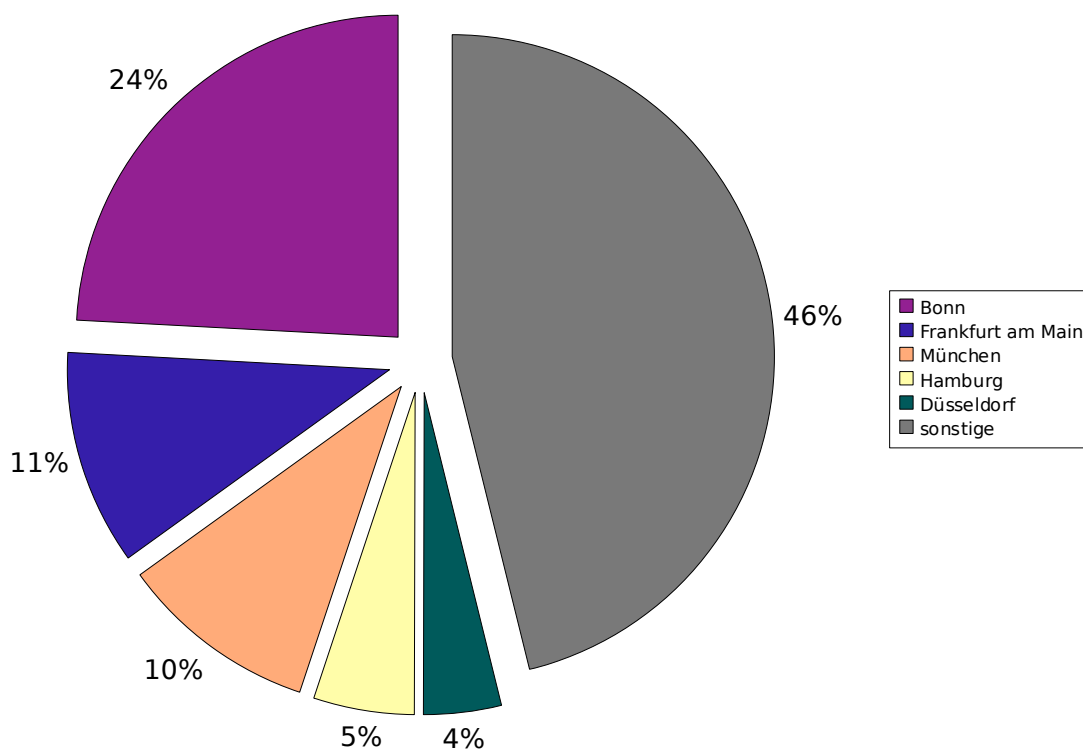


Abbildung 19: Anteil der fünf Großräume mit der höchsten Zahl an Untersuchungsanfragen

Da die Hämophilie A den überwiegenden Teil der untersuchten Gerinnungsstörungen darstellen, sind auch hier vorwiegend die in Abbildung 19 aufgeführten Universitätsstädte zu nennen, aus denen die meisten Anfragen stammen.

4.3 Hereditäres Angioödem I

4.3.1 Ergebnisse der Jahre 2000 bis 2004 im Durchschnitt und Verlauf

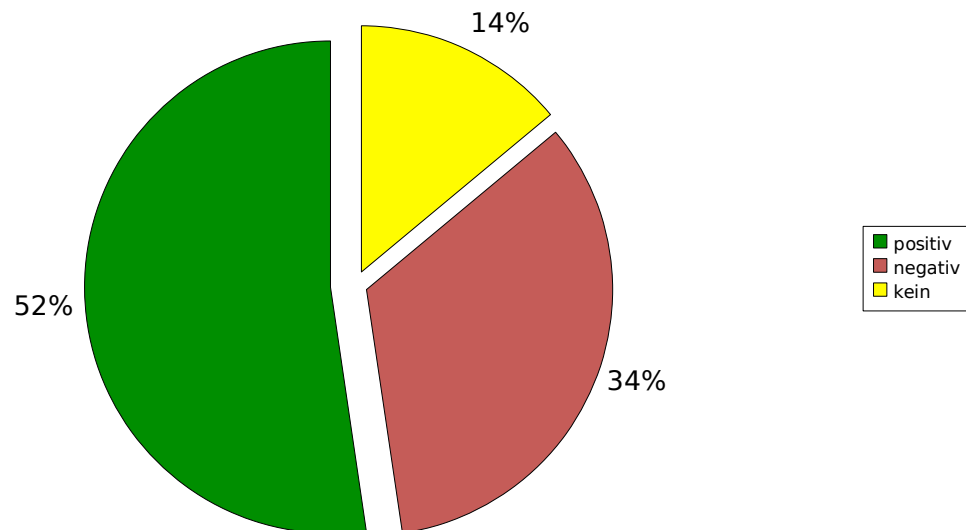


Abbildung 20: Untersuchungsergebnisse

Bei über der Hälfte der am Institut für Humangenetik Würzburg untersuchten Patienten mit dem klinischen Verdacht auf ein Hereditäres Angioödem konnte die Genanalytik die Diagnose bestätigen. Dies zeigt Abbildung 20.

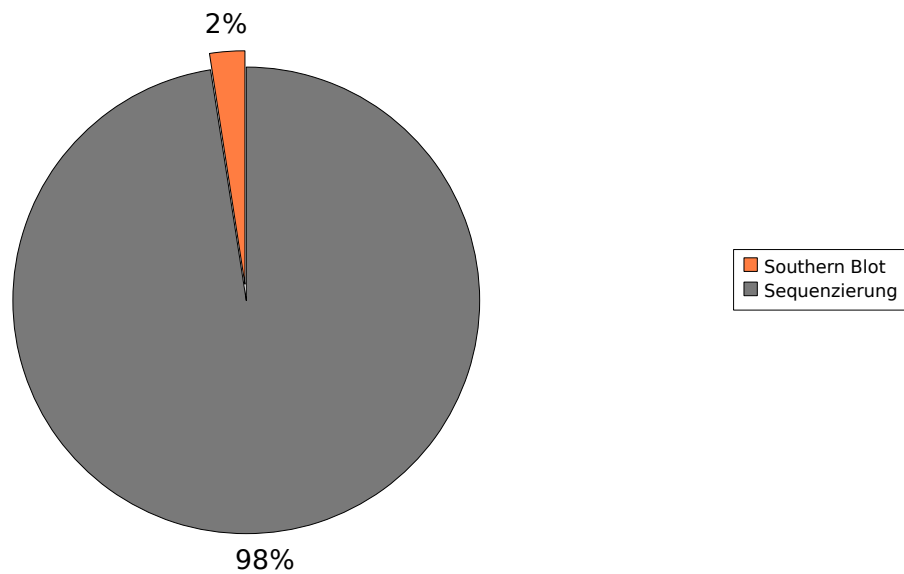


Abbildung 21: Untersuchungsmethoden mit positivem Ergebnis

In fast allen Fällen war die Sequenzierung die Methode der Wahl. Abbildung 21 zeigt, dass 98% der positiven Ergebnisse durch Sequenzierungen erzielt werden konnten. Nur in 2% der Fälle konnte die Diagnose durch einen Southern Blot gesichert werden.



Abbildung 22: Anzahl der Untersuchungen

Wie in Abbildung 22 dargestellt steigt die Anzahl der Untersuchungsanfragen kontinuierlich in der der Zeit von 2000 bis 2004. Bis ins Jahr 2004 hat sich die Frequenz der Untersuchungsaufträge beinahe verdoppelt.

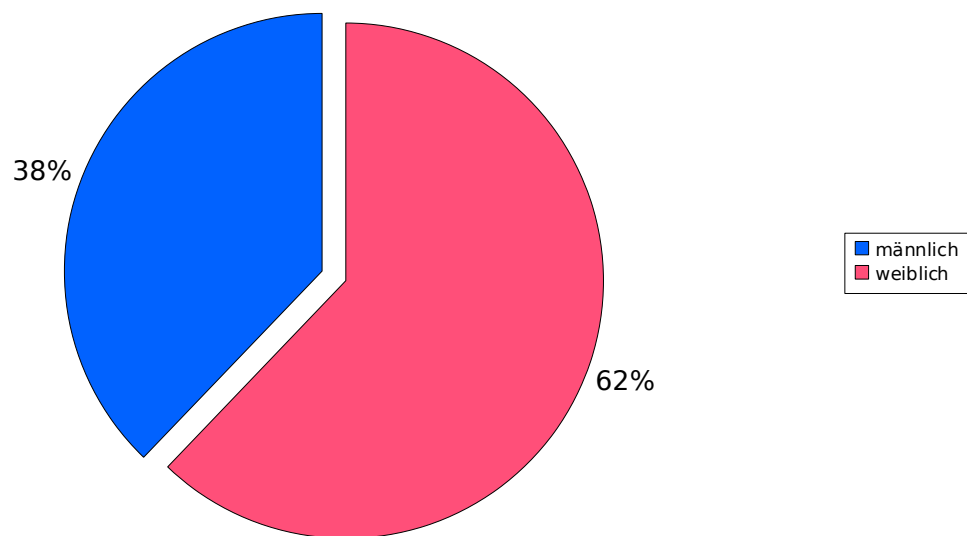


Abbildung 23: Geschlecht der untersuchten Patienten

Die meisten untersuchten Patienten sind weiblich. Wie in Abbildung 23 demonstriert sind dies 62%. Die übrigen 38% der Patienten sind männlich.

