

# Charakterisierung und Expressionsanalysen von Hämophilie-A-Mutationen

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Melanie Andrea Zimmermann  
geboren in Erlenbach

Würzburg, Dezember 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2010 bis Dezember 2012 am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Müller-Reible angefertigt.

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

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

Es wurde zuvor kein anderer akademischer Grad erworben.

Würzburg, Dezember 2012

---

Melanie Zimmermann

## Inhaltsverzeichnis:

1	Zusammenfassung .....	1
2	Summary .....	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Würzburger Geschichte der Blutgerinnung .....	5
3.2	Hämostase .....	6
3.2.1	Zelluläre Hämostase.....	6
3.2.2	Plasmatische Hämostase .....	7
3.2.2.1	Extrinsische Aktivierung.....	7
3.2.2.2	Intrinsische Aktivierung.....	8
3.2.2.3	Regulation der Blutgerinnung .....	10
3.2.2.4	Fibrinolyse .....	11
3.3	Faktor VIII .....	12
3.3.1	Faktor-VIII-Gen.....	12
3.3.1.1	Aufbau .....	12
3.3.1.2	Besonderheiten .....	12
3.3.2	Faktor-VIII-Protein .....	13
3.3.2.1	Biosynthese .....	13
3.3.2.2	Struktur.....	16
3.4	Hämophilie A .....	18
3.4.1	Symptome .....	18
3.4.2	Pathologie .....	19
3.4.3	Diagnostik.....	24
3.4.4	Therapie .....	26
3.4.5	Hemmkörperhämophilie.....	27
4	Zielsetzung .....	29

5	Methodische Details .....	31
5.1	Charakterisierung von Promotor-Mutationen im Faktor-VIII-Gen.....	31
5.2	Methylierungsuntersuchungen im Faktor-VIII-Gen.....	31
5.3	Faktor-VIII-mRNA-Analysen zur Identifizierung von Spleißstellen-Mutationen und stillen Mutationen .....	31
5.4	Charakterisierung von Duplikationsbruchpunkten im Faktor-VIII-Gen.....	31
5.5	Analyse von auffälligen Intron-22- und Intron-1-Inversionen .....	31
5.6	Untersuchung von Faktor-VIII-Nonsense-Mutationen im Hinblick auf die Entwicklung von Hemmkörpern .....	32
6	Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse .....	33
6.1	Charakterisierung von Promotor-Mutationen im Faktor-VIII-Gen.....	33
6.2	Methylierungsuntersuchungen im Faktor-VIII-Gen.....	37
6.3	Faktor-VIII-mRNA-Analysen zur Identifizierung von Spleißstellen-Mutationen und stillen Mutationen .....	41
6.4	Charakterisierung von Duplikationsbruchpunkten im Faktor-VIII-Gen.....	45
6.5	Analyse von auffälligen Intron-22- und Intron-1-Inversionen .....	52
6.6	Untersuchung von Faktor-VIII-Nonsense-Mutationen im Hinblick auf die Entwicklung von Hemmkörpern .....	55
7	Fazit und Ausblick .....	63
8	Literaturverzeichnis .....	65
9	Abkürzungsverzeichnis.....	76

10	Liste der vorgelegten Publikationen .....	79
11	Sonderdrucke der vorgelegten Publikationen .....	81
11.1	Anlage 1 .....	81
11.2	Anlage 2 .....	86
11.3	Anlage 3 .....	100
11.4	Anlage 4 .....	109
11.5	Anlage 5 .....	119
11.6	Anlage 6 .....	125
12	Curriculum vitae.....	142

# 1 Zusammenfassung

Bei einem kleinen Prozentsatz (2–3 %) aller molekulargenetisch untersuchten Hämophilie-A-Fälle konnte bislang keine kausale Mutation innerhalb der *F8*-Gen-Region aufgedeckt werden. Die molekularen Ursachen der Hämophilie dieser Patienten sollten im ersten Teil der vorliegenden Doktorarbeit mittels zusätzlicher Methoden aufgeklärt werden.

Bei zwei Patienten mit milder Hämophilie A konnte je ein Basenaustausch im Promotorbereich des *F8*-Gens identifiziert werden. Um die Kausalität dieser Austausche zu überprüfen, wurden für diese und zwei weitere bereits publizierte Promotor-Mutationen Luciferase-Assays durchgeführt. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass die nachgewiesenen Promotor-Mutationen die Aktivität des Promotors deutlich herabsetzen und daher als ursächlich einzustufen sind.

Weiterhin wurden die übrigen Patienten auf epigenetische Veränderungen in fünf CpG-Inseln im 5'UTR und Intron 1 des *F8*-Gens untersucht. Hierbei konnten bei drei Patienten auffällige Methylierungsmuster nachgewiesen werden, wobei diese auf ein Klinefelter-Syndrom und genomische Veränderungen im Intron 1 zurückzuführen sind, nicht jedoch auf einen aberranten Methylierungsstatus, der die FVIII-Expression beeinflussen könnte.

Mit Hilfe von mRNA-Untersuchungen konnten bei vier Patienten mit mutmaßlichen *F8*-Spleißmutationen aberrante *F8*-Transkripte nachgewiesen werden und somit die Kausalität der Mutationen geklärt werden. Des Weiteren wurden aus der Literatur alle bisher als kausal identifizierten stillen Mutationen und Spleißmutationen zusammengestellt, um mit diesen Ergebnissen die Spleißvorhersage-Software Alamut zu validieren. Die große Mehrzahl (78 %) der Spleißvorhersagen stimmte mit den Resultaten der mRNA-Untersuchungen (zumindest im Trend) überein, während es bei 22 % der Vorhersagen und mRNA-Analysen zu unterschiedlichen Resultaten kam.

Innerhalb einer vorangegangenen Diplomarbeit konnten zehn Duplikationsbruchpunkte im *F8*-Gen von nicht verwandten Hämophilie-A-Patienten aufgeklärt werden. Diese wurden nun mit verschiedenen *in-silico*-Programmen analysiert, um die Sequenzumgebung der Bruchpunkt genauer zu beschreiben. Die Untersuchung ergab, dass verschiedene Mechanismen zur Entstehung von Duplikationen führen können und vermutlich mehrere Sequenzmotive in direkter Nähe der Bruchpunkte hierzu beitragen.

Im Rahmen der molekulargenetischen Hämophilie-A-Diagnostik zum Nachweis von Intron-1- bzw. Intron-22-Inversionen sind einige Patienten mit schwerer Hämophilie A aufgefallen, welche ungewöhnliche Bandenmuster in den analytischen PCRs bzw. Southern-Blots aufwiesen. Mittels MLPA-Analysen wurden bei diesen Patienten Deletionen oder Duplikationen (CNVs) aufgedeckt, die meist allein die auffälligen Bandenmuster nicht erklären konnten. Weitere Long-Range-PCR-Untersuchungen belegten dagegen, dass fünf der untersuchten Fälle auf ein kombiniertes Inversions- und Duplikations- bzw. Deletionsereignis zurückzuführen sind.

Als zweiter Teil der Arbeit wurden Transkriptions- und Translationsuntersuchungen von Nonsense-Mutationen des *F8*-Gens in einem zellulären Expressionssystem durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass trotz Nonsense-Mutation eine komplette *F8*-Transkription stattfindet. Antigenanalysen konnten die Expression von trunkierten Proteinen nachweisen, wenn die Nonsense-Mutationen in der leichten Kette, d.h. den distalen Domänen A3, C1 oder C2, lag. Bei Nonsense-Mutationen in der schweren Kette (den proximalen Domänen A1, A2 oder B) war keine Proteinexpression nachweisbar. Diese Daten konnte durch intrazelluläre Immunlokalisation der trunkierten Proteine bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die B-Domäne eine wichtige Rolle bei der Proteinprozessierung spielt, vermutlich indem sie die Bindung von Chaperonen ermöglicht und das FVIII-Protein vor Degradation schützt.

## 2 Summary

Molecular *F8* gene diagnostic procedures fail to reveal any causal mutation in 2–3 % of haemophilia A patients. In the first part of this thesis, DNA samples from these patients were analyzed to identify ‘non canonical’ *F8* gene mutations.

Two of these patients showed single base substitutions in the promoter region of the *F8* gene. These two and two further previously reported nucleotide substitutions were analyzed by luciferase assays for their promoter activities. *F8* promoter activity levels were clearly reduced due to the base substitutions illustrating the causality of these promoter mutations.

The remaining patients were investigated for methylation aberrations in five CpG islands in the 5’UTR and intron 1 of the *F8* gene. Three samples with aberrant methylation status were detected, of which one was caused by the second X chromosome in a haemophilia patient with Klinefelter syndrome and the other two were caused by as yet undefined genomic alteration in intron 1. No aberrant methylation status was detected which could have influenced FVIII expression.

In four patients with presumptive splice site mutations, mRNA analysis demonstrated the presence of aberrant *F8* transcripts and therefore mutation causality could be confirmed. In addition, all experimentally proven silent and splice site mutations were extracted from the literature and the experimental results were compared to those of splice site prediction tools of the software Alamut. In 78 % of cases, splice prediction was found in good agreement with mRNA analyses.

In my previous diploma thesis, the duplication breakpoints of ten unrelated haemophilia A patients with duplications in *F8* gene were characterized by PCR and sequencing. The sequence data flanking the breakpoints were now analyzed with *in silico* tools in order to identify sequence motifs which could suggest mechanisms for the generation of duplications. These analyses identified several sequence motives which are assumed to contribute to DNA-repair-related rearrangements and suggested different mechanisms to be involved in the origin of duplications.

Upon routine molecular diagnostic analysis of *F8* intron 1 and intron 22 inversions by PCR or Southern blotting, a few haemophilia A patients with severe phenotype had revealed inconsistent band patterns. Subsequent MLPA analysis in five of these patients identified additional deletions or duplications (CNVs) which could not fully ex-

plain the abnormal band patterns. Further long range PCR experiments provided hints to a combination of CNV and inversion events.

In the second part of this thesis, *in vitro* FVIII expression analyses were performed to investigate the impact of nonsense mutations in the *F8* gene on transcription and translation. *F8* mRNA analyses of both wild type and mutated constructs showed transcription of full-length mRNA. Polyclonal antigen assays were able to detect truncated proteins in cell lysates transfected with *F8* constructs carrying nonsense mutations in the distal light chain, i.e. domains A3, C1 or C2. No protein expression was detectable from *F8* constructs harbouring nonsense mutations in the proximal heavy chain, i.e. domains A1, A2 or B. These data were confirmed by intracellular immune localization of the truncated proteins. These results suggest an important role of the B domain during intracellular protein processing: it likely enables chaperone binding and thus protects the FVIII protein from degradation.

## 3 Einleitung

### 3.1 Würzburger Geschichte der Blutgerinnung

Die Erforschung der Blutgerinnung und ihrer Störungen hat an der Universität Würzburg eine lange Tradition. Johann Lukas Schönlein (1793–1864), der 1817 bis 1832 unter anderem als Leiter der inneren Medizin der Universitätsklinik in Würzburg wirkte [1], prägte den Namen der häufigsten Blutgerinnungsstörung „Hämophilie“ (aus dem Griechischen: αἷμα = Blut, φίλος = Freund [2]). Zudem lieferte er auch eine bis heute noch gültige Beschreibung des zugehörigen Krankheitsbildes [3-5]. Im Jahr 1849 nahm Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821–1902) seine Arbeit in der Würzburger Pathologie auf [6, 7] und machte hierbei entscheidende Analysen zur pathologischen Physiologie des Blutes. Insbesondere erkannte und benannte er Fibrinogen als Vorstufe des Fibrins [3]. Weiterhin befasste sich Paul Morawitz (1879–1936) intensiv mit der Aufklärung der Blutgerinnungsabläufe und stellte ein allgemeingültiges Schema auf, in welchem Prothrombin durch Gewebsthrombokinase in Thrombin überführt wird und anschließend Fibrinogen aktiviert [8]. In seiner Zeit als Lehrstuhlinhaber in Würzburg (1921–1926) wies er vor allen Dingen auf die Wichtigkeit der Blutuntersuchung als diagnostisches Hilfsmittel von Bluterkrankungen hin und verfasste hierzu auch eine Monografie [3, 9]. Edgar Wöhlisch (1890–1960) promovierte 1923 über Hämophilie in der inneren Medizin, bevor er zunächst drei Jahre (1924 bis 1927) als Privatdozent am Physiologischen Institut der Universität Würzburg verbrachte. 1932 kehrte er als Professor und Leiter des Physiologischen Institutes zurück, wo er bis 1957 tätig war [10]. Hierbei entstanden unter seiner Leitung wichtige Arbeiten über die Rolle von Thrombin, Fibrinogen, Kalzium und Thrombozyten während der Blutgerinnung wie auch wichtige Beiträge zum Thema Bluterkrankheit (Hämophilie) [3, 11, 12]. Wöhlischs Assistent Heinz Schröer (geb. 1922) habilitierte sich mit dem Thema „Zur Frage des Mechanismus der Prothrombinaktivierung“ [3, 13]. In seiner wissenschaftlichen Laufbahn befasste sich Schröer vor allen Dingen mit Arbeiten zur Wirkungsweise von Heparin, ausführlichen Studien über Prothrombin, Untersuchungen zur Auslösung der Gerinnungskaskade und der Wechselwirkung zwischen strömendem Blut und Gefäßwand [3, 14–17]. In der Würzburger Pädiatrie war die Blutgerinnung bei Neugeborenen ein langjähriges Arbeitsgebiet von Josef Ströder (1912 bis 1993), Wolfgang Künzer (1919–2011), Harald Haupt (1924-2010) und Anne-Marie

Mingers (geb. 1930), die 1974 ein Übersichtsband zur Pathogenese der Hämophilie und anderer hereditärer Koagulopathien verfasste [3, 18-28].