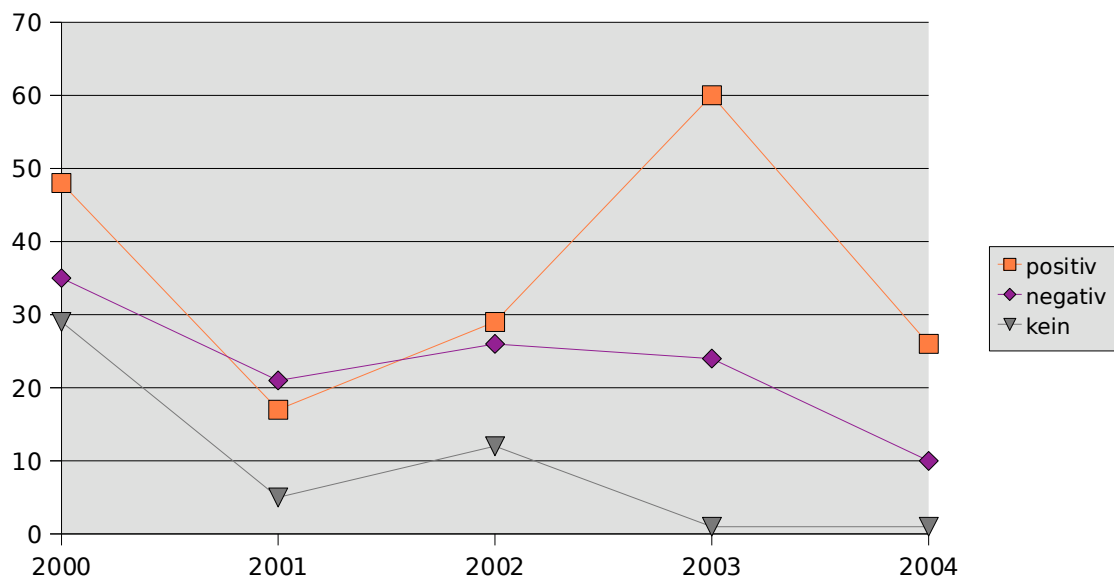


Abbildung 24: Fünfjahresüberblick der Untersuchungsergebnisse

Die Übersicht der Untersuchungsergebnisse von fünf Jahren in Abbildung 24 zeigt eine Zunahme der positiven Ergebnisse. Der klinische Verdacht eines Hereditären Angioödems kann häufiger durch Genanalyse erklärt werden.

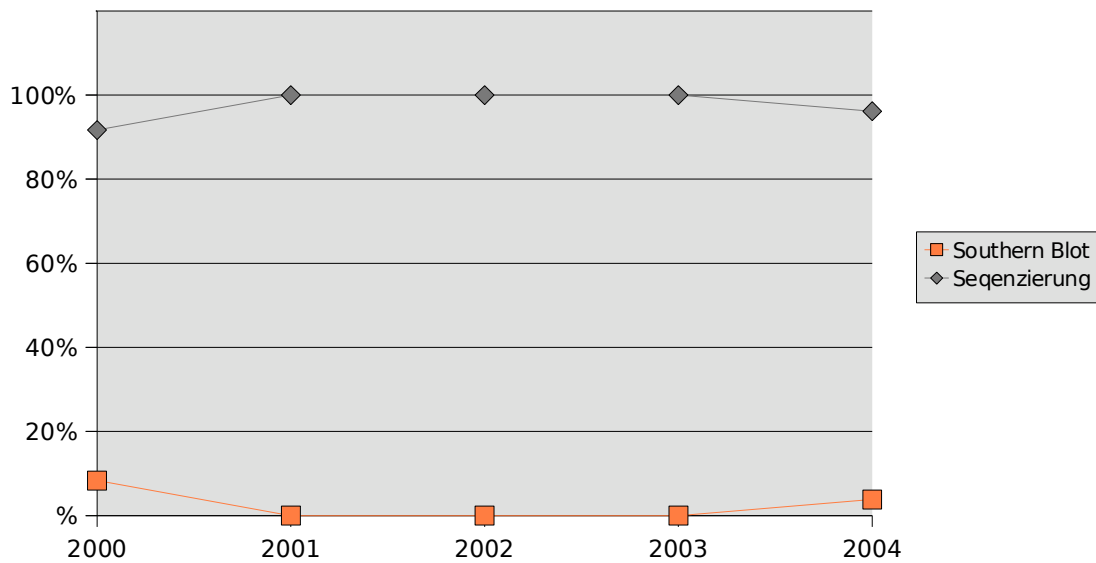


Abbildung 25: Fünfjahresüberblick der Methoden mit positivem Ergebnis

Methode der Wahl zur Diagnostik des Hereditären Angioödems ist die Sequenzierung. Abbildung 25 verdeutlicht, dass nahezu alle positiven Ergebnisse mit dieser Untersuchungsmethode erzielt werden konnten.

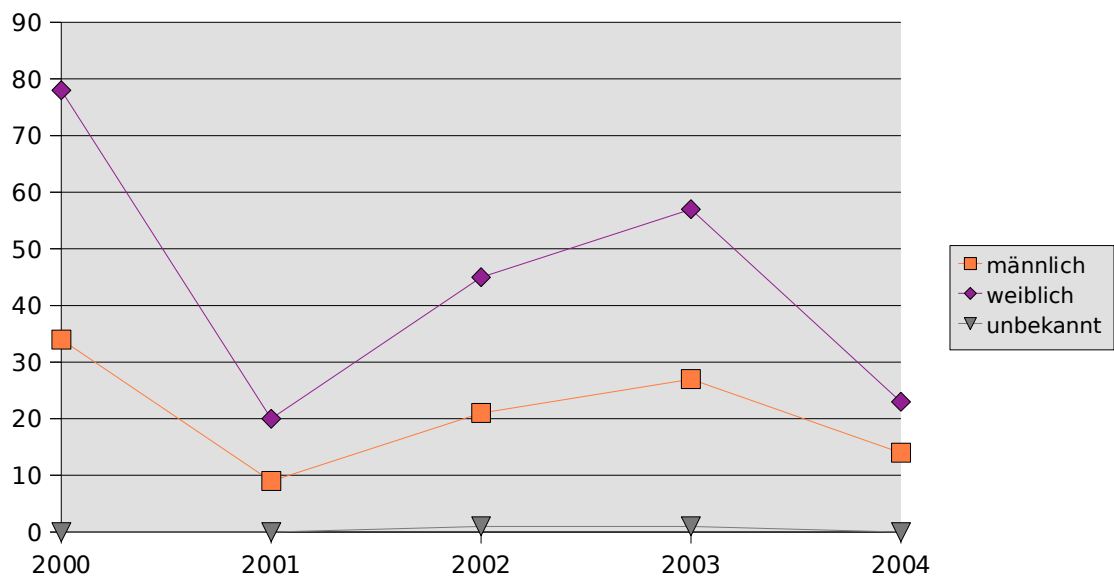


Abbildung 26: Geschlecht der untersuchten Patienten im Fünfjahresüberblick

Im Verlauf der fünf Jahre gleicht sich die Zahl der untersuchten Frauen der der untersuchten Männern an. Abbildung 26 veranschaulicht dies, wobei nach wie vor mehr weibliche Patienten analysiert werden.

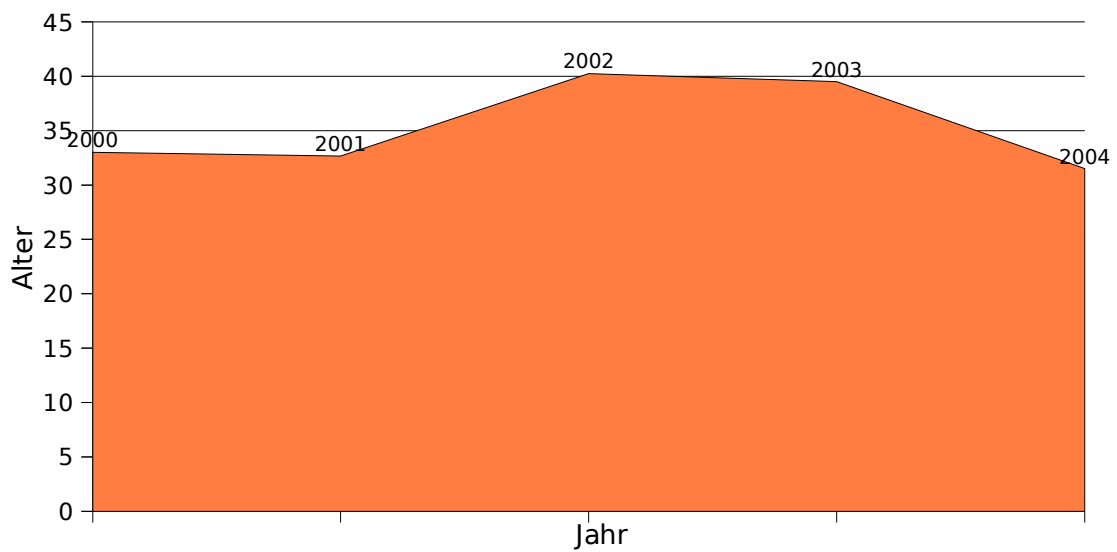


Abbildung 27: Durchschnittsalter der Patienten im Fünfjahresüberblick

In Abbildung 27 zeigt sich, dass das Durchschnittsalter in dem die Genanalytik aufgrund des Verdachts eines Hereditären Angioödems durchgeführt wird im Vergleich von 2000 bis 2004 konstant ist.

4.3.2 Geographische Verteilung der einweisenden Ärzte

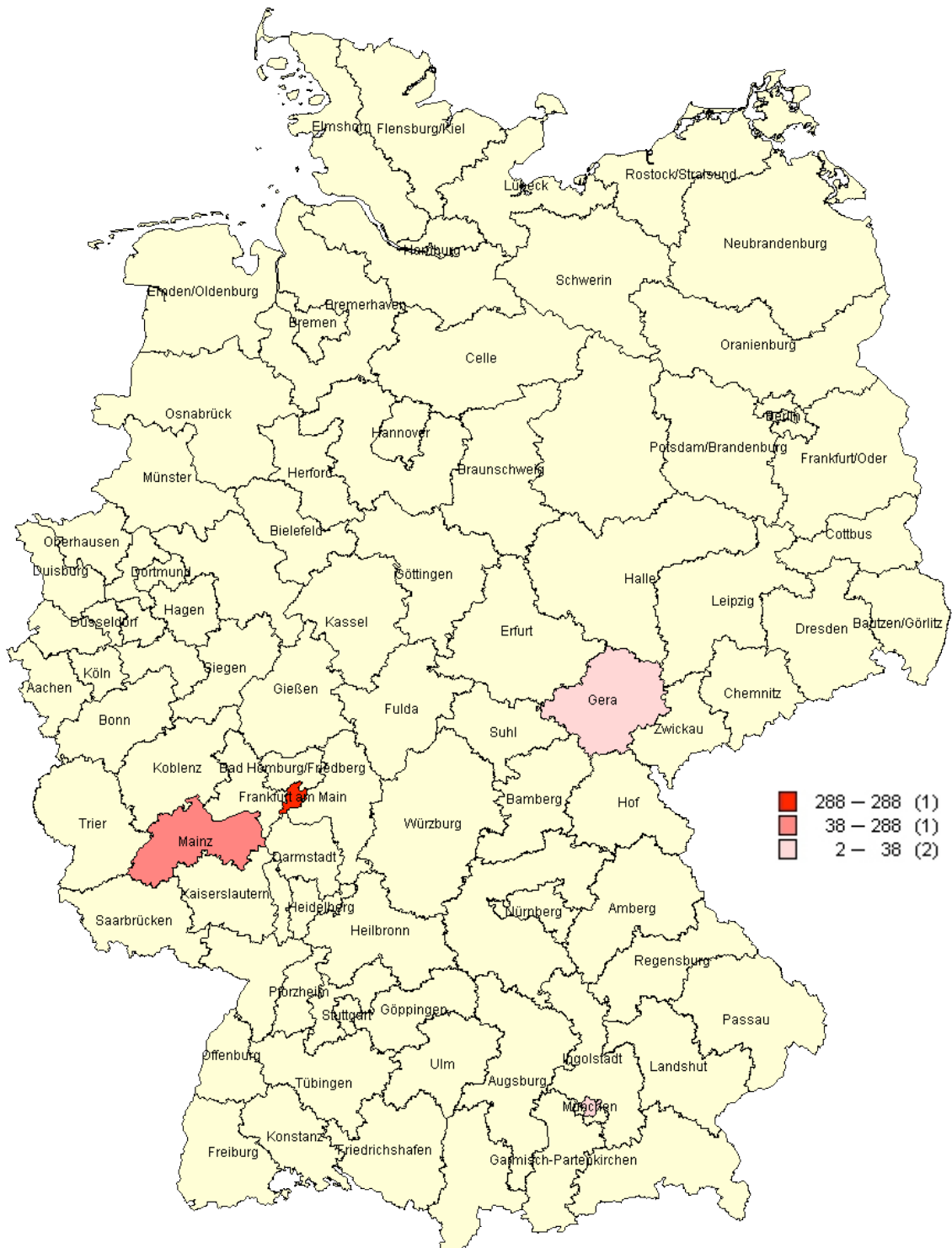


Abbildung 28: Geographische Verteilung der Verdachtsdiagnose Hereditäres Angioödem I

Abbildung 28 veranschaulicht die Zentren in Deutschland, aus denen Aufträge zur C1-Inhibitor-Diagnostik stammen.

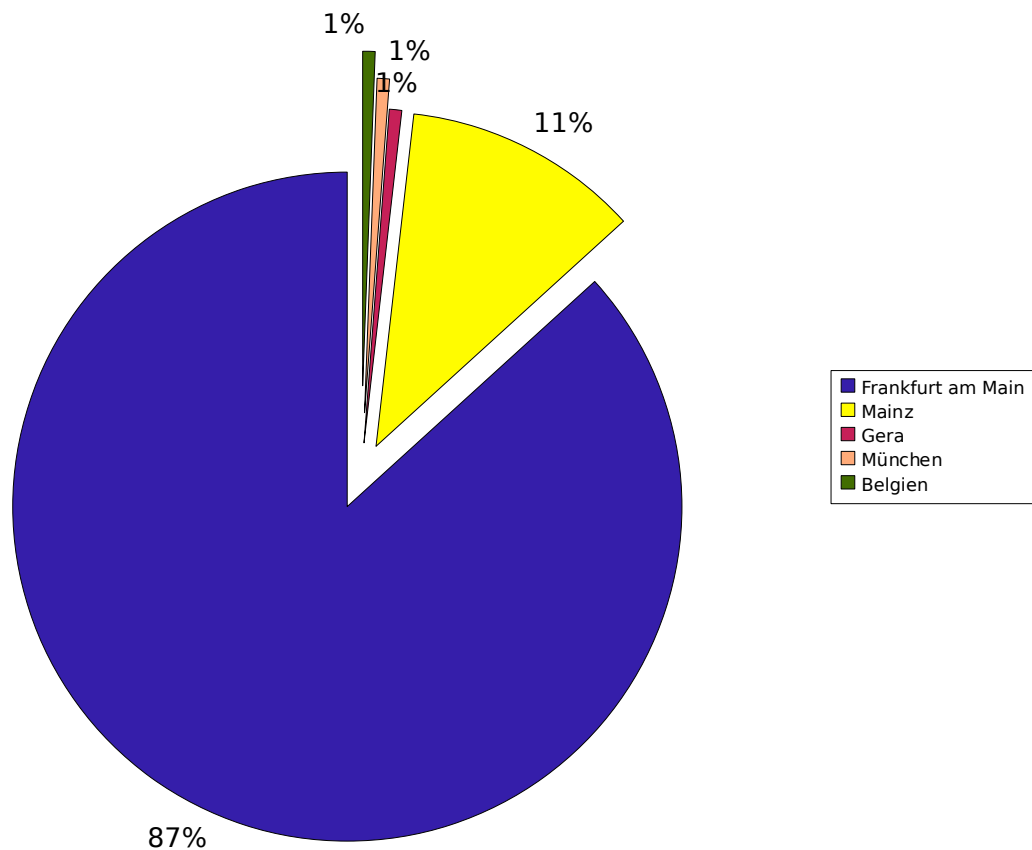


Abbildung 29: Anteil der fünf Großräume mit der höchsten Zahl an Untersuchungsanfragen

87% der Anfragen kommen aus Frankfurt am Main, 11% aus Mainz. Abbildung 29 zeigt, dass sonst nur wenige Einsendungen von Material zur Analytik aus Gera, München und Belgien stammen.

5 Diskussion

5.1 Alle untersuchten Krankheitsbilder

Die genetische Abklärung von Gerinnungsstörungen macht beinahe ein Viertel der erfassten Untersuchungsaufträge des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg aus. Ein Großteil (ca. 82%) dessen bestreitet die Hämophilie A-Diagnostik, ein kleinerer Bruchteil (ca. 12%) jedoch auch die Diagnostik des Hereditären Angioödems I. Insgesamt stammen die Patienten zu knapp zehn Prozent aus dem Großraum Würzburg. Wichtige kooperierende Anlaufstellen sind in den Großräumen Bonn, München, Frankfurt am Main und Berlin zu finden. Betrachtet man die Diagnostik der Gerinnungsstörungen im einzelnen, bietet sich ein ähnliches Bild, wobei Würzburg als Einweisungsgebiet in den Hintergrund rückt. Hier sind besonders die Großräume Bonn, Frankfurt am Main, München, Hamburg und Berlin zu nennen. Aufgrund der Daten ist anzunehmen, dass das Institut für Humangenetik der Universität Würzburg auch in Zukunft eine wichtige Rolle in der bundesweiten Diagnostik von Gerinnungsstörungen mittels Genanalyse spielen wird.