Am Institut für Humangenetik etablierte Johannes Oldenburg (geb. 1960) die molekulargenetische Hämophilie-Diagnostik und habilitierte sich 1998 mit dem Thema „Molekulargenetische Untersuchungen zur Diagnostik, Pathogenese und Klinik der Hämophilie A und B“ [18]. In diese Zeit fällt auch die Identifizierung des VKORC1-Proteins, des Schlüsselproteins der Gerinnungsbehandlung mit Warfarinderivaten [19].

## 3.2 Hämostase

Im Jahr 1953 kreierte Rudolf Marx (1912–1990) den Begriff Hämostaseologie, der die „Lehre vom Stehen und Steckenbleiben des Blutes“ beschreiben sollte [20]. Heute wird die Bedeutung dieses Begriffs besser veranschaulicht durch die Definition der „Lehre der Regulation und Dysregulation des Hämostasesystems“ [21]. Die „Hämostase“ selbst stellt die Summe aller Reaktionen dar, welche zu einer effektiven Blutstillung beitragen, ein Zusammenspiel von Thrombozyten, plasmatischem Gerinnungssystem und Fibrinolyse-System [22].

### 3.2.1 Zelluläre Hämostase

Die thrombozytäre Blutstillung wird durch eine Verletzung des Gefäßendothels ausgelöst, bei welcher Gewebszellen und subendotheliale Matrixproteine wie Kollagen freigelegt werden. An jene Proteine bindet der Von-Willebrand-Faktor (vWF), der im Blut zirkuliert und unter Einwirkung von Scherkräften seine molekulare Struktur ändert. Hierdurch werden Bindestellen am vWF für den thrombozytären Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex frei, der an der Oberfläche von Thrombozyten (Blutplättchen) ausgebildet wird. Dies ermöglicht den Thrombozyten eine Bindung an den vWF [22]. Unmittelbar nach der Anlagerung der Thrombozyten kommt es durch die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium zur Kontraktion des thrombozytären Zytoskeletts, die einen sogenannten „Shape Change“ der Plättchen nach sich zieht. Dieser ist durch die Ausbildung von Pseudopodien am Thrombozyten gekennzeichnet, welche eine Vernetzung von Plättchen untereinander ermöglichen [23]. Weiterhin werden thrombozytäre Inhaltsstoffe aus den Granula freigesetzt: Vasokonstriktorische Substanzen wie Serotonin und Adrenalin fördern die Gefäßverengung, während Adhäsivproteine wie ATP (Adenosintriphosphat), Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Thrombospondin

eine Aggregatbildung durch Fibrinogenbrücken zwischen den Plättchen fördern. Zudem werden auch Prozessbeschleuniger wie ADP (Adenosindiphosphat), PAF (Plättchenaktivierender Faktor), Thrombospondin und Thromboxan A<sub>2</sub> und eigene Gerinnungsfaktoren freigesetzt, die in der parallel laufenden plasmatischen Gerinnung benötigt und durch Phospholipide oder Kalzium-Ionen am Thrombozyten gebunden werden [24]. Dieses System der thrombozytären Blutstillung wird durch das in der plasmatischen Gerinnung gebildete Thrombin reguliert [22].

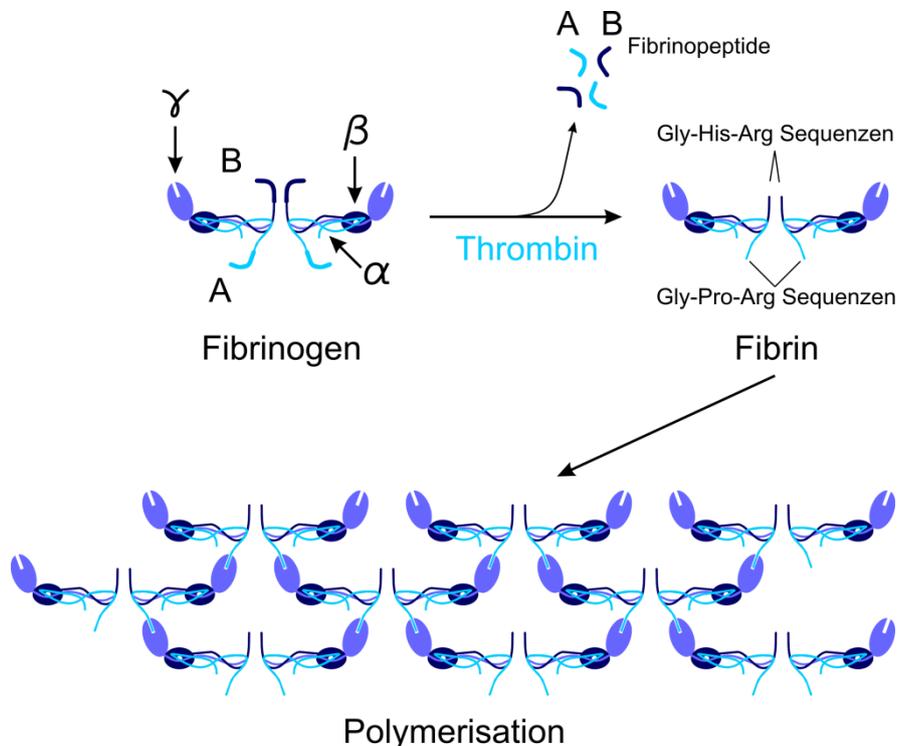
### 3.2.2 Plasmatische Hämostase

Gleichzeitig zur Bildung des thrombozytären Gefäßverschlusses findet auch die plasmatische Gerinnungsaktivierung statt, welche ein Abfolge von proteolytischen Prozessen darstellt, die letztendlich in der Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin münden. Das gebildete Fibringerinnsel bildet zusammen mit den Thrombozytenaggregaten einen irreversiblen hämostatischen Pfropf. Bei der plasmatischen Gerinnung spielen verschiedene Gerinnungsfaktoren eine Rolle, die als Enzyme (Serinproteinasen) oder Kofaktoren wirken. Die meisten Gerinnungsfaktoren werden ausschließlich in der Leber synthetisiert und liegen als inaktive Vorstufen im zirkulierenden Blut vor [23, 24]. Einige der Gerinnungsfaktoren sind Vitamin K abhängig, da sie nur mit Hilfe des Koenzyms Vitamin K in ihre physiologisch aktivierbare Form im ER (endoplasmatisches Retikulum) carboxyliert werden können. Hierzu gehören die Faktoren II, VII, IX und X, die sich in ihrer Protein-Struktur sehr ähnlich sind [22, 25].

#### 3.2.2.1 Extrinsische Aktivierung

Durch eine Gewebsverletzung kommt Gewebefaktor (TF, tissue factor) aus dem Subendothel in Kontakt mit Faktor VII (FVII), welcher im Gegensatz zu den anderen Gerinnungsfaktoren zu einem geringen Teil bereits in der aktiven Form (FVIIa) im Blut zirkuliert. Diese beiden Faktoren bilden den sogenannten extrinsischen Aktivierungskomplex oder auch FVIIa-TF-Komplex, der Faktor X (FX) als Substrat nutzt, um den aktiven Faktor X (FXa) herzustellen. Zusammen mit dem aktivierten Kofaktor V (FVa) bildet FXa den Prothrombinasekomplex, der proteolytisch sein Substrat Prothrombin (FII) spaltet, welches in seine aktive Form Thrombin (FIIa) übergeht. Mit steigender Thrombinkonzentration kommt es weiterhin zu einem zunehmenden Umsatz des Thrombinsubstrats Fibrinogen (FI). Dabei werden aus dem Fibrinogenmolekül die Fibrinpeptide A und B abgespalten, wodurch sich die Molekülstruktur ändert

und die entstandenen Monomere (F1a) polymerisieren können (Abbildung 1). Ein weiteres Substrat des Thrombins ist Faktor XIII (FXIII), der in seiner aktiven Form für die Quervernetzung des Fibrinnetzes verantwortlich ist [22, 26] (Abbildung 2).



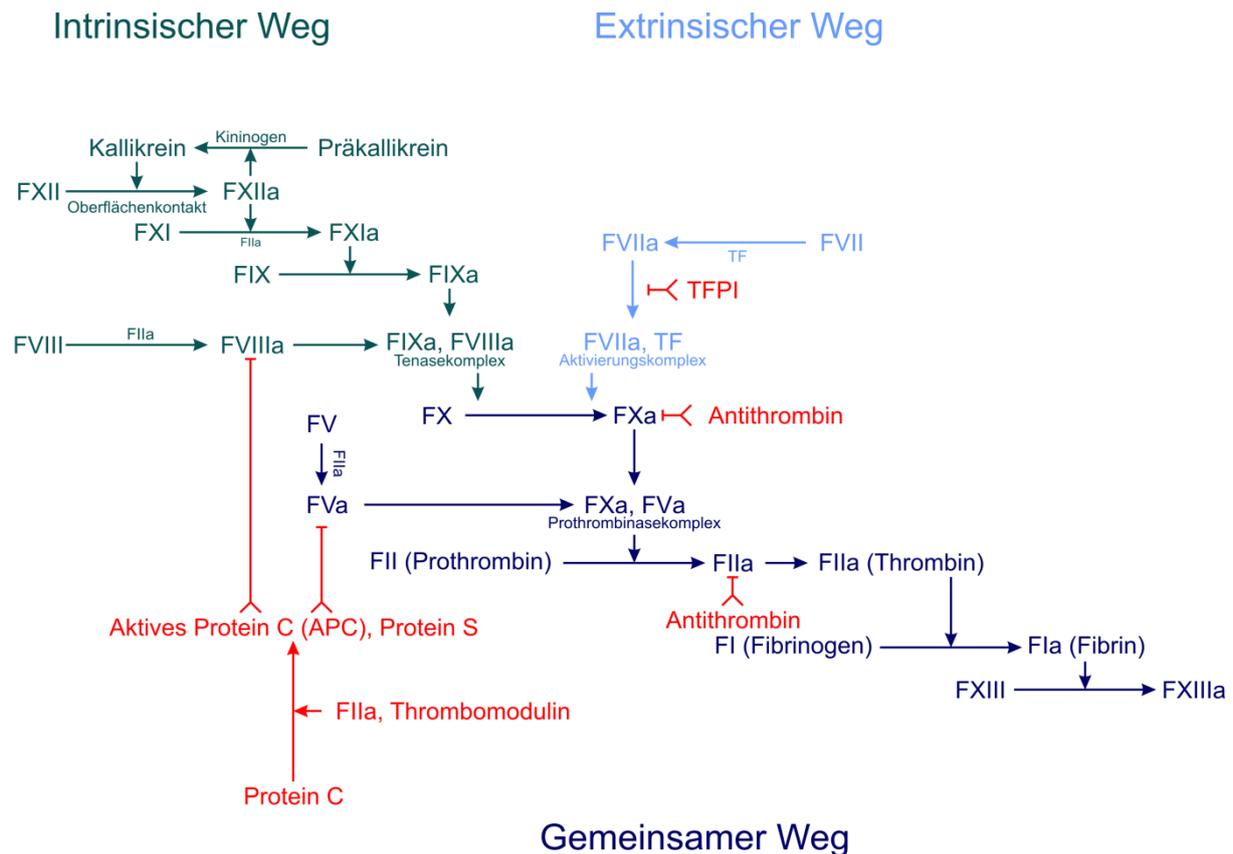
**Abbildung 1:** Veranschaulichung des Polymerisierungsprozesses der Fibrinmonomere. Fibrinogen setzt sich aus je zwei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammen. Dieses Proteinhexamer wird von Thrombin an insgesamt vier Arginin-Glycin-Peptidbindungen gespalten. Hierdurch können die neuen Carboxylenden der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten mit den Aminotermini der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Ketten interagieren, wodurch ein Fibrinpolymer entsteht [27].

### 3.2.2.2 Intrinsische Aktivierung

Die intrinsische Gerinnungsaktivierung ist physiologisch von minderer Bedeutung. Tatsächlich vermutet man, dass dieses System sogar ein Laboratoriumsartefakt darstellt, welches durch Kontaktaktivierung entdeckt wurde [28]. Trotzdem ist die intrinsische Gerinnung nicht zu vernachlässigen, da das extrinsische und das intrinsische System miteinander verknüpft sind. Wie schon erwähnt, wird die intrinsische Aktivierung durch den Kontakt von negativen Oberflächenladungen gestartet, die *in vivo* durch Endothelschädigung oder Zellfragmente entstehen. Hierdurch kann autokatalytisch entstandener aktivierter Faktor XII (FXIIa) mit Hilfe des HMWK (high-molecular-weight kininogen) die Umwandlung von Präkallikrein in aktives Kallikrein unterstützen. Das gebildete Kallikrein aktiviert wiederum Faktor XII (FXII) und beschleunigt somit enorm die Herstellung von FXIIa, welcher für die Bildung von aktiviertem Faktor

XI (FXIa) aus Faktor XI (FXI) erforderlich ist. Über die Aktivierung von Faktor IX (FIX) durch FXIa kann mit Hilfe von aktiviertem Faktor VIII (FVIIIa) der Tenasekomplex gebildet werden. Dieser ist verantwortlich für die Umsetzung von Faktor X (FX) in aktivierten Faktor X (FXa). Ab hier mündet der intrinsische Weg in einen gemeinsamen Weg (siehe extrinsische Aktivierung), der letztendlich mit der Bildung von Fibrin endet [24, 26, 29].