5.2 Hämophilie A

Die klinische Verdachtsdiagnose einer Hämophilie A kann in den meisten Fällen durch die Genanalyse bestätigt werden. Jedoch kann die häufigste Ursache der schweren Verlaufsformen, die Intron 22 Inversion, nur bei einer Minderheit der Patienten mit mäßigen oder milden Formen festgestellt werden. Fast 70 Prozent der Ursachen sind nur durch eine Sequenzierung verdächtiger Exons zu detektieren. Die Tendenz ist steigend, so dass überlegt werden sollte,

die Reihenfolge der Untersuchungen bei mäßigen und milden Verlaufsformen in Zukunft umzustellen. Am Anfang könnte ein Screening mittels DGGE durchgeführt werden. Sollten sich dabei Auffälligkeiten zeigen, könnte eine Sequenzierung folgen, um die Diagnose zu sichern. Erst bei unauffälligem Screening könnte eine PCR zum Ausschluss einer Intron 22 Inversion folgen. Die Intron 1 Inversion kann so selten diagnostiziert werden, dass diese wohl als letzte Ursache ausgeschlossen werden sollte. Grundsätzlich wird es weiterhin wichtig sein, die molekulare Diagnostik zu betreiben, da nur so der Genotyp ermittelt werden kann und damit eine Aussage über die Schwere der Erkrankung und das Risiko der Hemmkörperbildung getroffen werden kann. Somit kann die Erkrankung auch in Zukunft adäquat behandelt und eine prognostische Einschätzung gegeben werden. Wie zu erwarten, sind die Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Hämophilie A überwiegend männlich. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Erstdiagnose bleibt in etwa gleich. Die erfassten Patienten stammen aus den Großräumen Bonn, Frankfurt am Main, München, Hamburg und Berlin.

5.2.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Je nach Schweregrad lassen sich verschiedene Mutationen als häufigste Ursachen finden.

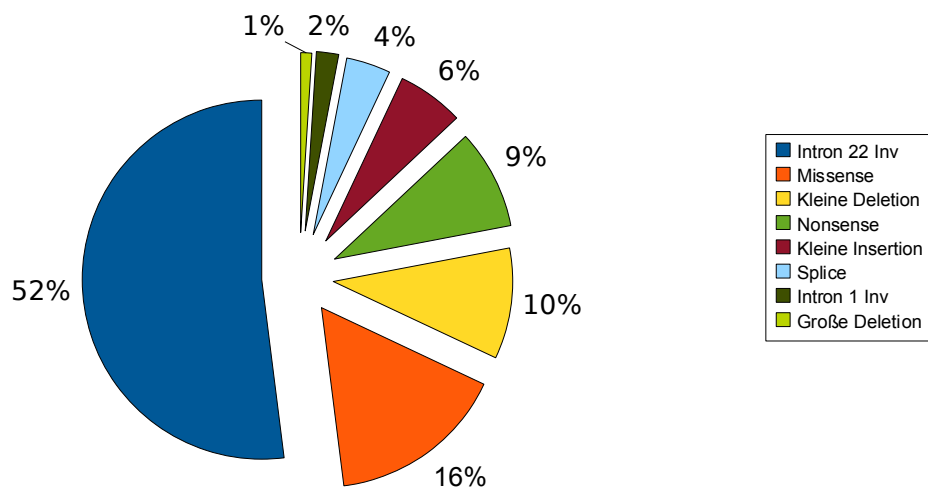


Abbildung 30: Schwere Verlaufsform der Hämophilie A [19]

Bei schweren Verlaufsformen dominiert, wie Abbildung 30 zeigt, die Intron 22 Inversion mit 52%. Danach erst stehen Missense-Mutationen mit 16 %, kleine Deletionen mit 10% und alle übrigen Ursachen.[19]

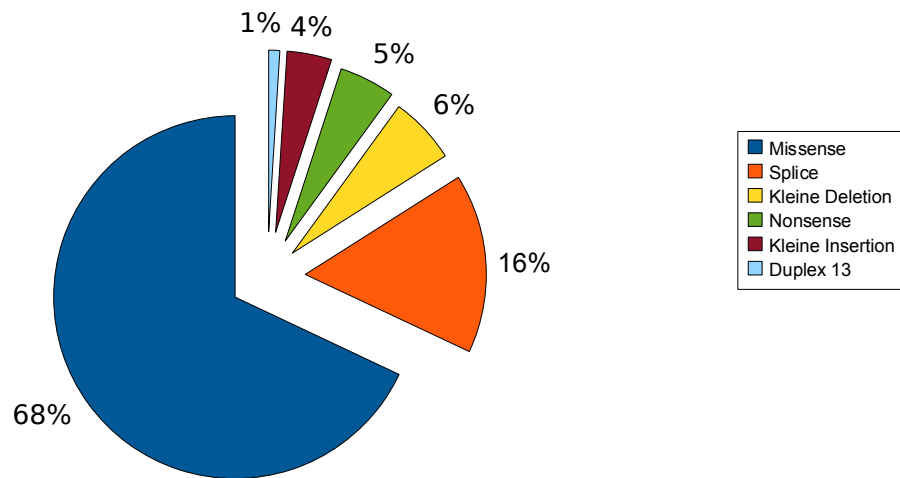


Abbildung 31: Mäßige Verlaufsform der Hämophilie A [19]

Hingegen sind 68% der mäßigen Verlaufsformen auf Missense-Mutationen zurückzuführen. Abbildung 31 veranschaulicht dies. Hier stehen an zweiter und dritter Stelle Splice-Mutationen mit 16% und kleine Deletionen mit 6%. [19]

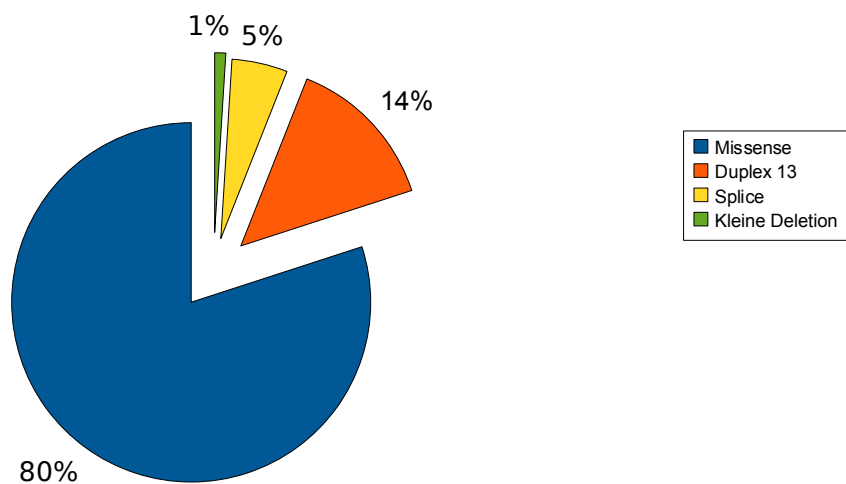


Abbildung 32: Milde Verlaufsform der Hämophilie A [19]

Bei milden Verlaufsformen bilden Missense-Mutationen sogar 80% der ursächlichen Genveränderungen. Wie in Abbildung 32 dargestellt sind für 14% der milden Fälle Verdoppelungen des Exon 13 verantwortlich. [19] In anderen Regionen, wie z.B. im Norden Italiens bildet diese Mutation sogar 32% der Ursachen einer milden Hämophilie A. [20] 5% der Mutationen sind Splice-Mutationen. [19]

5.2.2 Klinische Hämophilie ohne Nachweis einer Mutation im F8-Gen

In den meisten Fällen von Hämophilie A lässt sich eine Mutation im F8-Gen nachweisen. In ca. 2% der klinischen Fälle lässt sich selbst mit hoch-sensitiven Methoden wie DGGE, DHPLC oder Sequenzierung keine Mutation im F8-Gen nachweisen. [12][21][22] Es gibt verschiedene Möglichkeiten dies zu erklären. Eine davon ist, dass selbst eine Sequenzierung nicht sensitiv genug ist um bestimmte Mutationen im F8-Gen zu detektieren. Ebenso könnten technische Fehler bei der Durchführung dafür verantwortlich sein. Da nicht immer die sonst typische X-chromosomale Vererbung nachweisbar ist, bleibt zu vermuten, dass auch Mutationen in anderen Proteinen an der Funktion von F8 beteiligt sein könnten. Proteine, die in die Ausschüttung oder den Abbau von F8 eingreifen. Möglicherweise auch Proteine, die die Aktivität von F8 beeinflussen. [22] ERGIC-53 ist beispielsweise ein Protein, welches am Transport von F8 und F5 vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat beteiligt ist und dessen Mutation zu einem kombinierten Mangel an F8 und F5 führt. [23] Eine weitere Möglichkeit ist eine verminderte Expression der F8-mRNA, was dazu führen würde, dass weniger aktives F8-Protein im Kreislauf zirkulierte. Interessanterweise entwickeln Patienten mit nicht detektierbaren Mutationen bisher nie Hemmkörper gegen F8, wie das sonst bei schweren Verlaufsformen

häufig der Fall ist. Dies unterstützt die These, dass es bei diesen Patienten zu einer verminderten Expression oder Sekretion von F8 kommt. [22] Sobald neue Fortschritte auf der Suche nach möglichen Ursachen außerhalb des F8-Gens erzielt werden, wird auch die Diagnostik der Hämophilie A ausgeweitet werden.

5.2.3 Untersuchungsmethoden, die zur Diagnose führen im nationalen und internationalen Vergleich

Bei 89% der Patienten mit klinischer Hämophilie A kann eine kausale Mutation im F8-Gen nachgewiesen werden. [19] Die Untersuchungsmethoden, die zur Diagnose führen, sind dabei je nach Schweregrad unterschiedlich.