Thrombin hat eine zentrale Rolle als Verstärker der initialen Gerinnungsphase. Durch die enzymatische Aktivierung der Kofaktoren V (FV) und VIII (FVIII) und dem Faktor XI (FXI) werden geschwindigkeitsbestimmende Schritte in der Blutgerinnungskaskade reguliert: Der aktivierte Faktor V (FVa) ist ein geschwindigkeitsbestimmender Kofaktor für die Bildung des Prothrombinasekomplexes, ähnlich wie der aktivierte Kofaktor VIII (FVIIIa) für die Bildung des Tenasekomplexes. Des Weiteren ist die Aktivierung des Faktor XI (FXI) durch Thrombin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der ausschlaggebend für die Bildung von aktiviertem Faktor IX (FIXa) ist. Durch die Wirkung von Thrombin kann die Blutgerinnungskaskade um einige Zehnerpotenzen verstärkt werden [22] (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Überblick über die plasmatische Blutgerinnungskaskade. Die intrinsische und die extrinsische Blutgerinnungsaktivierung münden in einen gemeinsamen Weg, der letztendlich zur Vernetzung von Fibrin führt. F = Gerinnungsfaktor, a = aktiviert.

### 3.2.2.3 Regulation der Blutgerinnung

Die Regulation des Gerinnungssystems ist daher von großer Bedeutung, um einen normalen Ablauf der Blutgerinnung zu gewährleisten. Der TFPI (tissue-factor-pathway-inhibitor) gehört zum antikoagulatorischen Kontrollsystem. Er greift sehr früh in die Kaskade ein, indem er gebunden an FXa den FVIIa-TF-Komplex blockiert und letztendlich als Quartärkomplex durch Endozytose eliminiert wird. Die Inhibitorwirkung von TFPI kann noch zusätzlich durch die Bindung von Protein S verstärkt werden [30, 31]. Die antikoagulatorische Wirkung von Protein C wird durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin an der Oberfläche von Endothelzellen ermöglicht. Der hieraus entstandene Thrombin-Thrombomodulin-Komplex ist für die Aktivierung des Protein C verantwortlich, einer Vitamin K-abhängigen Serinprotease, die in der Lage ist FVa und FVIIIa zu inaktivieren [32, 33]. Eine weitere endogene Kontrolle des Thrombins kann durch Serinproteaseinhibitoren wie Antithrombin III erfolgen. Ohne Anwesenheit von Heparin im Blut ist der Zugang zur Antithrombin-Bindestelle sterisch behindert. Daher inaktiviert es Thrombin nur geringfügig. Wenn

sich aber Heparin als Kofaktor anbietet und sich an eine zweite Bindestelle heftet, kommt es zu einer Konformationsänderung im Antithrombin III und damit zur Freilegung der Thrombin-Bindestelle. Die Inaktivierung des Thrombins wird also durch Heparin stark beschleunigt. Zudem inaktiviert Antithrombin III auch FXa [24, 32]. Die drei Genannten sind die Hauptakteure in der Regulation der Blutgerinnung. Weiterhin sind auch noch andere Inhibitoren an der Regulation beteiligt, wie z. B. Heparin-Kofaktor II [24, 34] (Abbildung 2).

#### 3.2.2.4 Fibrinolyse

Unter physiologischen Bedingungen ist der menschliche Körper in der Lage durch Gefäßschädigung entstandene Fibringerinnsel zu limitieren und entstandene Gerinnsel aufzulösen. Hierzu notwendig ist das Enzym Plasmin, welches Fibrin, Fibrinogen, FV und FVIII spaltet und damit inaktiviert. Auch hier wird zwischen einer intrinsischen und extrinsischen Aktivierung des Vorstufen-Proteins Plasminogen unterschieden: Extrinsisch kommt es durch eine direkte Aktivierung mit Hilfe des t-PAs (tissue type plasminogen activator) zur Bildung von Plasmin. Allerdings ist t-PA allein ein relativ schwacher Plasminaktivator. Bei Anwesenheit von Fibrin wird dessen Wirkung aber um einen Faktor 100 verstärkt [28]. Die intrinsische Aktivierung geschieht durch Kontakt mit unphysiologischen Oberflächen, die für die Entstehung von FXIIa verantwortlich sind. FXIIa wird wiederum benötigt für die Umsetzung von Präkallikrein in aktives Kallikrein. Gebildetes Kallikrein aktiviert zirkulierende Prourokinase zu Urokinase (u-PA), die Plasminogen aktiviert [22]. Plasmin hat einen positiven Effekt auf die Bildung von Prourokinase und Kallikrein kann auch direkt die Herstellung von Plasmin bewirken [24].

Die Fibrinolyseaktivität wird durch verschiedene Mechanismen reguliert: PAI-1, (plasminogen activator inhibitor-1) inaktiviert die Aktivatoren t-PA und u-PA, wie auch Thrombin und aktiviertes Protein C. Mittels Vitronektin kann außerdem die Aktivität von PAI-1 stabilisiert werden [35]. Weiterhin kann das intrazelluläre PAI-2 (plasminogen activator inhibitor-2) die Urokinase inhibieren und  $\alpha_2$ -Antiplasmin ist in der Lage mit hoher Spezifität und Reaktionsgeschwindigkeit Plasmin zu inaktivieren. Da das  $\alpha_2$ -Antiplasmin am N-terminalen Ende eine Peptidverlängerung besitzt, die als Substrat für FXIIIa wirken kann, wird das  $\alpha_2$ -Antiplasmin mit Fibrin quervernetzt. Das C-terminale Ende bindet an Plasmin, dessen aktives Zentrum in die direkte Nähe des

reaktiven Zentrums von  $\alpha_2$ -Antiplasmin gebracht wird, was die Wirkung von  $\alpha_2$ -Antiplasmin hinsichtlich der Plasminaktivierung drastisch verstärkt [22].

### 3.3 Faktor VIII

Faktor VIII (FVIII) ist die Bezeichnung für einen elementaren Kofaktor in der plasmatischen Gerinnung, der in seiner aktivierten Form für die Bildung des Tenasekomplexes unbedingt erforderlich ist.

#### 3.3.1 Faktor-VIII-Gen

Auf DNA-Ebene codiert das Faktor-VIII-Gen (*F8*) für das Faktor-VIII-Protein (FVIII).

##### 3.3.1.1 Aufbau

Wie im vorigen Kapitel über die plasmatische Hämostase beschrieben, ist das Faktor-VIII-Protein (FVIII), auch bekannt als anti-hämophiler Faktor (AHF), ein elementarer Kofaktor während der Blutgerinnung ohne bekannte Enzymaktivität. Die codierende DNA-Sequenz für das FVIII-Protein wurde erstmals von Gitschier et al. [36] kloniert und beschrieben. Das Faktor-VIII-Gen (*F8*) umfasst 186 kb (Kilobasen) und ist in 3`-5`-Richtung auf Xq28 lokalisiert, einer Telomer-nahen Region auf dem langen Arm des X-Chromosoms. Die genetische Information ist auf insgesamt 26 Exons verteilt, wobei 24 in ihrer Größe zwischen 69 und 344 bp (Basenpaaren) variieren. Die übrigen zwei Exons sind mit 1959 bp (Exon 26) und 3106 bp extrem groß [37]. Insgesamt beansprucht die codierende Sequenz des *F8*-Gens nur 5 % des gesamten Gens. Die restlichen 177 kb werden auf insgesamt 25 Introns aufgeteilt. Hierbei umfasst das kleinste Intron (Intron 17) nur 207 bp und das größte (Intron 22) 32,8 kb [36, 38].

##### 3.3.1.2 Besonderheiten

In dem größten Intron befindet sich innerhalb einer CpG-Insel (Cytosin-Phosphat-Guanin) ein bidirektionaler Transkriptionsstartpunkt zweier weiterer Gene, *F8A* und *F8B*. Während *F8A* intronlos 1,8 kb in entgegengesetzter Richtung zum *F8*-Gen transkribiert wird [39], erfolgt die Transkription von *F8B* in der gleichen Leserichtung wie das *F8*-Gen und beinhaltet ein *F8B*-spezifisches Exon und die Exons 23 bis 26 [40]. Bisher konnte noch keine genaue Funktion der Transkriptions- bzw. Translationsprodukte ermittelt werden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass *F8A* für

ein 40 kDa (Kilodalton) Protein codiert, welches mit dem Huntington Protein interagiert [41]. Die biologische Signifikanz dieses Proteins bleibt dennoch unbekannt. Untersuchungen mit einem *F8B*-Äquivalent im Maus-Genom weisen darauf hin, dass Defekte in diesem Gen zu Wachstumsverzögerungen, Mikrozephalie und schweren Augendefekten führen können [42].

Intron 22 enthält außerdem noch eine 9,5-kb-Region (int22h-1), die sich ungefähr 5,8 kb proximal zu Exon 22 befindet und sehr homolog zu zwei Regionen außerhalb des *F8*-Gens ist. Diese beiden homologen Regionen (int22h-2 und int22h-3) befinden sich distal in 497 kb bzw. 562 kb Entfernung von int22h-1, wobei int22h-2 in entgegengesetzter Richtung zu int22h-1 und int22h-3 vorliegt [43–45]. Ähnlich wie im Intron 22 existiert auch im Intron 1 eine Region (int1h-1), die außerhalb des Gens in einer homologen Version (int1h-2) wiederholt wird. Hierbei liegt int1h-1 15,3 kb proximal zu Exon 1 und ist distal 125 kb von int1h-2 entfernt [45, 46].

### 3.3.2 Faktor-VIII-Protein

Wie bei vielen Proteinen sind der Entstehungsprozess und die Struktur des endgültigen aktiven FVIII-Proteins sehr kompliziert und werden daher detailliert erläutert.

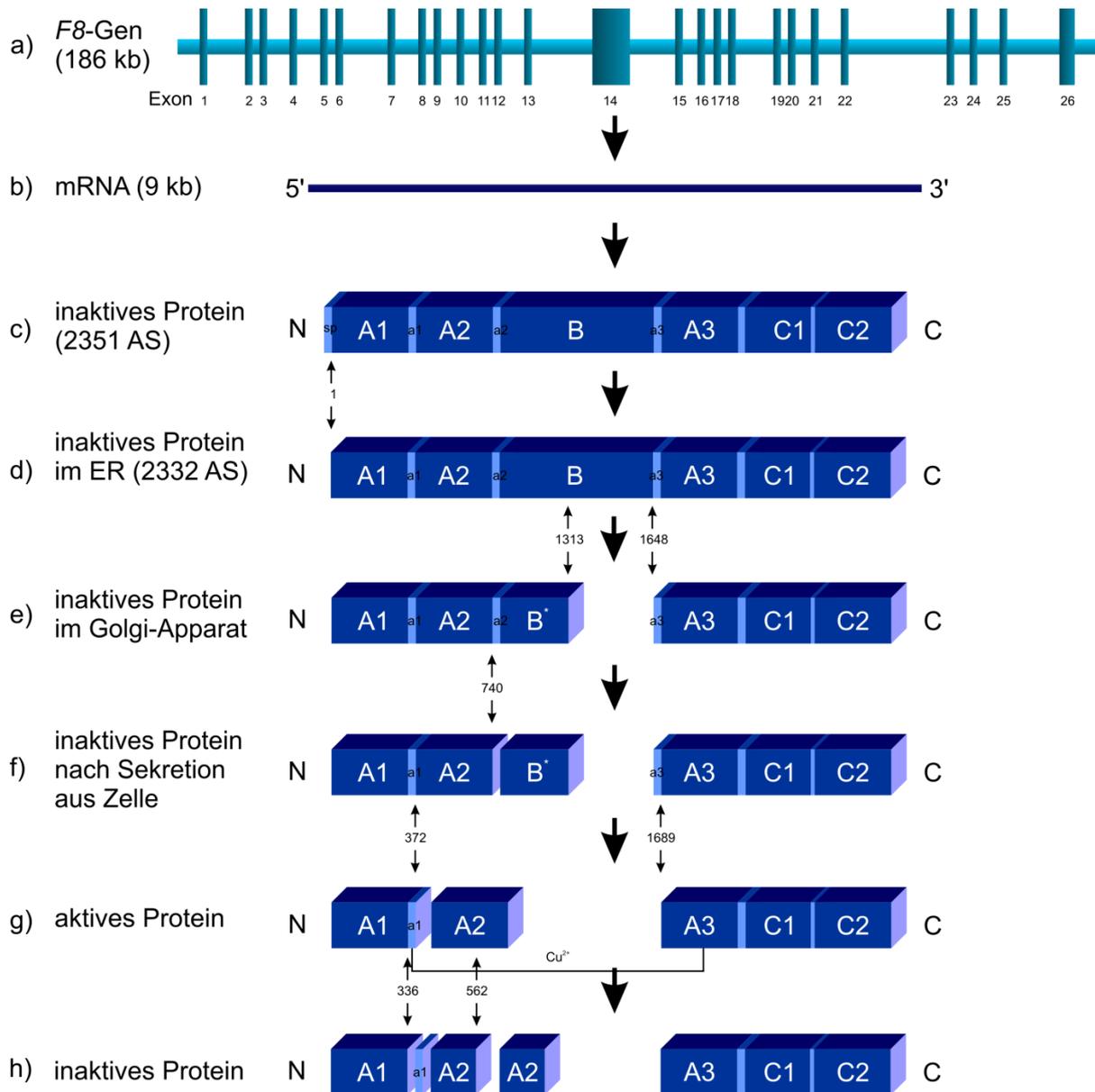
#### 3.3.2.1 Biosynthese

Hauptsyntheseorte für das FVIII-Protein sind vor allen Dingen sinusoidale Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Hepatozyten der Leber. Zusätzlich zeigen auch Glomeruli und tubuläre Epithelzellen in der Niere FVIII-Expression [47]. Dort wird das relativ große *F8*-Gen in eine reife mRNA übersetzt, die etwa 9 kb lang ist und einen eigenen 305 bp-langen Silencer enthält, welcher die eigene Expression inhibiert [48] (Abbildung 3 a + b). Die komplette cDNA codiert für ein 2.351 AS (Aminosäuren) umfassendes Präprotein (Abbildung 3 c). Das am Ribosom entstandene Protein wird durch das Signalpeptid (N-terminale 19 AS) zum ER geführt und in das ER hineingeschleust. Anschließend wird das Signalpeptid abgespalten, was zur Entstehung des FVIII-Hauptproteins mit 2332 AS führt [49, 50] (Abbildung 3 d). Dieses weist folgende Domänenstruktur auf: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Die Domänen a1, a2 und a3 sind kurze saure Regionen, die vor allen Dingen aus Aspartat- und Glutamat-Resten bestehen [51]. Sie flankieren die drei A-Domänen, welche eine 40-%ige-Homologie untereinander aufweisen. Die große Ähnlichkeit der A-Domänen mit dem kupferbindenden Ceruloplasmin deutet auf eine Metallionen-bindende Funktion dieser Domä-