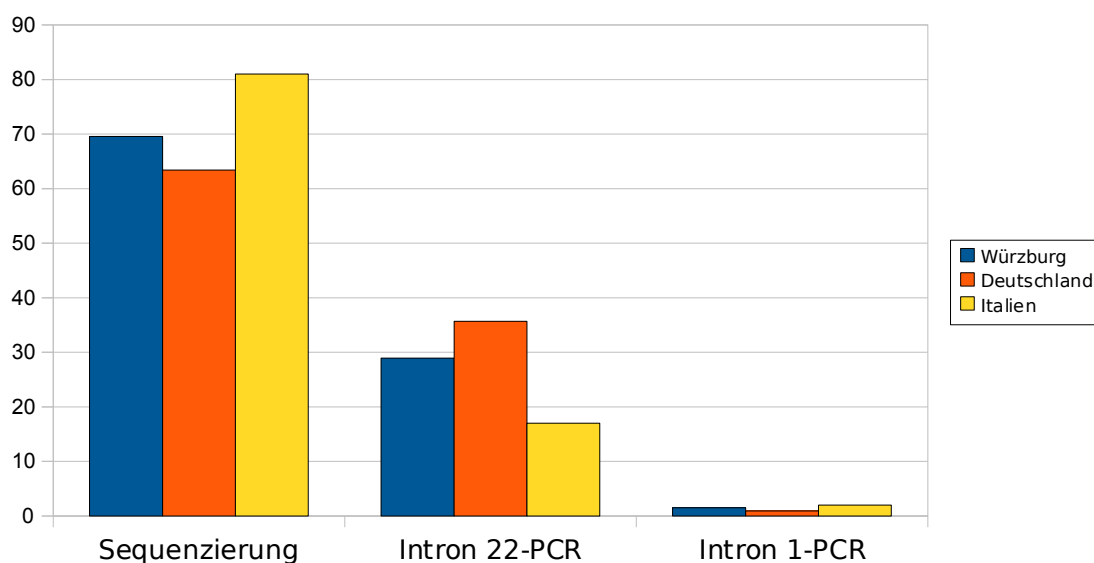


Abbildung 33: Untersuchungsmethoden, die zur Diagnosestellung führen im nationalen und internationalen Vergleich

Am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg konnten 69,58% der Diagnosen durch eine Sequenzierung gestellt werden, 28,92% durch Intron 22-PCR und 1,50% durch Intron 1-PCR. Bundesweit waren es 63,4% der ursächlichen Mutationen, die mittels

Sequenzierung entdeckt werden konnten, 35,7% mittels Intron 22-PCR und 0,9% mittels Intron 1-PCR. [24] In einer italienischen Datenbank wurden 81% der Diagnosen durch Sequenzierungen, 17% durch Intron 22-PCR und 2% durch Intron 1-PCR ermittelt. [19] Der Vergleich wird in Abbildung 33 graphisch dargestellt.

5.2.4 Therapiekonzepte und deren Erfolg

Der heutige Therapiestandard bei Hämophilie A ist die Substitution des F8 mit einer rekombinanten Variante. [1] Leider kommt es vor allem bei schweren Formen der Erkrankung immer wieder zur Bildung von Hemmkörpern. [7] Um dieser Problematik zu entgehen wäre die beste Lösung, das defekte Gen durch ein intaktes ersetzen zu können. Somit wäre die Krankheit lebenslang geheilt und eine Substitution nicht mehr notwendig. [25] Die Bestrebungen der meisten Gentherapien gehen allerdings eher in die Richtung ein Gen hinzuzufügen als eines zu ersetzen. [26] Sollte es gelingen, eine Expression von 2-3% des F8-Wildtypspiegels im Blut über längere Zeit zu erzielen, könnte eine drastische Reduktion der klinischen Fälle von Hämophilie A erreicht werden. Ab einem Spiegel von 30% wären die Patienten unter den meisten Umständen klinisch beschwerdefrei. [25] Aufgrund der Größe des F8 ist ein Gentransfer nicht leicht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten dieses Problem zu meistern. Zunächst kann die nicht benötigte B-Domäne der F8-cDNA entfernt werden. [27] Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die schweren und leichten Ketten des F8 in zwei unterschiedliche Vektoren zu verpacken. [25] Ein weiterer Ansatz besteht darin, ebenfalls zwei Vektoren zu verwenden und jeweils die Hälfte auf diese zu verteilen. Zusammenfügen lassen sich die Hälften durch die Verwendung eines 3'-Splice-Donator am einen und eines 5'-Splice-Akzeptors am anderen Vektor. [28] In Zukunft wird es sicherlich

möglich sein die große cDNA des F8 auch am Stück zu übertragen.
[29]

Als Vektoren können RNA-Viren wie das murine Leukämievirus dienen. Dieses ist jedoch nicht in der Lage, die Kernmembran zu durchdringen, außer die Zielzelle teilt sich gerade, so dass die Kernmembran physiologischerweise aufgelöst wird. [25] Beim Versuch mit Hepatozyten von neugeborenen Mäusen, die sich häufig teilen, konnte bei der Mehrzahl der Mäuse eine F8-Aktivität von über 50% erreicht werden, die für ca. 15 Monate anhielt. [30]

Adenoviren können ebenfalls als Vektoren eingesetzt werden. Als es noch nicht möglich war, die gesamten viralen Gensequenzen zu entfernen, kam es bei Applikation zu Immunreaktionen. Trotzdem konnte ein therapeutischer F8-Spiegel über 3 bis 5 Monate erreicht werden. [31] Bei Studien mit großen Tieren waren die Effekte jedoch deutlich kürzer und die Lebertoxizität höher. [32] Später konnten dann alle viralen Gensequenzen entfernt werden, wodurch keine Hepatotoxizität mehr nachweisbar war. [25] Eine Studie am Menschen führte zur Entzündungskonstellation mit Fieber und Muskelschmerzen nach der Infusion. 7 Tage danach entwickelte sich eine Thrombozytopenie und die Transaminasen des Patienten stiegen an. Daraufhin wurden keine weiteren Patienten in die Studie einbezogen. [25]

Auch Adeno-assoziierte Viren eignen sich als Vektoren. Diese sind nicht in der Lage sich selbst vollständig zu replizieren und benötigen dafür andere Viren. Hiermit konnten im Tiermodell Erfolge vor Allem zur Behandlung von Hämophilie B erzielt werden. [25]

All diese Wege konnten bisher nur in Tiermodellen erfolgreich getestet werden. Ein lang anhaltender therapeutischer Effekt wurde bislang nicht erreicht. Der Therapiestandard wird also zunächst die

Substitution bleiben, wobei in der Gentherapie große Fortschritte gemacht wurden.

5.3 Hereditäres Angioödem I

Die klinische Verdachtsdiagnose eines Hereditären Angioödems I kann in den meisten Fällen durch die Genanalyse bestätigt werden. Das Screening mittels DGGE hat sich bewährt, um die Diagnose mittels einer Sequenzierung zu sichern, so dass am Screening als erste Maßnahme festgehalten werden sollte. Die Patienten mit der Verdachtsdiagnose eines Hereditären Angioödems I sind zum Großteil weiblich. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Erstdiagnose ist nahezu konstant. Die Patienten stammen aus den Großräumen Frankfurt am Main, Mainz, Gera, München, aber einige auch aus Belgien.

5.3.1 Spektrum neuer Mutationen bei Hereditärem Angioödem

Mutationen, die zu einem Hereditären Angioödem führen werden in einer Datenbank gesammelt. Jede Familie scheint ihre ganz eigene Mutation zu haben, da die Mutationen häufig nicht vorbeschrieben, innerhalb einer Familie jedoch meist die selben sind. [33] In Abbildung 34 und 35 wird das Spektrum der bereits in der Datenbank enthaltenen Mutationen dem einer aktuellen Untersuchung gegenübergestellt.

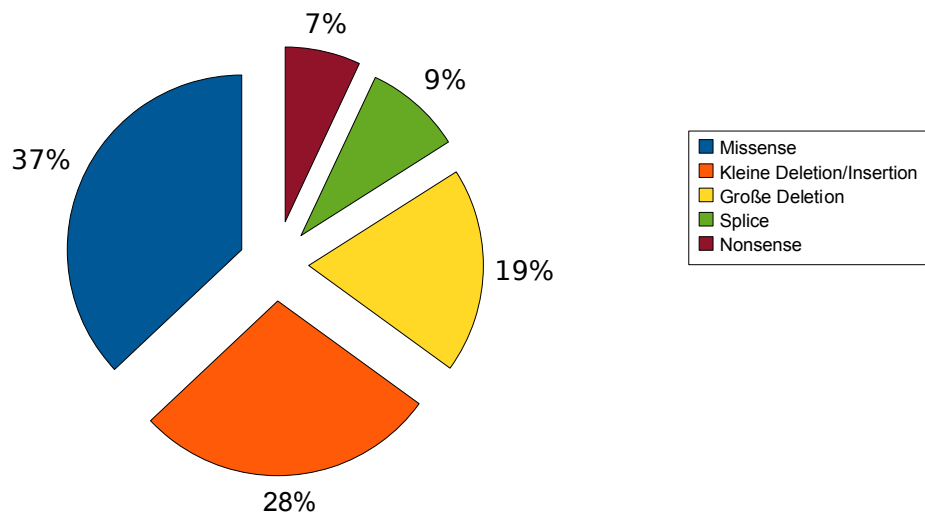


Abbildung 34: In der C1 inhibitor gene mutation database beschriebene Mutationen bei Hereditärem Angioödem [33]

Bei den vorbeschriebenen Mutationen handelt es sich in den meisten Fällen um Missense-Mutationen, dicht gefolgt von kleinen Deletionen und Insertionen. Seltener werden große Deletionen gefunden. Splice-Mutationen und Nonsense-Mutationen stellen den geringsten Teil dar. [33]

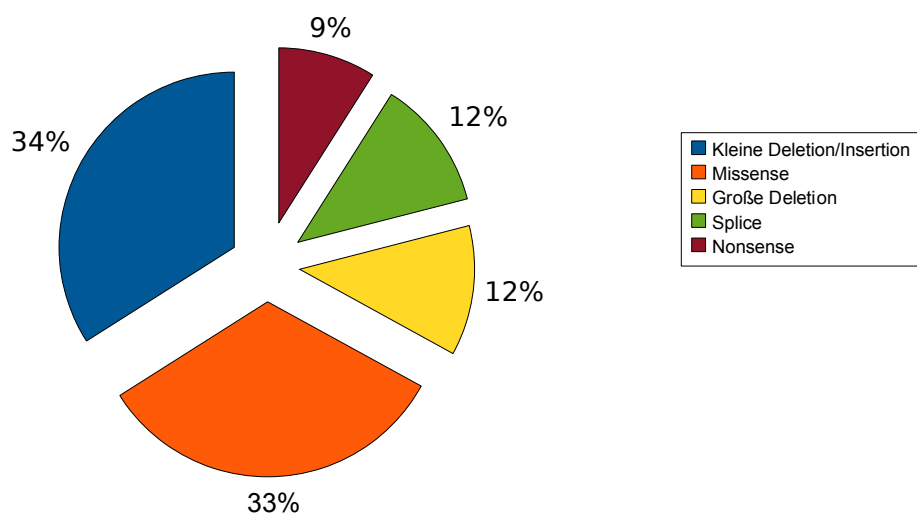


Abbildung 35: Neue Mutationen bei Hereditärem Angioödem [33]

Das Mutationsspektrum der aktuell untersuchten Patienten entspricht ziemlich dem vorbeschriebenen. Führend sind weiterhin Missense-Mutationen und kleine Deletionen und Insertionen, wobei letztere knapp häufiger sind. Selten sind ebenfalls Splice-Mutationen und Nonsense-Mutationen. [33] Somit kann wohl auch in Zukunft mit einem ähnlichen Verteilungsmuster gerechnet werden.

5.3.2 Klinisches Hereditäres Angioödem ohne Nachweis einer Mutation

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass alle Patienten mit Hereditärem Angioödem einen genetisch bedingten Mangel an funktionsfähigem C1-Inhibitor haben. [18] Vor kurzem wurden jedoch einige Fälle von klinischem Hereditärem Angioödem beschrieben, bei denen sowohl Konzentration als auch Funktion des C1-Inhibitor normal waren. Von diesem Typ III der Erkrankung sind vorwiegend Frauen betroffen. Der Stammbaum in Abbildung 36 zeigt eine Familie, in der sogar ausschließlich Frauen betroffen sind.

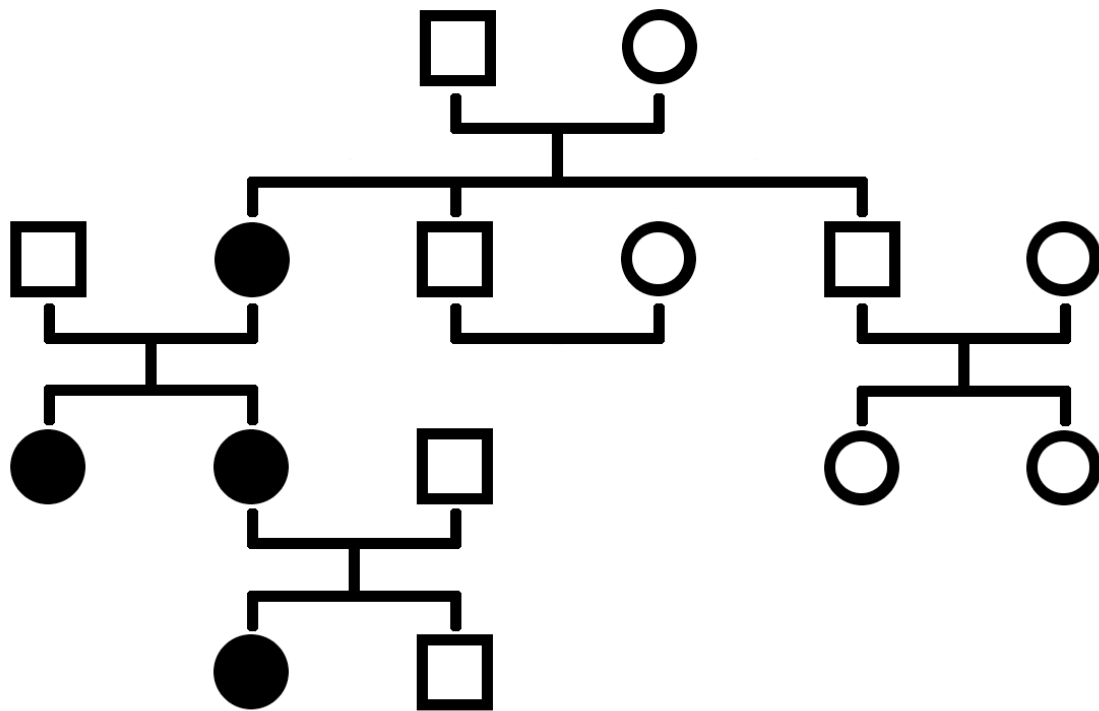


Abbildung 36: Stammbaum einer Familie mit Hereditärem Angioödem mit normalem C1-Inhibitor [18]

Möglicherweise spielt der Einfluss von Östrogen dabei eine Rolle, da orale Kontrazeption, Schwangerschaft und die Substitution von Östrogen zum Ausbruch der Erkrankung führen oder diese verschlimmern können. [34] Das Hereditäre Angioödem Typ III unterscheidet sich auch klinisch klar vom Typ I und II. Im Gegensatz zu Typ I oder II tritt Typ III häufig bei über 20-jährigen auf. Die Betroffenen Organe sind die selben, wobei die Häufigkeit deutlich abweicht. Der häufigste Manifestationsort des Typ III ist das Gesicht bzw. die Zunge, wohingegen beim Typ I und II eher die Extremitäten betroffen sind. Beim Typ III können Blutungen auftreten, was einen Hinweis darauf gibt, dass es sich um eine Störung im Blutgerinnungssystem handeln könnte. [18] Aller Wahrscheinlichkeit nach spielt eine Mutation im Blutgerinnungsfaktor 12 eine Rolle, da bei einem Drittel der Betroffenen eine solche existiert. [35]

5.3.3 Therapiekonzepte und deren Erfolg

Als prophylaktische Therapie hat sich das Androgen Danazol durchgesetzt. Der Wirkmechanismus ist noch ziemlich unklar. Die Idee der hormonellen Therapie kam dadurch zustande, dass eine Häufung der Attacken bei Schwangerschaft oder hormoneller Kontrazeption beobachtet werden konnte. [36] Eine weitere prophylaktische Option bietet der Fibrinolyse-Inhibitor ϵ -Aminocaproic-Säure. Beide Substanzen eignen sich jedoch nicht für die Therapie einer akuten Attacke. [36] Aufgrund der Thrombogenität von Danazol oder ϵ -Aminocaproic-Säure ist der Einsatz der Substanzen während der Schwangerschaft nicht zu empfehlen. [36][37] Hier kann die Prophylaxe mit C1-Inhibitor-Konzentrat als Infusion erfolgen. [37]

Im Falle einer akuten Attacke können Androgene und ϵ -Aminocaproic-Säure ebenfalls eingesetzt werden, allerdings nicht um die Attacke zu beenden, sondern lediglich um diese zu verkürzen. Hier steht bisher die symptomatische Therapie im Vordergrund. Bei Beteiligung der Atemwege bleibt oft nur die Intubation. [36] Der Einsatz von Narkotika vor Allem zu Beginn einer Attacke konnte diese manchmal beenden. Auch die Infusion von gefrorenem Frischplasma oder C1-Inhibitor-Konzentrat führte hin und wieder zum Erfolg. Insgesamt sind die Möglichkeiten zur Beendigung einer Attacke noch nicht zufriedenstellend. [36]

Zur Zeit wird ein rekombinanter C1-Inhibitor entwickelt. Dabei soll das menschliche Gen in Tieren so eingebaut werden, dass der C1-Inhibitor in deren Milch sezerniert wird. [36] Auch die Blockade von Kallikerin, dem Enzym, welches zur Bradykininfreisetzung führt und des Bradykininrezeptors selbst sind in Erprobung. [13][36]

5.4 Ausblick

Für die Diagnostik von Hämophilie A und Hereditärem Angioödem I sind hochspezialisierte Untersuchungstechniken vonnöten. Patienten sollten sich sinnvoll nach dem neuesten Stand des Wissens über ihre Erkrankung informieren können. Im Rahmen des Internetauftritts des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg könnte dies realisiert werden. Suchmaschinen wie Google sollten diese Informationsseiten als erstes Ergebnis der Suche nach Hämophilie oder Hereditäres Angioödem aufführen. So könnten Fehlinformationen vermieden und schnell ein professioneller Ansprechpartner gefunden werden.