nen hin. Die beiden C-Domänen teilen auch eine 40-%ige Homologie untereinander und mit Proteinen, die an negativ geladene Phospholipide binden. Daher wird angenommen, dass die C-Domänen eine wichtige Rolle bei Phospholipid-Interaktionen spielen. Im Gegensatz zu den A- und C-Domänen gibt es keine vergleichbare Proteinsequenz zur B-Domäne, die allein durch das Exon 14 codiert wird [51, 52]. Auf die genaue Struktur und Funktion des fertigen Proteins wird später genauer eingegangen. Im ER wird nun das Hauptprotein aus 2332 AS (ca. 300 kDa) in seine Tertiär-Struktur gefaltet und N-glykosyliert. Etwa zwei Drittel aller N-Glykosylierungsstellen befinden sich in der B-Domäne. Dort stabilisieren sie die Protein-Struktur und ermöglichen die Anlagerung von Chaperonen und Enzymen, die für die Sekretion des Proteins aus dem ER vonnöten sind [49, 53]. Speziell binden unter anderem die Chaperone Calnexin, ein integrales ER-Membran-Protein, und Calreticulin, ein luminales ER-Protein, an die N-Glykosylierungen der B-Domäne und sorgen für die Zurückhaltung von falsch gefalteten Proteinen, denen der Transport aus dem ER verwehrt wird und die degradiert werden. Calnexin und Calreticulin übernehmen somit eine wichtige Funktion als Qualitätskontrolleure [54]. Bei der Sekretion aus dem ER wird das FVIII-Protein von Vesikeln ummantelt, die zu dem ERGIC (endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment) verschmelzen. An den ERGIC-Komplex binden Transport-Rezeptoren wie das transmembrane LMAN1 (lectin mannose-binding 1) und sein Interaktionspartner MCFD2 (multiple coagulation factor deficiency protein 2), welche einen Transport zum Golgi-Apparat ermöglichen [55]. Im Golgi-Apparat angekommen unterliegt das Protein einer intrazellulären Proteolyse: Zwei Spaltungen erfolgen nach den Resten 1313\* (\*variabel) und 1648, die das FVIII-Protein in eine schwere Kette (A1-a1-A2-a2-B\*, 160-200 kDa) und eine leichte Kette (a3-A3-C1-C2, 80 kDa) teilen (Abbildung 3 e). Die beiden Ketten werden durch einen Metallionen-Komplex zusammengehalten. Weiterhin kommt es im Golgi-Apparat zu weiteren N- Glykosylierungen, O-Glykosylierungen und Sulfatierungen von spezifischen Tyrosin-Resten im FVIII-Protein [56, 57]. Das neu gebildete Hetero-Dimer wird in die Blutbahn sezerniert, wo es sofort mit dem vWF interagiert und eine feste, aber nicht-kovalente Bindung eingeht [58]. Diese Bindung an den Domänen A3 und C2 des Faktor VIII garantiert einen Schutz vor Abbau und Aktivierung [59]. Erst durch Spaltung mit Thrombin nach den Resten 372, 740 und 1689 wird das FVIII-Protein aktiv [60] (Abbildung 3 f + g). Es wird vermutet, dass es zunächst zur Spaltung zwischen der A2- und der B-Domäne kommt (nach Rest 740), die dann

die beiden anderen Spaltungen zwischen A1- und A2-Domäne (nach Rest 372) und zwischen a3- und A3-Domäne (nach Rest 1689) ermöglicht [61]. Die nun getrennte schwere Kette des aktivierten Proteins (A1-a1/A2-a2/A3-C1-C2, 54kDa/44kDa/72kDa) wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten, während die schwere und die leichte Kette immer noch über eine Metallionen-vermittelte Interaktion assoziiert sind [62]. Das aktivierte Protein zeigt eine sehr hohe Affinität zu Phospholipidoberflächen, löst sich daher vom vWF und kann dann als Kofaktor im Tenasekomplex fungieren, um aktiv an der Blutgerinnung teilzunehmen [63].

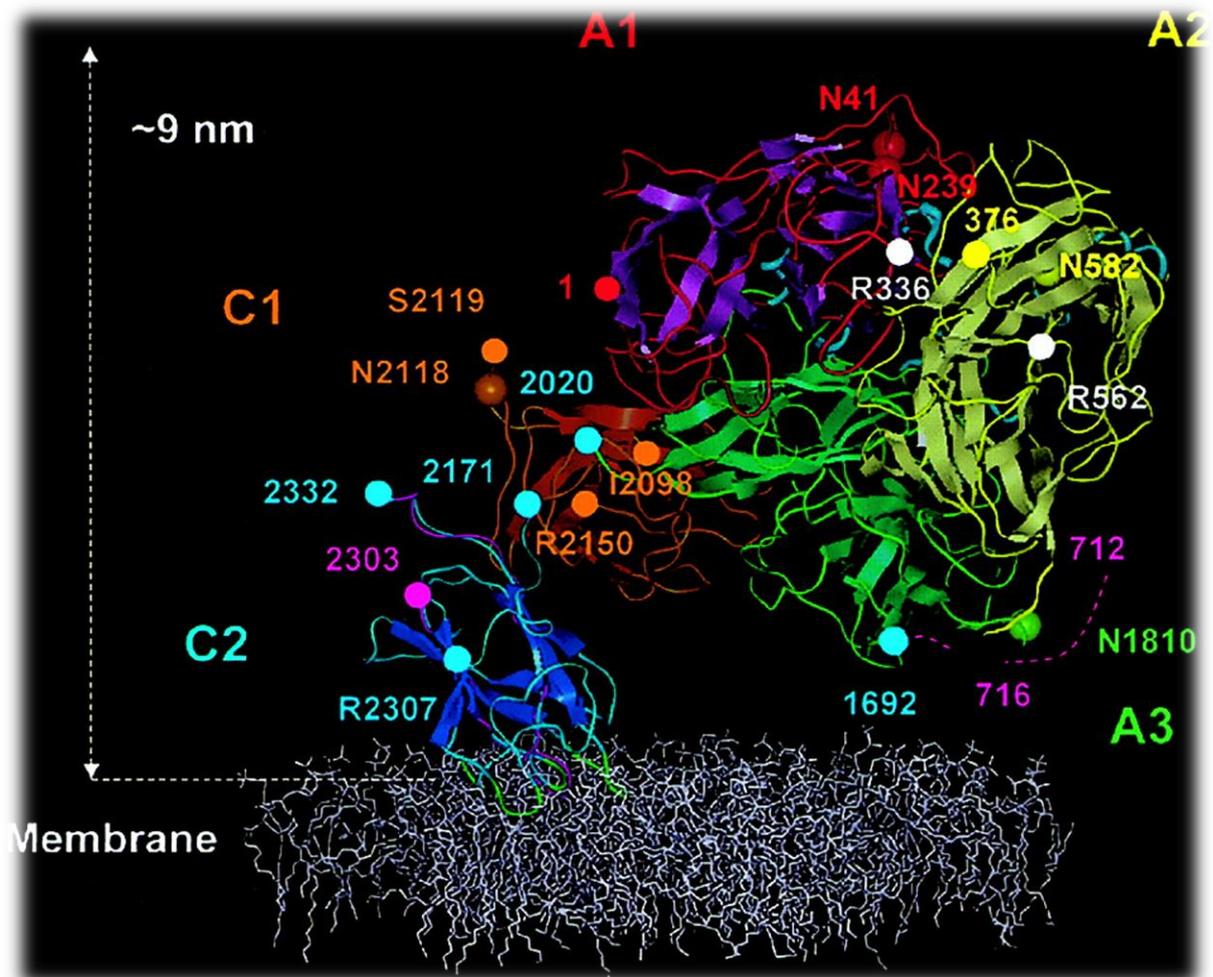
Die FVIII-Plasmakonzentration weist sehr starke interindividuelle Schwankungen auf und liegt bei ungefähr 200 ng/ml [64]. Als Normalbereich der FVIII-Aktivität (FVIII:C) im Blut werden 60–140 % eines Pools von gesunden Kontrollen angesehen, der als 100 % gesetzt wird [23]. Überraschenderweise ist die Halbwertszeit des FVIII-Proteins in der Zirkulation nur sehr kurz und beträgt etwa 2 h ohne vWF und etwa 12 h mit gebundenem vWF [64]. Dies ist auf die spontane Dissoziation der A2-Domäne vom Rest des Proteins und/oder auf proteolytische Degradierung durch diverse Enzyme zurückzuführen [62]. Hauptinaktivator ist das aktivierte Protein C (aPC), das FVIIIa nach den Resten 336 und 562 spaltet (Abbildung 3 h). Außerdem kann auch FX durch Spaltung nach den Resten 336 und 1721, wie auch FIX durch Spaltung nach 336 und 1719 das aktivierte Protein ineffektiv machen [45]. Bei der Beseitigung von inaktiven FVIII-Molekülen und von FVIII-Abbauprodukten im Plasma scheinen das LRP (lipoprotein receptor-related protein) und das ASGPR (asiaglycoprotein receptor) wichtige Aufgaben zu übernehmen [65, 66].



**Abbildung 3: Biosynthese des FVIII-Proteins.** a) *F8*-Gen; b) *F8*-mRNA; c) inaktives FVIII-Protein, aufgeteilt in sechs große Domänen; d) FVIII-Protein im ER nach Abspaltung des Signalpeptids (SP); e) FVIII-Protein im Golgi-Apparat nach zweimaliger Spaltung; f) und g) Aktivierung des FVIII-Proteins im extrazellulären Raum durch Thrombin; h) inaktives FVIII Protein im extrazellulären Raum.

### 3.3.2.2 Struktur

Im Jahr 2002 wurde die dreidimensionale Struktur des FVIII-Proteins durch Elektronen-Mikroskopie komplett aufgeklärt [67].



**Abbildung 4:** Dreidimensionales Modell eines membran-gebundenen FVIII-Proteins nach Stoilova-McPhie et al. [67]. Das FVIII-Protein ist in einer Phospholipidmembran verankert. Die A1-Domäne (Reste 1–336) ist in Magenta/Rot, die A2-Domäne (Reste 376–716) in Gelb, die A3-Domäne (Reste 1692–2020) in Grün, die C1-Domäne (Reste 2021–2170) in Orange und die C2-Domäne (Reste 2303–2332) in Blau dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass die drei A-Domänen (A1 = magenta, A2 = gelb, A3 = grün) jeweils zwei konservierte  $\beta$ -Fässer bilden und im Dreieck fast parallel zur Phospholipid-Oberfläche angeordnet sind. Hierbei bedeckt die A1-Domäne die C1-Domäne und die A2-Domäne ist in engem Kontakt mit der C2-Domäne [67]. Die Anordnung der drei A-Domänen bietet Bindestellen für Kalzium- und Kupfer-Ionen wie auch für FX und FIXa [68]. Die A3-Domäne befindet sich in direkter Nähe zu den C1- (C1 = rot) und C2-Domänen (C2 = blau), wobei die C1- und die C2-Domänen  $\beta$ -Sandwich-Strukturen bilden und mit diesen im rechten Winkel aufeinander stehen. Insgesamt sind vier Schleifen der C2-Domäne in die Lipid-Membran eingebettet [67]. Vor allem für die Bindung von vWF, FXa und natürlich Phospholipiden sind die C-Domänen unentbehrlich [68].

## 3.4 Hämophilie A

Die Krankheit Hämophilie (Synonym Bluterkrankheit) ist den hämorrhagischen Diathesen zuzuordnen. Dies sind Erkrankungen des Hämostasesystems mit dem Leitsymptom Blutung. Es wird zwischen thrombozytären und plasmatischen Formen der hämorrhagischen Diathesen unterschieden, wobei die Hämophilie hierbei nach der Von-Willebrand-Erkrankung die zweithäufigste angeborene plasmatische Gerinnungsstörung beim Menschen ist [22, 24]. Sie wird entweder durch einen Mangel an Blutgerinnungsfaktor FVIII (Hämophilie A) oder FIX (Hämophilie B) hervorgerufen. Im Gegensatz zur Hämophilie A, die in ca. einem von 5.000 männlichen Neugeborenen diagnostiziert wird, ist die Inzidenz von Hämophilie B mit 1 : 30.000 in männlichen Neugeborenen wesentlich geringer [69]. Hämophilie wird geschlechtsgebunden rezessiv vererbt. Dabei wird die Erkrankung von Konduktorinnen übertragen, die selbst keine oder nur eine geringe Blutungsneigung haben (meist um die 50 % Restaktivität). Mit einigen Ausnahmen sind hauptsächlich Männer von dieser Krankheit betroffen. Von ca. 8.000 Bluterkranken in Deutschland zeigen 85 % eine Hämophilie A und nur 15 % eine Hämophilie B [23]. In den folgenden Abschnitten wird nur auf die häufigere Form Hämophilie A eingegangen. Durch das Fehlen des aktivierten FVIII-Proteins, das als geschwindigkeitsbestimmender Kofaktor essenziell für die Bildung des Tenasekomplexes ist, kommt es zu einer verminderten FXa-Generierung, welche die Thrombinbildung beeinträchtigt. Die ausbleibende Thrombin-Amplifikation ist nicht ausreichend, um ein stabiles Blutgerinnsel auszubilden. Dies führt letztendlich zum Krankheitsbild der Hämophilie A.

### 3.4.1 Symptome

Der Phänotyp von Hämophilie-A-Patienten mit FVIII-Mangel ist sehr variabel, korreliert jedoch mit der im Blut vorhandenen Restaktivität des FVIII-Proteins [70, 71]. Man unterscheidet eine schwere Hämophilie mit einer Restaktivität von  $\leq 1$  %, eine mittelschwere Form mit einer Restaktivität von 1–5 %, eine leichte Form mit einer Restaktivität 5–15 % und die Subhämophilie mit 15–60 % FVIII-Restaktivität [23].

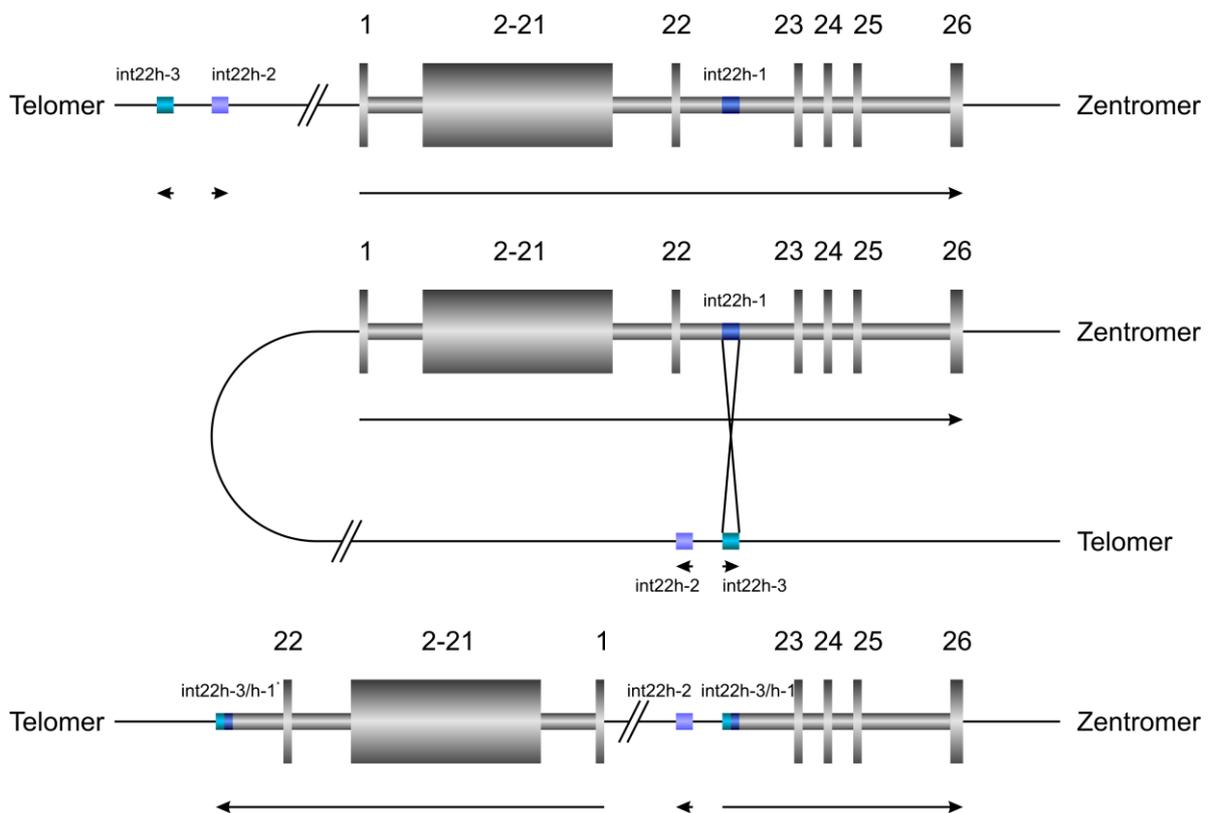
Ungefähr 50 % aller diagnostizierten Fälle entfallen auf die schwergradige Form, 10 % auf die mittelschwere und etwa 30–40 % auf die leichte Form [37]. Die schwere Verlaufsform der Hämophilie A zeigt sich in der starken Häufung von Spontanblutungen vor allen Dingen in Gelenken und Muskulatur, aber auch subkutane Hämatome und Hämaturie werden bei Patienten häufig vorgefunden. Erste charakteristische Blu-

tungsmanifestationen treten oftmals schon bei der Geburt auf - wie verlängertes Nachbluten der Nabelschnur - oder bei Beschneidungen. Besonders in der Kindheit und frühen Adoleszenz kann es häufig zu intraartikulären Blutungen in Knie-, Ellenbogen- und Sprunggelenken kommen [22, 23]. Wiederholte Blutungen in diesen Gelenken führen oftmals zu einer reaktiven, chronischen Synovitis, die die Blutungsneigung in den entsprechenden Gelenken weiterhin verstärkt und auch zu einer Arthropathie führen kann. Diese geht oftmals mit progressiven Gelenksdeformationen und Kontrakturen einher und beeinträchtigt somit sehr stark die Lebensqualität der Patienten [72, 73]. Assoziierter Muskelschwund kann im schlimmsten Fall schon bei jungen hämophilen Patienten zur Immobilisierung von Gelenken und damit zur Abhängigkeit von Rollstühlen oder anderen Gehhilfsmitteln führen [74]. Bei der mittelschweren Hämophilie treten zwar noch Spontanblutungen auf, doch ist die Blutungsbereitschaft geringer ausgeprägt. Ab einer Restaktivität von  $> 3 \%$  treten sogar nur noch selten Gelenksblutungen auf. Dagegen zeigen sich noch starke Blutungen nach Operationen oder Zahnextraktionen [22, 74]. Spontane Blutungen werden bei Patienten mit leichter Hämophilie und Subhämophilie nicht mehr beobachtet. Eine leichte Hämophilie manifestiert sich vor allen Dingen durch Blutungen nach Risikosituationen, während die Subhämophilie kaum Blutungsbeschwerden bei den Patienten verursacht und oft unerkannt bleibt [22, 23].

### 3.4.2 Pathologie

Die beschriebenen typischen Hämophilie-A-Symptome werden durch einen Mangel an FVIIIa hervorgerufen, der entweder durch qualitative Defekte im FVIII-Protein selbst oder durch quantitative Defekte, welche durch Interaktionspartner des FVIII-Proteins verursacht werden, bedingt ist [45]. Die klassische Hämophilie A wird vor allem durch verschiedene Mutationen im *F8*-Gen hervorgerufen. Missense-Mutationen führen zu einem Aminosäuren-Austausch und repräsentieren den häufigsten Mutationstyp in ungefähr 40 % aller Hämophilie-A-Fälle [75]. Der Schweregrad der resultierenden Hämophilie ist dabei sehr stark von den Eigenschaften der substituierten Aminosäure abhängig. Eine semikonservative Aminosäure, die der ursprünglichen in Ladung, Hydrophobie, Polarität und Form ähnelt, hat mildere Auswirkungen auf den Hämophilie-A-Phänotyp als eine nicht-konservative Aminosäure, die oft von einem schweren Phänotyp geprägt ist [76].

Mit einem Anteil von ca. 30 % aller Hämophilie-A-Fälle und ca. 50 % aller schweren Hämophilie-A-Fälle ist die rekurrente Intron-22-Inversion die zweithäufigste Ursache einer Hämophilie A [75, 77]. Sie beruht auf einer intragenen Rekombination zwischen int22h-1 im Intron 22 und einem der beiden homologen Pendanten int22h-2 oder int22h-3 außerhalb des Gens (99,9-%ige Homologie). Die beiden homologen Regionen int22h-1 und int22h-3 liegen in entgegengesetzter Richtung und können durch Schleifenbildung in räumliche Nähe gebracht werden. Die homologen Regionen paaren vor allen Dingen in der männlichen Meiose, da hier kein zweites X-Chromosom vorhanden ist [78]. Durch ein einziges Crossing-over-Ereignis innerhalb der Paarungsregion kommt es zur Invertierung des Bereiches zwischen den beiden homologen Regionen int22h-1 und int22h-3 und damit der *F8*-Exons 1 bis 22. Dies verhindert eine normale FVIII-Synthese und führt immer zu einer schweren Hämophilie-A-Verlaufsform [44, 79]. In einigen wenigen Fällen kann es auch zur Rekombination der Regionen int22h-1 und int22h-2 kommen, die sich zunächst in gleicher Orientierung befinden. Eine Paarung dieser beiden Regionen setzt aber ein weiteres Rekombinationsereignis zwischen int22h-2 und int22h-3 voraus, das zur Orientierungsänderung dieser beiden Regionen führt. Der weitere Ablauf bei der int22h-1/int22h-2-Inversion ist identisch zur int22h-1/int22h-3-Inversion [80] (Abbildung 5).



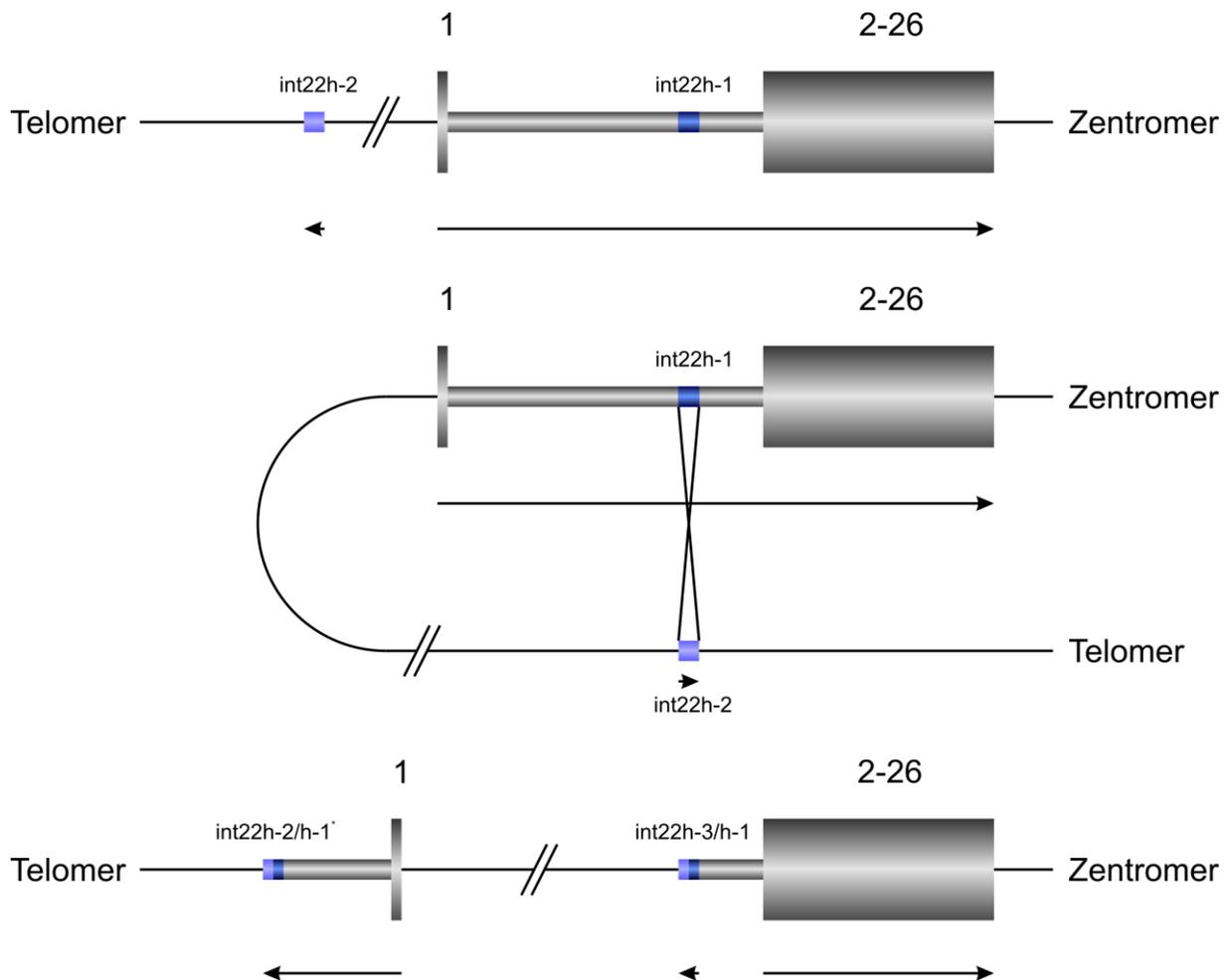
**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Intron-22-Inversion. Die homologen Regionen int22h-1 im Intron 22 und int22h-3 im extragenen Bereich paaren durch eine Schleifenbildung. Durch ein Rekombinationsereignis kommt es zur Invertierung des Bereichs zwischen den beiden Paarungsregionen.