6 Zusammenfassung

Im Fünfjahreszeitraum der Jahre 2000 bis 2004 wurden am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg mehr als 2300 Untersuchungen zur molekulargenetischen Bestätigung bzw. Ausschluss eines Betroffenen-Status bzw. eines Überträger-Status für die Hämophilie A durchgeführt. Dies waren 20% aller in dieser Arbeit erfassten molekulargenetischen Untersuchungen des Instituts. Die Zahl der Untersuchungen stieg von knapp über 400 im Jahre 2000 auf 550 im Jahre 2003, fiel aber im Jahr 2004 wieder auf den Ausgangswert zurück.

Anforderungen für F8-Mutationsanalysen kamen schwerpunktmäßig aus Bonn, Frankfurt, München und den neuen Bundesländern. 55% der untersuchten Patienten waren männlich, 39% weiblich, wobei die Zahl der weiblichen Patienten (Überträgerdiagnostik) bis zum Jahre 2003 einen deutlichen Anstieg verzeichnete. In 72% der Fälle konnte eine Mutation nachgewiesen, in 25% der Fälle konnte eine Mutation ausgeschlossen werden. Durchschnittlich 3% der Fälle blieben ohne definitives Ergebnis, wobei dieser Wert am Ende des Beobachtungszeitraums mit 1% deutlich unter den initialen 6% im Jahre 2000 lag. Die primäre Untersuchungsrate auf die Intron 22 Inversion sank von initial 40% (im Jahre 2000) auf knapp unter 20% im Jahre 2004. Gleichzeitig stieg die Analytik mittels DGGE und anschließender Sequenzierung von 60% auf 80%. Im Gegensatz zur Intron 22 Inversion mit 29% der positiv-getesteten Fälle spielte die Intron 1 Inversion mit knapp 1% der positiven Ergebnisse nur eine geringe Rolle.

Im gleichen Fünfjahreszeitraum wurden 350 Untersuchungen zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss genetischer Veränderungen als Ursache des Hereditären Angioödems (HAE) durchgeführt. Die

Häufigkeit der Mutationsanalysen im SERPING1-Gen ergab eine bimodale Verteilung: Während im Jahr 2000 knapp über 100 Analysen durchgeführt wurden, sank diese Zahl im Jahr 2001 auf unter 50, um dann bis zum Jahre 2004 auf nahezu 200 Fälle pro Jahr anzusteigen. 62% der untersuchten Patienten waren weiblich, 38% männlich, was der klinischen Präsentation der Erkrankung entspricht. Das Durchschnittsalter lag zwischen 30 und 40 Jahren. In 52% der Untersuchungen gelang der Nachweis einer Mutation, in 34% der Fälle war das Ergebnis negativ. In durchschnittlich 14% der Fälle konnte kein definitives Ergebnis erzielt werden. Während dieser Wert initial (im Jahre 2000) bei 30% lag, konnte er durch die Verbesserung der molekulargenetischen Analytik bis zum Jahre 2004 auf unter 2% gesenkt werden. Unter den Einsendern dominierten die Großräume Frankfurt und Mainz, während nur jeweils 1% der Anforderungen auf die Großräume München, Gera und Belgien entfielen. Lt. Gößwein et al. (2008) [33] fanden sich in der Würzburger Kohorte mit jeweils 33% bis 34% am häufigsten Missense-Mutationen sowie kleinere Deletionen und Insertionen. Große Deletionen, Splice-site-Mutationen und Nonsense-Mutationen waren mit jeweils ca. 10% sehr viel seltener.

Zusammenfassend ergeben sich aus der retrospektiven Auswertung der Daten zur molekulargenetischen Analytik von Hämophilie A und Hereditärem Angioödem wichtige Hinweise auf zeitlich und technisch bedingte Fluktuationen, welche als Grundlage zukünftiger analytischer Strategien dienen können.

7 Abstract

At the Department of Human Genetics of the University of Würzburg, between the years 2000 and 2004 more than 2300 blood samples have been tested in order to rule out or to confirm genetic alterations in the X-chromosomal factor VIII gene. This amounts to 20% all genetic tests carried out during the five year interval. The number of tested specimens increased from an initial 400 per year in the year 2000 to 550 per year in the year 2003, and dropped down to around 400 in the year 2004.

Requests for FVIII mutation analysis came mainly from Bonn, Frankfurt, Munich and from former East-German-States. Initially, 55% of the analyzed patients were male and 39% female, but female carrier diagnostics increased during the five year interval. A disease-causing genetic alteration was detected in 72% of cases, while a negative result was obtained in 25%. Initially, a result was not obtained in 6% of cases, but this figure decreased to 1% at the end of the study period. At the beginning of the study, 40% of the specimens were first subjected to intron 22 inversion analysis. This rate dropped down to 20% at the end of the study. Concurrently, the utilization of DGGE-prescreening increased from 60 to 80%. Whereas the intron 22 inversion comprised 29% of all positive cases, less than 1% of all cases had an intron 1 inversion.

During the same five year period, 350 analyses for confirmation or exclusion of genetic alterations as cause of hereditary angioedema (HAE) were performed. There was a bimodal distribution of the frequency of the molecular HAE tests which declined from an initial 100 per year (in 2000) to 50 per year.

Collectively, the results of this retrospective analysis document substantial temporal, geographic and methodological fluctuations in

the provision of specialized genetic services which may serve as guidelines for future improvements.

8 Literaturverzeichnis

1: J. Graw, H.-H. Brackmann, J. Oldenburg, R. Schnepfen, Haemophilia A: From mutation analysis to new therapies, Nature Reviews 6, 488-501 (2005)

2: G.I.C. Ingram, The history of haemophilia, Journal of clinical Pathology 29, 469-479 (1976)

3: O. El-Maarri, H. H. Brackmann, P. Hanfl, J. Oldenburg, Hemophilia A Patients with Undetectable Mutations: Current Knowledge and Future Directions, Transfusion Medicine and Hemotherapy 16, 156-159 (2006)

4: Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada, Hemophilia and von Willebrand's disease: 1. Diagnosis, Canadian Medical Association Journal 153, 19-25 (1995)

5: L. K. McGlynn, C. R. Mueller, M. Begbie, C. R. Notley, D. Lillicrap, Role of the Liver-Enriched Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor 1 in Transcriptional Regulation of the Factor VIII Gene, Molecular and Cellular Biology 16, 1936-1945 (1996)

6: S. E. Antonarakis, H. H. Kazazian, E. G. D. Tuddenham, Molecular Etiology of Factor VIII Deficiency in Hemophilia A, Human Mutation 5, 1-22 (1995)

7: J. Oldenburg, A. Pavlova, Haemophilia, Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX, Haemophilia 6, 15-22 (2006)

8: G. Castman, Desmopressin for the treatment of haemophilia,

Haemophilia 14, 15-20 (2008)

9: Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada, Hemophilia and von Willebrand's disease: 2. Management, Canadian Medical Association Journal 153, 147-157 (1995)

10: A. Poustka, A. Dietrich, G. Langenstein, D. Toniolo, S. Warren, H. Lehrach, Physical map of human Xq27-qter: Localizing the region of the fragile X mutation, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88, 8302-8306 (1991)

11: T. C. Abshire, Current Concepts, Postgraduate Institut for Medicine , 3-24 (2005)

12: N. Klopp, J. Oldenburg, C. Uen, R. Scheppenheim, J. Graw, Hemophilia A Patients without Mutations in the Factor VIII Encoding Gene, Thrombosis and Haemostasis 88, 357-360 (2002)

13: M. M. Frank, Hereditary angioedema, Current Opinion in Pediatrics 17(6), 686-689 (2005)

14: K. Bork, Rezidivierende Angiooedeme durch C1-Inhibitor-Mangel Erstickungsrisiko, Deutsches Ärzteblatt 94, 726-737 (1997)

15: H. J. Longhurst, S. Carr, K. Khair, C1-inhibitor concentrate home therapy for hereditary angioedema, Clinical and Experimental Immunology 147, 11-17 (2006)

16: C. R. Weiler, R. G. Van Dellen, Genetic Test Indications and Interpretations in Patients With Hereditary Angioedema, Mayo Clinic Proceedings 81, 958-972 (2006)

- 17: M. M. Frank, H. Jiang, New therapies for hereditary angioedema: Disease outlook changes dramatically, *Journal of Allergy and clinical Immunology* 121, 272-280 (2008)
- 18: K. Bork, D. Gül, J. Hardt, G. Dewald, Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor: Clinical Symptoms and Course, *The American Journal of Medicine* 120, 987-992 (2007)
- 19: M. Margaglione, G. Castaman, M. Morfini, A. Rocino, E. Santagostino, G. Tagariello, A. R. Tagliaferri, E. Zanon, M. P. Bicocchi, G. Castaldo, F. Peyvandi, R. Santacroce, F. Torricelli, E. Grandone, P. M. Mannucci, and the AICE-Genetics Study Group, The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype, *Haematologica* 93, 722-728 (2008)
- 20: M. Aquila, M. Pasino, T. Lanza, F. Bottini, A. C. Molinari, M. P. Bicocchi, Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy, *Haematologica* 89, 758-759 (2004)
- 21: M. Higuchi, S. E. Antonarakis, L. Kasch, J. Oldenburg, E. Economou-Petersen, K. Olek, M. Arai, H. Inaba, and H. H. Kazazian, Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutations in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 8307-8311 (1991)
- 22: O. El-Maarri, U. Herbiniaux, J. Graw, J. Schröder, A. Terzic, M. Watzka, H. H. Brackmann, W. Schramm, P. Hanfland, R. Schwab, C. R. Müller and J. Oldenburg, Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 332-339 (2005)