In ungefähr 10 % aller Hämophilie-A-Fälle sind Nonsense-Mutationen im *F8*-Gen ursächlich für zumeist schwere Phänotypen. Durch einen einzelnen Basenaustausch kommt es zur Entstehung eines Stopp-Codons, welcher entweder zu NMD (Nonsense mediated decay) der mRNA oder zum Abbruch der Proteintranslation führt. Das trunkierte Protein wird meist vorzeitig abgebaut bzw. ist in seiner verkürzten Form nicht funktionsfähig [75, 76, 81, 82].

Acht Prozent aller Hämophilie-A-Patienten weisen kleine Deletionen im *F8*-Gen auf. Diese können in funktionell wichtigen Bereichen des Gens negative Folgen für das FVIII-Protein haben. Weiterhin können durch Mikrodeletionen Leserasterverschiebungen auftreten, die immer mit einer schweren Hämophilie-Verlaufsform assoziiert werden [75, 76].

Insertionen, große Deletionen und Spleißstellen-Mutationen haben ungefähr die gleiche Prävalenz von je 3 % unter allen hämophilen Patienten [75]. Während Insertionen und große Deletionen sehr ähnliche Auswirkungen haben wie die kleinen Deletionen und fast immer zu einer schweren Hämophilie A führen, sind die Folgen einer Spleißstellen-Mutation schwer vorherzusagen. Diese Mutationen können eine

Spleißstelle des *F8*-Gens zerstören oder eine neue kreieren. Hierdurch kann es zu Exon skipping (Exon-Überspringen) oder auch zu Insertionen in die *F8*-mRNA kommen. Der resultierende Hämophilie-Schweregrad ist einerseits davon abhängig, ob die Mutation eine Leserasterverschiebung verursacht oder nicht, und andererseits, ob ein korrektes Transkript trotz der Mutation hergestellt werden kann oder nicht [76]. Eine weitere rekurrente Intron-1-Inversion verursacht einen schweren Phänotyp in nur einem Prozent aller Hämophilie-A-Fälle [75]. Der Mechanismus dieser Inversion ähnelt sehr der Intron-22-Inversion: Zwei homologe Bereiche, int1h-1 im Intron 1 und int1h-2 im extragenen Bereich, liegen in entgegengesetzter Richtung und können durch eine Schleifenbildung in der männlichen Meiose paaren. Währenddessen kommt es zu einem Crossing-over-Ereignis und damit zur Inversion des Bereiches zwischen den homologen Regionen. Das Gen wird geteilt und das Exon 1 liegt in entgegengesetzter Richtung zu den Exons 2–26. Auf diese Weise kann das *F8*-Gen nicht mehr komplett transkribiert und in ein korrektes Protein translatiert werden [46] (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Intron-1-Inversion. Auch hier können die homologen Regionen int1h-1 im Intron 1 und int1h-2 im extragenen Bereich des *F8*-Gens durch Schleifenbildung paaren und rekombinieren. Die Folge ist die Inversion des Bereichs zwischen den beiden homologen Regionen.

In nur einigen wenigen Hämophilie-A-Fällen (ca. 0,5 %) konnten inzwischen auch Duplikationen nachgewiesen werden, die sowohl einzelne Exons betreffen, aber sich auch über mehrere Exons erstrecken können [83]. Die Auswirkungen der Duplikationen sind wahrscheinlich abhängig vom Duplikationsort, einer evtl. resultierenden Leserasterverschiebung und der Duplikationsgröße. Bisher wurden Duplikationen im *F8*-Gen kaum untersucht.

Bis heute wurden ungefähr 1.500 verschiedene Mutationen im *F8*-Gen beschrieben und auf der Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site (HAMSTeRS) dokumentiert [84]. Auch nach Untersuchung aller oben genannten Mutationsarten bleibt für ca. 2-3 % der Hämophilie-A-Patienten die genaue genetische Ursache ihrer Erkrankung unklar [75]. Man vermutet vor allen Dingen, dass intronische Mutationen, unbekannte Inversionen oder Mutationen in noch unbekanntem regulatorischen Bereichen oder Genen ursächlich sein könnten [45, 85].

Allgemein verteilen sich die Gendefekte über das gesamte *F8*-Gen. Auffällig ist dennoch, dass sich nahezu 40 % aller Punktmutationen (Missense-, Nonsense- und Spleißstellen-Mutationen) an einer von insgesamt 70 CpG-Inseln (Cytosin-Phosphat-Guanin) im *F8*-Gen ereignen [86]. CpG-Inseln wurden schon häufig in der Literatur als Mutations-Hotspots erkannt. Dies ist vor allen Dingen auf methylierte Cytosine zurückzuführen, welche leicht zu Thymin deaminiert werden können. Arginin repräsentiert eine Aminosäure, welche durch insgesamt sechs verschiedene Codons dargestellt wird. Vier dieser Codons enthalten CpGs, weshalb Arginin als die am häufigsten mutierte Aminosäure beschrieben ist [87]. Zwei weitere Mutations-Hotspots befinden sich im Exon 14: zwei Homopolymere von acht bzw. neun Adeninen bewirken eine erhöhte Fehlerrate der Polymerasen bei der Replikation und verursachen somit Insertionen und Deletionen von Adenin-Nukleotiden [88].

### 3.4.3 Diagnostik

Ein FVIII-Mangel lässt sich unter anderem über eine verlängerte APTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) detektieren. Mittels der APTT werden plasmatische Faktoren des endogenen Systems erfasst. Hierbei wird das Blutplasma des Patienten mit einem Oberflächenaktivator inkubiert. Die Kontaktfaktoren Präkallikrein, Kininogen und FXII des Blutgerinnungssystems werden hierdurch aktiviert. Nach anschließender Zugabe von Kalzium wird die plasmatische Gerinnung gestartet: FXIIa aktiviert FIX, der für die Bildung des Tenasekomplexes wichtig ist. Die darauffolgende Thrombinbildung führt zur Entstehung des Fibrinnetzes [89]. Messgröße ist die Zeit in Sekunden zwischen der Kalziumzugabe und der Gerinnungsbildung. Eine verlängerte APTT kann auf das Vorliegen eines isolierten oder eines kombinierten Einzelfaktorenmangels der plasmatischen Faktoren (HMWK, Präkallikrein, FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FV, FII oder FI) deuten [22].

Bei einer verlängerten APTT muss trotzdem zur differenzialdiagnostischen Abklärung einer Hämophilie A eine Einzelfaktorenanalyse für das FVIII-Protein durchgeführt werden. Man unterscheidet hier zwischen dem koagulometrischen und dem amidolytischen Messprinzip. Bei der koagulatorischen Bestimmung wird das Patientenplasma mit einem Mangelplasma versetzt, welches alle Faktoren enthält bis auf das zu untersuchende FVIII-Protein. Eine künstlich ausgelöste Gerinnungsreaktion ist somit limitiert durch die Menge des im Patientenplasma vorhandenen FVIII-Proteins. Das amidolytische Messverfahren macht sich ein Peptidsubstrat zu Nutze, welches die

Sequenz des natürlichen Substrats enthält und daher durch das passende Enzym gespalten werden kann. Da das FVIII-Protein selbst keine Enzymaktivität besitzt und nur als Kofaktor wirkt, kann amidolytisch nur indirekt über das Produkt des korrespondierenden Enzyms die FVIII-Aktivität bestimmt werden [22, 23]. Reduzierte FVIII-Aktivitäten (Normalbereich 60–140 %) und verminderte APTT sind typische Indikatoren einer Hämophilie A.

Eine bekannte Differentialdiagnose bei schwerer, mittelschwerer, leichter oder Subhämophilie kann dagegen nicht ausgeschlossen werden: Die Von-Willebrand-Erkrankung-Typ-2N (Normandy) zeigt die gleichen klinischen Symptome wie auch eine reduzierte APTT und reduzierte FVIII-Aktivität, wird aber durch einen Defekt in der FVIII-Bindestelle des vWF verursacht. Dieser Defekt vermindert die Affinität des vWF zum FVIII-Protein, wodurch dieser nicht stabilisiert und letztendlich sehr schnell abgebaut wird. Konkret lässt sich dies nur durch eine molekulare Untersuchung des vWF (Exons 18–24) ausschließen. Im Gegensatz zur klassischen Hämophilie A wird die Von-Willebrand-Typ-2N-Erkrankung autosomal rezessiv vererbt und kommt daher nicht nur bei Männern vor [90-94].

Weiterhin ist die Diagnose eines kombinierten FV/FVIII-Mangels auf Grund der APTT- und FVIII-Aktivitätsmessung nicht auszuschließen. Dieser kombinierte Mangel ist auf Mutationen im LMAN1- oder MCFD2-Gen zurückzuführen, deren exprimierte Proteine den Transport des FVIII-Proteins von ER zum Golgi-Apparat gewährleisten. Für eine eindeutige Aufklärung ist hier eine FV-Einzelfaktorenanalyse erforderlich [55, 95, 96].

Für eine vollständige Hämophilie-A-Abklärung ist eine molekulare Diagnostik unumgänglich. Mittels einer speziellen PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) mit drei Primern kann die rekurrente Intron-1-Inversion detektiert werden. Zur genetischen Identifizierung einer Intron-22-Inversion wird ein inverses PCR-System genutzt [46, 97]. Bei negativem Befund folgt eine Komplettuntersuchung der codierenden *F8*-Regionen inklusive der jeweils angrenzenden intronischen Bereiche mit Hilfe von Exon-Sequenzierung [98, 99]. Durch dieses Verfahren können Missense-, Nonsense- und Spleißstellen-Mutationen detektiert werden, wie auch kleine Deletionen und Insertionen. Wenn auch hier keine kausale Mutation aufgedeckt werden kann, wird meist eine MLPA-Analyse (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) durchgeführt [83]. Diese ermöglicht eine quantitative Bestimmung der kodierenden Bereiche des *F8*-Gens und somit die Aufklärung von großen Duplikationen und Deletio-

nen. Kann auch durch dieses Verfahren keine Mutation im *F8*-Gen gefunden werden, könnten neue Techniken wie Exom-Sequenzierung oder Genom-Sequenzierung vorgenommen werden, die aber sehr aufwändig und kostspielig sind und daher in der Routine-Diagnostik bisher keine Anwendung finden.

#### 3.4.4 Therapie

Seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurde mit mäßigem Erfolg versucht Hämophilie A mittels Bluttransfusionen zu therapieren [100]. Zu dieser Zeit war die Lebenserwartung von hämophilen Patienten sehr gering, da sie oft an trivialen Erkrankungen starben, wie einer aufgebissenen Zunge oder einem verletzten Finger [101]. Erst in den 1970ern waren erste FVIII-Konzentrate erhältlich, die dazu dienen sollten das fehlende FVIII-Protein zu ersetzen, um normale FVIII-Spiegel in Patienten zu schaffen. Die Konzentrate wurden aus Blutplasma gewonnen und den Patienten intravenös verabreicht. Diese neue Entwicklung bedeutete eine enorme Erleichterung für Hämophilie-Patienten, die durch Selbstinjektionen und Heimselbsttherapie ein fast normales Leben führen konnten [74]. Da FVIII-Präparate ausschließlich aus menschlichen Blutspenden gewonnen wurden, übertrugen sie auch darin enthaltene Viren. Hierdurch infizierten sich in den 80er Jahren zeitweise 50 % aller behandelten Patienten mit HIV und/oder Hepatitis-Viren [23]. Seit 1986 werden plasmatische Präparate routinemäßig virusinaktiviert und stellen somit keine Infektionsquelle für HIV und Hepatitis dar [74]. Im Jahr 1984 gelang die Klonierung des *F8*-Gens, die die Herstellung von rekombinanten FVIII-Produkten ermöglichen sollte [36, 51, 102]. Erst sechs Jahre später wurde aber das erste gentechnisch hergestellte Gerinnungskonzentrat zugelassen [74]. Heutzutage gelten beide Präparate, plasmatische und rekombinante, als identisch hinsichtlich Sicherheit und Effektivität. Lediglich ein theoretisches Restrisiko in Bezug auf neue Viren oder Versagen der Virusinaktivierung verbleibt bei den aus Plasma hergestellten Faktorenkonzentraten [22].

Durch die Möglichkeit der Heimselbstbehandlung mit ärztlicher Überwachung hat sich die Lebensqualität von Menschen mit schwerer Hämophilie stark verbessert. Inzwischen sorgen auch spezielle Hämophilie-Zentren für eine gute Versorgung und Aufklärung von Patienten in ganz Deutschland [74].

Trotzdem wird zunehmend an der Möglichkeit geforscht Hämophilie zu heilen. Hier verspricht vor allem die Gentherapie aussichtsreiche Ansätze: Die perfekte Gentherapie wäre die direkte Korrektur der jeweiligen Mutation auf Gen-Ebene. Diese Idee

ist momentan allerdings noch nicht umzusetzen [74]. Im Gegensatz dazu gab es schon klinische Studien, bei denen das *F8*-Gen in autonome Fibroblasten eingebracht wurde, die man dann laparoskopisch im Menschen reimplantierte. Bei vier von sechs Patienten war tatsächlich ein FVIII-Anstieg zu beobachten, der allerdings nicht länger als zehn Monate anhielt [103]. Weiterhin injizierte man Patienten intravenös ein Maus-Leukämie-Retrovirus, welches das *F8*-Gen enthält. Der FVIII-Aktivitätsanstieg war bei allen 13 Patienten vernachlässigbar gering [104]. Jüngst wurde ein *F8*-Adenovirus-Konstrukt einem Patienten injiziert, bei dem erhöhte FVIII-Werte über Monate nachgewiesen werden konnten. Die Nebenwirkungen dieser Therapie waren allerdings nicht vernachlässigbar [105].