23: W. C. Nichols, U. Seligsohn, A. Zivelin, V. H. Terry, C. E. Hertel, M. A. Wheatley, M. J. Moussalli, H.-P. Hauri, N. Ciavarella, R. J. Kaufman, and D. Ginsburg, Mutation in the ER-Golgi Intermediate Compartment Protein ERGIC-52 Cause Combined Deficiency of Coagulation Factors V and VIII, *Cell* 93, 61-70 (1998)

24: A. C. Goodeve and I. R. Peake, The Molecular Basis of Hemophilia A: Genotype-Phenotype Relationships and Inhibitor Development, *Seminars In Thrombosis and Haemostasis* 29, 23-30 (2003)

25: S. L. Murphy, K. A. High, Gene therapy for haemophilia, *British Journal of Haematology* 140, 479-487 (2008)

26: F. D. Urnov, J. C. Miller, Y. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, P. D. Gregory & M. C. Holmes, Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases, *Nature* 435, 646-651 (2005)

27: J. J. Toole, D. D. Pittman, E. C. Orr, P. Murtha, L. C. Wasley, R. Kaufman, A large region (≈ 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83, 5939-5942 (1986)

28: Z. Yan, Y. Zhang, D. Duan, J. F. Engelhardt, Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 6716-6721 (2000)

29: J. C. Grieger, R. J. Samulski, Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Serotypes: Impact of Larger Genomes of Infectivity and Postentry Steps, *Journal of Virology* 79, 9933-9944 (2005)

30: T. VandenDriessche, V. Vanslembrouck, I. Goovaerts, H. Zwinnen, M.-L. Vanderhaeghen, D. Collen, and M. K. L. Chuah, Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 10379-10384 (1999)

31: T. A. G. Smith, M. G. Mehaffey, D. B. Kayda, J. M. Saunders, S. Yei, B. C. Trapnell, A. McClelland & M. Kaleko, Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice, *Nature Genetics* 5, 397-402 (1993)

32: M. K. Kay, C. N. Landen, S. R. Rothenberg, L. A. Taylor, F. Leland, S. Wiehle, B. Fang, D. Bellinger, M. Finegold, A. R. Thompson, M. Read, K. M. Brinkhous, and S. L. C. Woo, In vivo hepatic gene therapy: Complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 2353-2357 (1994)

33: T. Gößwein, A. Kocot, G. Emmert, W. Kreuz, I. Martinez-Saguer, E. Aygören-Pürsün, E. Rusicke, K. Bork, J. Oldenburg, C. R. Müller, Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema, *Cytogenetic and Genome Research* 121, 181-188 (2008)

34: K. Bork, S.-E. Barnstedt, P. Koch, H. Traupe, Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women, *The Lancet* 356, 213-217 (2000)

35: G. Dewald, K. Bork, Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1

inhibitor, Biochemical and Biophysical Research Communications 343, 1286-1289 (2006)

36: M. Frank, Hereditary angioedema, Journal of Allergy and Clinical Immunology 121, 398-401 (2008)

37: P. J. Gorman, Hereditary angioedema and pregnancy - A successful outcome using C1 esterase inhibitor concentrate, Canadian Family Physician - Le Médecin de famille canadien 54, 365-366 (2008)

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

BMD	Becker'sche Muskeldystrophie
CCE	Central core disease
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DHPLC	Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
DMD	Duchenne'sche Muskeldystrophie
F8	Faktor VIII
F9	Faktor IX
FRAX	Fragiles X-Syndrom
FSHD	Fazio-Skapulo-Humerale Muskeldystrophie
HAE	Hereditäres Angioödem
INH	Inhibitor
IVS	Informationsvermittlungsstelle
LGMD	Gliedergürtelmuskeldystrophie
MHS	Maligne Hyperthermie
MyD	Myotone Dystrophie
OPMD	Oculopharyngeale Muskeldystrophie
PCR	Polymerase Kettenreaktion
SCS	Saethre-Chatzen-Syndrom
SMA	Spinale Muskelatrophie
SS	Schwangerschaft

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Holger Höhn, der diese Arbeit am Institut für Humangenetik ermöglicht hat. Vielen Dank auch für den guten Kaffee, den leckeren Kuchen und die heitere Atmosphäre.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Astrid Bechtold für die ausdauernde Betreuung und Unterstützung bedanken.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Simone Hasenmüller für die ausführliche Veranschaulichung der labortechnischen Möglichkeiten.

Ich danke Herrn Dr. Wolfgang Feichtinger für die spannende Führung durch das Sequenzierungslabor.

Ein sehr herzliches Dankeschön an Claudia Junius und Dorothee Kellner für die gute Zusammenarbeit bei der Datenerfassung.

Tausend Dank an meine Frau Julia Kristin Gauß für die Geduld und ihr Verständnis, die sie mir während der gesamten Zeit entgegenbrachte.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frieder Gauß

Wohnort: Sandbergstr. 73, 64285 Darmstadt

Geburtsdatum: 03.01.1983

Geburtsort: Stuttgart-Bad Cannstatt

Ehefrau: Julia Kristin Gauß, geb. 18.01.1984,
Diplom-Gesangspädagogin

Eltern: Dr. Gerhard Heydt, Arzt
Angelika Heydt, geb. Baur, Musiklehrerin,
Heilpraktikerin für Psychotherapie

Geschwister: Walter Heydt, geb. 16.02.1981, Dipl.-Ingenieur
Technische Kybernetik in München

Anne Heydt, geb. 04.09.1984, Studentin
Schulmusik und Germanistik in Freiburg

Ulrike Heydt, geb. 23.06.1988, Studentin
Musikgeschichte in Tübingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

2002 Fanny-Leicht-Gymnasium in Stuttgart-
Vaihingen, Abschluss: Abitur (2,0)

Sprachkenntnisse: Englisch, Französisch

Zivildienst

07/2002 Rettungsdienst und Krankentransport
Deutsches Rotes Kreuz, Böblingen

Medizinische Ausbildung

- 2002 Ausbildung zum Rettungshelfer (1,5),
Deutsches Rotes Kreuz, Böblingen
- 2004 Ausbildung zum Rettungssanitäter (1,5),
Bayerisches Rotes Kreuz, Würzburg
- 2003 bis 2009 Studium: Medizin
Universität Würzburg
Abschluss: Staatsexamen
- seit 2006 Dissertation:
Genetische Diagnostik bei Hämophilie A
und Hereditärem Angioödem:
eine retrospektive Studie,
Prof. H. Höhn, Institut für Humangenetik,
Universität Würzburg

Musikalische Ausbildung

- 1988 bis 2003 Klavierunterricht,
Musikschule Stuttgart
- 1991 bis 2003 Gesangsunterricht,
Staatstheater Stuttgart, Musikhochschule
Stuttgart, Knabenchor Collegium Juvenum
Stuttgart, u.a.
- 1992 bis 1999 Cellounterricht,
Stuttgart
- 1996 bis 2003 E-Bass-Unterricht,
Musikschule Waldenbuch
- 2001 Workshop, Die Kunst des Übens bei Hanna Feist,
Arbeitskreis Musik in der Jugend, Aub

Praktikum

- 2002 Medizinische Intensivstation,
Kreiskrankenhaus Böblingen

2003	OP septische Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg
2004	Pflegepraktikum Neurologie, Universitätsklinik Würzburg
2006	Famulatur Innere Medizin / Allgemeinmedizin Praxis Dr. med. Schumm, Dr. med. Arnold, Filderstadt
2006	Famulatur Humangenetik, Universität Würzburg
2007	Famulatur Neurologie, Klinikum Darmstadt-Eberstadt
2007	Famulatur Innere Medizin, Klinikum Darmstadt
2008	Praktisches Jahr 1. Tertial: Neurologie, Universität Würzburg
2008	Praktisches Jahr 2. Tertial: Innere Medizin, Universität Würzburg
2008/2009	Praktisches Jahr 3. Tertial: Chirurgie, Spitalzentrum Biel, Schweiz

Anstellungen / Tätigkeiten

1999 bis 2001	Kepler-Seminar für Naturwissenschaften, Stiftung für Bildung und Behindertenförderung GmbH
1999 bis 2001	Aushilfskraft, Institut für Automatisierungs- und Softwaretechnik, Universität Stuttgart
2003 bis 2009	Rettungsdienst, Krankentransport und Blutfahrdienst, Ehrenamt, Bayerisches Rotes Kreuz, Würzburg

seit 2006 Selbstständiges Gewerbe im Bereich IT- und
EDV-Dienstleistungen

Interessen und Hobbys

seit 1988 Musik: Mitwirkung bei Konzerten, Komponieren,
Besuch von Konzerten, Oper, etc.

1998 bis 2002 Tanzkurse: Tanzschule Dieterle, Stuttgart



Fritz Bauer