### 3.4.5 Hemmkörperhämophilie

Eine ernste Komplikation der Substitutionstherapie ist die körpereigene Produktion von neutralisierenden Alloantikörpern (Hemmkörper) gegen das substituierte FVIII-Protein. Ungefähr 20–30 % aller Patienten mit schwerer Hämophilie A und 3–13 % aller Patienten mit leichter und mittelschwerer Hämophilie A sind hiervon betroffen [106]. Auf diese Weise wird das substituierte FVIII-Protein neutralisiert und verliert seine Wirkung, so dass die Substitutionstherapie ineffektiv wird. Daher entwickeln Hemmkörperpatienten vergleichsweise häufig Blutungen und infolgedessen die Symptome von unbehandelten Hämophilie-A-Patienten [22]. FVIII-Inhibitoren treten meist schon in der Kindheit während der ersten 10–20 Expositionstage der Substitutionstherapie auf [107, 108]. Deshalb wird bei Patienten mit schwerer Hämophilie eine regelmäßige Inhibitordiagnostik innerhalb der ersten 20 bis 50 Expositionstage vorgeschlagen. Nach etwa 200 Behandlungstagen ist das Risiko, eine Inhibitorhämophilie zu entwickeln, nur noch sehr gering [109, 110]. Die Hemmkörperbestimmung erfolgt meist über einen Plasmatauschversuch. Hierbei wird verdünntes Patientenplasma mit Normalplasma vermischt und bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgt eine FVIII-Aktivitätsbestimmung. Da dieses Verfahren nur eine qualitative Aussage vermittelt, wird meist für eine quantitative Inhibitor-Bestimmung ein kommerzieller Bethesda-Assay durchgeführt [23]. Diese Methode beruht auf der Messung und Korrektur der Gerinnungszeit eines FVIII-Mangelplasmas bzw. Hämophilie-Plasmas durch das FVIII-Protein, das zu diesem Mangelplasma hinzugefügt wird [111]. An Hand des Bethesda-Ergebnisses wird der Inhibitor-Status der Patienten in niedrigtitrige (< 5 BE, Bethesda-Einheiten) und hochtitrige (> 5 BE) Antikörper-Bildung unter-

teilt [112]. Die Antikörper selbst sind in der Regel Immunglobuline der Klasse IgG, aber auch monoklonale IgM- und IgA-Antikörper konnten bisher nachgewiesen werden [113, 114]. Die inhibitorische Wirkung der verschiedenen Antikörper ist auf die Induktion einer Inaktivierung des FVIII-Proteins oder eine sterische Blockade funktioneller Epitope zurückzuführen [115]. Mittels Epitop-Mapping konnte aufgezeigt werden, dass die am häufigsten nachgewiesenen Inhibitoren sich gegen die C2- und A3-Domänen der leichten Kette und gegen die A2-Domäne der schweren Kette richten [116].

Die genaue Ursache für die Entwicklung von Hemmkörpern bei Hämophilie-A-Patienten ist im Detail nicht bekannt. Man vermutet allerdings, dass Mutationen, die zu einem kompletten Syntheseausfall führen und damit eine fehlende Präsenz gegenüber dem Immunsystem verursachen, mit einem höheren Risiko zur Inhibitor-Entwicklung behaftet sind [22]. Inzwischen konnte innerhalb einer umfassenden Metaanalyse nachgewiesen werden, dass vor allen Dingen Intron-22-Inversionen, Nonsense-Mutationen und große Deletionen ein hohes Risiko mit sich bringen, einen Hemmkörper zu entwickeln. Die Inhibitor-Frequenzen von kleinen Deletionen und Insertionen sowie von Missense- und Spleißstellen-Mutationen sind dagegen deutlich geringer. Hier wird davon ausgegangen, dass bei diesen Mutationen kleine Mengen endogenes FVIII-Protein gebildet werden können, die eine Inhibitor-Bildung verhindern [117]. Weiterhin hat sich in den letzten Jahren bestätigt, dass Polymorphismen in Immunantwortgenen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Hemmkörperbildung beeinflussen. So erscheinen spezifische HLA-Allele (humane Leukozytenantigen-Allele) häufiger in Patienten mit Inhibitoren, während andere HLA-Allele einen protektiven Effekt zeigen [118]. Bei der Untersuchung der folgenden Gene IL-10 (Interleukin-10), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) konnte außerdem eindeutig bewiesen werden, dass auch hier Polymorphismen die Inhibitor-Bildung beeinflussen können [119-121]. Innerhalb neuester Studien konnte auch der Einfluss der Behandlungsstrategie auf die Hemmkörperbildung nachgewiesen werden. Der frühe Beginn einer prophylaktischen Substitutionsbehandlung vermindert um circa 60 % eine Hemmkörperbildung im Gegensatz zu frühen ereignisorientierten Intensivbehandlungen [122]. Die Wahl eines plasmatischen Substitutionspräparates scheint ebenfalls einen minimal negativen Effekt auf die Inhibitor-Entwicklung zu haben [123].

## 4 Zielsetzung

Die hier vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Untersuchung und Charakterisierung von speziellen Mutationen im *F8*-Gen, welche zum Krankheitsbild der Hämophilie A führen. Insgesamt wurden sechs verschiedene Mutationsarten genauer analysiert und detailliert beschrieben.

Bei ungefähr 2–3 % aller Hämophilie-A-Patienten kann mit diagnostischen Routinemethoden auf molekulargenetischer Ebene keine kausale Ursache für die Erkrankung identifiziert werden. Dieses Patientenkollektiv wurde systematisch auf seltene Mutationen hin untersucht:

- Durch Sequenzierung des Promotorbereichs konnten zwei Mutationen identifiziert werden, deren Kausalität mittels eines Luciferase-Assays bestätigt werden sollte.
- Weiterhin sollten diese Patienten auf epigenetische Veränderungen untersucht werden. Ein aberranter Methylierungsstatus könnte regulatorische Folgen für die FVIII-Expression haben und somit eine Hämophilie A hervorrufen.
- Durch Untersuchung der *F8*-mRNA sollten mögliche stille oder Spleißstellen-Mutationen untersucht werden, die durch aberrantes Spleißen die FVIII-Expression stören könnten. Die Ergebnisse sollten dann dazu verwendet werden, um ein in der Diagnostik häufig genutztes Spleißvorhersage-Programm zu validieren.
- Duplikationen im *F8*-Gen können inzwischen per MLPA schnell und zuverlässig diagnostiziert werden. Der Entstehungsmechanismus solcher Duplikationen ist dagegen noch unklar. Daher wurden mehrere Duplikationen im *F8*-Gen mittels Long-Range-PCR untersucht, um die exakten Bruchpunkte aufzuklären. Die Sequenzumgebung der Bruchstellen sollte mit Hilfe von diversen Computerprogrammen analysiert werden, um eventuell Rückschlüsse auf die Mutationsursache ziehen zu können.
- Im Rahmen der Routinediagnostik wurden einige Patienten identifiziert, die aberrante PCR-Muster für die Intron-1- bzw. Intron-22-Inversion aufwiesen. Long-Range-PCR-Untersuchungen sollten Aufschluss über diese ungewöhnlichen Genumlagerungen geben.
- Nonsense-Mutationen in den hinteren Domänen des FVIII-Proteins führen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer Hemmkörperhämophilie als Non-

sense-Mutationen in den vorderen Domänen. Dieses Phänomen sollte an Hand von FVIII-Expressionsstudien genauer untersucht werden. Hierbei sollte die rekombinante FVIII-Expression von Wildtyp- und mutanten cDNA-Konstrukten auf mRNA-, Protein- und Zellebene analysiert werden.

## 5 Methodische Details

### 5.1 Charakterisierung von Promotor-Mutationen im Faktor-VIII-Gen

Zellkultur (siehe Anlage 1)

Klonierung (siehe Anlage 1)

Mutagenese (siehe Anlage 1)

Transfektion (siehe Anlage 1)

Luciferase-Assay (siehe Anlage 1)

### 5.2 Methylierungsuntersuchungen im Faktor-VIII-Gen

Bisulfit-Konvertierung (siehe Anlage 2, Methods)

Pyrosequenzierung (siehe Anlage 2, Methods)

Long-Range-PCR (siehe Anlage 2, Methods)

### 5.3 Faktor-VIII-mRNA-Analysen zur Identifizierung von Spleißstellen-Mutationen und stillen Mutationen

mRNA-Isolierung (siehe Anlage 3, Materials and methods)

cDNA-Herstellung (siehe Anlage 3, Materials and methods)

Sequenzierung (siehe Anlage 3, Materials and methods)

### 5.4 Charakterisierung von Duplikationsbruchpunkten im Faktor-VIII-Gen

Bioinformatische Untersuchungen (siehe Anlage 4, Materials and methods)

### 5.5 Analyse von auffälligen Intron-22- und Intron-1-Inversionen

Long-Range-PCR (siehe Anlage 5, Materials and methods)

## 5.6 Untersuchung von Faktor-VIII-Nonsense-Mutationen im Hinblick auf die Entwicklung von Hemmkörpern

Zellkultur (siehe Anlage 6, Methods)

Mutagenese (siehe Anlage 6, Methods)

Transfektion (siehe Anlage 6, Methods)

mRNA-Analyse (siehe Anlage 6, Methods)

Aktivitätsassay (siehe Anlage 6, Methods)

Antigenassays (siehe Anlage 6, Methods)

FVIII-Lokalisation (siehe Anlage 6, Methods)

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

### 6.1 Charakterisierung von Promotor-Mutationen im Faktor-VIII-Gen

Die DNAs von insgesamt 89 Hämophilie-A-Patienten ohne bekannte kausale Mutation wurden auf Sequenzabweichungen im Promotorbereich des *F8*-Gens untersucht. Der Haupt-Promotorbereich des Gens wurde von Gitschier et al. [36] experimentell durch Transfektionsversuche bestimmt. Man ging davon aus, dass sich dieser bis zur Nukleotid-Position c.-1175 erstreckt. Erst zehn Jahre später konnten Figueiredo und Brownslee [124] an Hand von funktionellen Analysen den Haupt-Promotorbereich auf ungefähr 300 bp eingrenzen (c.-279 bis c.-64). Ein Vergleich dieses Bereichs mit jenen aus anderen Spezies zeigt, dass dieser hochkonserviert und wahrscheinlich von großer Bedeutung für die transkriptionelle Promotoraktivierung ist (Abbildung 7).

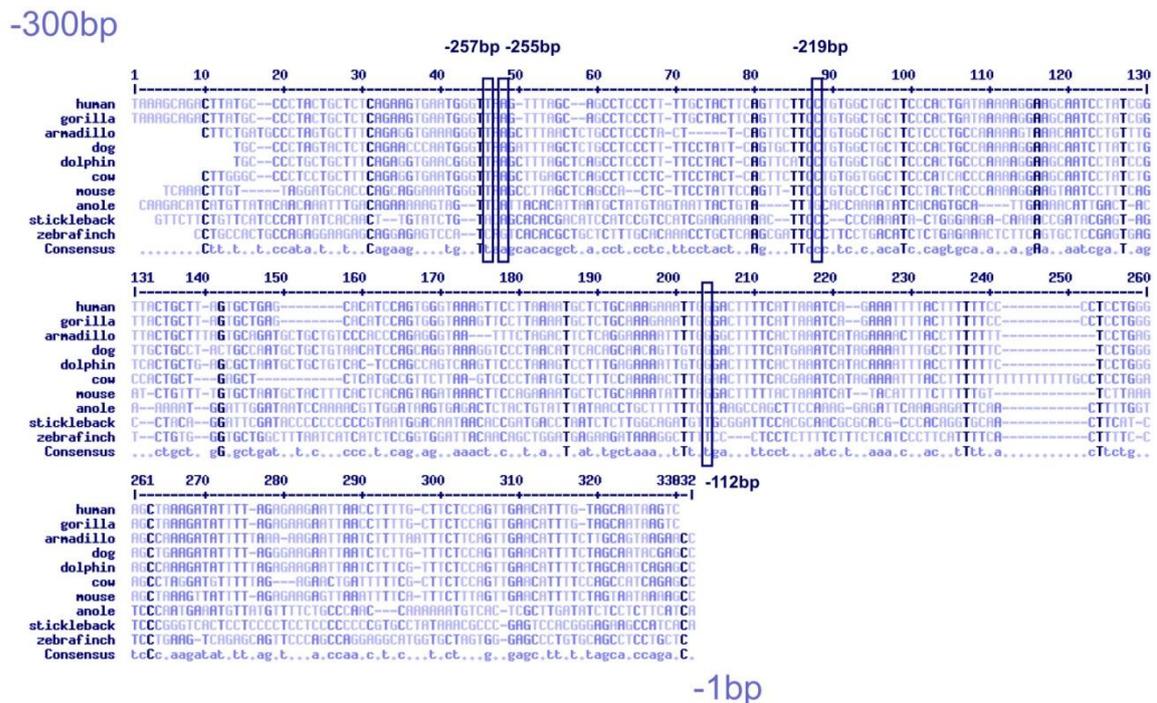
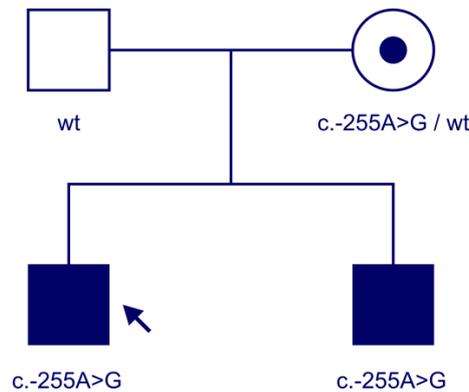


Abbildung 7: Darstellung eines Multi-Sequenzvergleichs von 300 bp des *F8*-Haupt-Promotorbereichs aus insgesamt neun verschiedenen Spezies. Der Vergleich wurde mit der Software *Multalin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) durchgeführt. Hellblau = schlechte Übereinstimmung, Dunkelblau = gute Übereinstimmung; die Positionen der untersuchten Promotor-Mutationen sind eingerahmt.

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

Die komplette Sequenzierung des Promotorbereichs aller 89 Patienten wurde innerhalb der Dissertation vorangegangenen Diplomarbeit und im Anschluss daran durchgeführt. Hierbei konnten zwei verschiedene Basenaustausche in zwei unabhängigen Patienten mit milder Hämophilie aufgezeigt werden: c.-219C>T und c.-255A>G. Zusätzlich konnten drei Familienmitglieder des Patienten mit dem c.-255A>G-Basenaustausch untersucht werden (Abbildung 8).

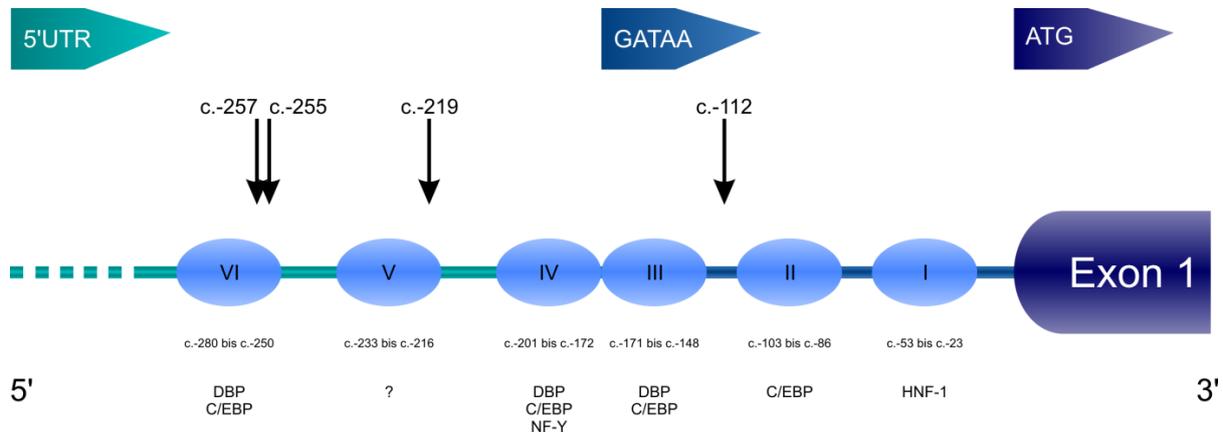


**Abbildung 8:** Stammbaum der Familie des Indexpatienten (Pfeil) mit c.-255A>G-Basenaustausch in der *F8*-Promotorregion. Der Indexpatient und sein Bruder leiden an einer milden Hämophilie.

Der Bruder des Index-Patienten mit milder Hämophilie wies denselben Austausch in hemizygoter Form auf und die Mutter, die keine offensichtlichen Hämophilie-Symptome zeigte, in heterozygoter Form. Der Vater zeigte keine phänotypischen wie auch genotypischen Veränderungen. Die c.-219C>T-Mutation wurde schon in der Literatur beschrieben und zudem auch zwei weitere Mutationen: c.-112G>A und c.257T>G [125, 126]. Die Kausalität der insgesamt vier bekannten Austausche im Promotorbereich des *F8*-Gens wurde innerhalb dieser Dissertation mittels eines Luciferase-Assays untersucht. Dabei wurden der wildtypische und die jeweiligen mutierten *F8*-Promotoren vor ein Leuchtkäfer-Luciferase-Gen ohne eigenständigen Promotor in einen pGL3-Vektor kloniert. Nach einer Co-Expression der Vektoren mit einem zusätzlichen Seefeder-Luciferase-Vektor in zwei separaten Zelllinien wurden die Luciferase-Aktivitäten der Zellen gemessen. Die ermittelten Aktivitäten der mutierten Promotorvektoren wurden mit der Aktivität des wildtypischen Konstrukts verglichen. Die c.-219C>T-Mutation zeigte den größten negativen Effekt auf die Promotoraktivität, die auf 0,5 % der wildtypischen Aktivität in HEK293 (Human embryonic kidney)-Zellen und auf 6 % in Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma)-Zellen reduziert wurde (Anlage 1, Abbildung 1). Im Jahr 1996 definierte McGlynn et al. [127] an Hand eines

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

DNase-I-Schutz-Assays im Kernextrakt von Ratten-Leberzellen verschiedene Bindestellen im *F8*-Gen (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Schematische Illustration des *F8*-5'UTR (untranslated region)- und Promotorbereichs mit verschiedenen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (I–VI) nach McGlynn et al. [127]. Der dunkelblaue ATG-Pfeil kennzeichnet den Translationsstart bei Position +1 und der mittelblaue GATAA-Pfeil den Transkriptionsstart an der TATA-Box. Verschiedene Transkriptionsfaktoren binden im Promotorbereich: HNF-1 (Hepatocyte nuclear factor I), C/EBP (CCAAT/Enhancer-binding protein), DBP (D-site-binding protein) und NF-Y (nuclear factor Y). Die schwarzen Pfeile dokumentieren die Positionen der untersuchten Promotor-Mutationen.

Hiernach befindet sich an der Stelle c.-219 eine Bindestelle (c.-233 bis c.-216) eines noch nicht identifizierten Transkriptionsfaktors. Da die Auswirkungen dieser Mutation auf die Promotoraktivität sehr ausgeprägt sind, wird angenommen, dass dieser noch unbekannt Transkriptionsfaktor für die *F8*-Translation von besonderer Bedeutung ist. Vermutlich ist dieser Transkriptionsfaktor in Nieren- und Lebergewebe unterschiedlich aktiv, was die unterschiedlichen Werte in den beiden Zelllinien erklären würde. Im Jahr 2008 publizierten Dai et al. [128] die Ergebnisse eines ähnlichen Luciferase-Assays für die c.-219-Mutation und demonstrierten einen Rückgang der Promotoraktivität auf 23 % wildtypischer Aktivität. Um den durchgeführten Luciferase-Assay zu validieren, wurde die c.-219C>T Mutation zusätzlich mituntersucht. Die divergierenden Ergebnisse der beiden Studien sind wahrscheinlich auf die Verwendung von unterschiedlichen Plasmid-Konstrukten und Zelllinien zurückzuführen. Weiterhin ist zu diesen Versuchsergebnissen zu vermerken, dass durch die Rest-Aktivitätswerte des Promotors nicht auf den FVIII-Rest-Aktivitätslevel des Patienten geschlossen werden kann.

Die Resultate des Luciferase-Assays der c.-255A>G-Mutation zeigen eine Promotoraktivitätsabnahme auf eine Restaktivität von etwa 5 % in beiden Zelllinien (Anlage 1, Abbildung 1). Auch an dieser Mutationsstelle konnte McGlynn et al. eine Transkrip-

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

tionsfaktorbindestelle (c.-250 bis c.-280) für DBP und C/EBP identifizieren. Beide genannten Faktoren sind Mitglieder der Leucizipper-Familie, die vornehmlich an *cis*-aktiven Regionen binden [127, 129]. Kotransfektionsversuche mit einem C/EBP-Expressionsvektor bestätigen die funktionell wichtige Rolle des C/EBP bei der Expression des FVIII-Proteins [124]. Weiterhin zeigen Kotransfektionsversuche mit C/EBP und DBP eine starke *trans*-Aktivierung des FVIII-Promotorbereichs und unterstreichen somit die Bedeutung dieser beiden Transkriptionsfaktoren für die FVIII-Expression [127]. Die genaue Bindesequenz TKNNGYAAK des C/EBP befindet sich an der Position c.-262 bis c.-254 [130]. Einige Basen der Bindesequenz, wie auch die Position c.-255, an der sich ein Adenin befindet, sind sehr konserviert, um eine optimale Bindung des Transkriptionsfaktors zu gewährleisten. Der Basenaustausch an dieser Stelle bewirkt, dass die Bindesequenz beeinträchtigt und somit die C/EBP-Bindung behindert wird. Es erscheint plausibel, dass die resultierende verminderte Transkriptionsrate des *F8*-Gens den milden Hämophilie-A-Phänotyp des Index-Patienten verursacht. Der genetische Defekt c.-255A>G wurde von der Mutter an ihre beiden Söhne vererbt.

Zwei Nukleotide neben der eben diskutierten Position wurde ein weiterer Basenaustausch c.-257T>G von Riccardi et al. [126] beschrieben, aber nicht funktionell untersucht. Obwohl die beiden Basenaustausche sich in direkter Nachbarschaft befinden, sind die Auswirkungen auf die Promotoraktivität sehr verschieden: die c.-255A>G-Mutation bewirkt einen Rückgang der Promotoraktivität auf circa 5 % und die c.-257T>G auf circa 40 % des wildtypischen Promotors in beiden Zelllinien. Letztgenannte Mutation befindet sich ebenfalls in der direkten Bindesequenz des C/EBPs, allerdings ist hier die Base an dieser Position nicht hochkonserviert, sondern erlaubt ein Cytosin oder ein Thymin. Zur genaueren Untersuchung der Basenvariabilität wurden weitere *F8*-Promotorkonstrukte untersucht: c.-257T>A und c.-257T>C. Diese zeigten den gleichen Effekt auf die Promotoraktivität, wie die c.-257T>G-Mutation. Daraus kann erschlossen werden, dass an der Position c.-257 einzig ein Thymin die volle Funktion gewährleistet und andere Basen zu einer Verringerung der Promotoraktivität führen, was einen milden hämophilen Phänotyp nach sich zieht. Zudem wird diese Vermutung von einer umfangreichen Stammbaumanalyse von Riccardi et al. gestützt [126].

Weiterhin wurde die Mutation c.-112G>A, welche von Bogdanova et al. [125] beschrieben wurde, mit Hilfe des Luciferase-Systems untersucht. Hier zeigte sich eine

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

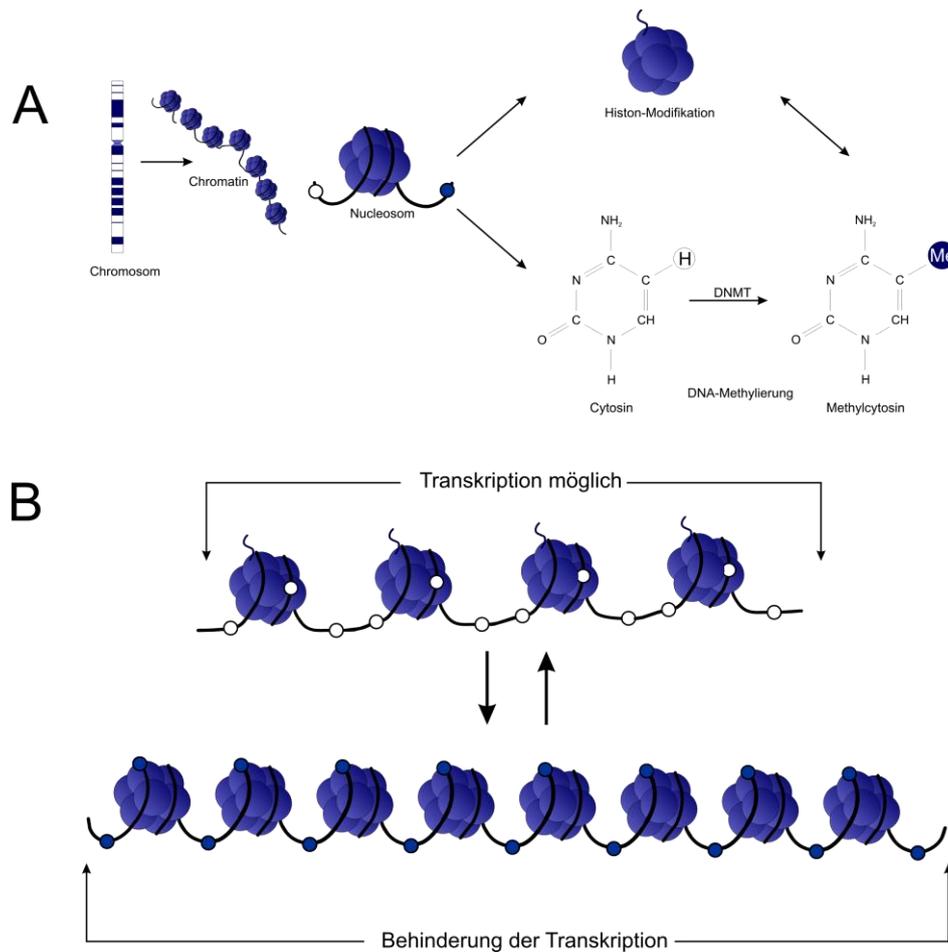
Promotorrestaktivität des mutierten Vektors von circa 60 % des wildtypischen Vektors in HEK-Zellen und von circa 80 % in Hep-G2-Zellen. Die untersuchte Position befindet sich an keiner beschriebenen Transkriptionsbindestelle. Daher wird vermutet, dass dieser Basenaustausch auch kaum Einfluss auf die *F8*-Transkription hat und somit nur zu einem sehr leichten Phänotyp führt, der auch von Bogdanova et al. [125] beschrieben wurde.

Letztendlich konnten innerhalb dieser Arbeit insgesamt vier verschiedene Promotor-Mutationen als kausal eingestuft und die jeweiligen direkten Ursachen und Auswirkungen diskutiert werden. Bezogen auf die Gesamtzahl der Hämophilie-A-Patienten machen die bisher identifizierten Promotor-Mutationen nur 0,1 % aus. Daher empfiehlt sich die Untersuchung des *F8*-Promotors erst am Ende der Routinediagnostik zur Abklärung von ungeklärten Hämophilie-A-Fällen.

### 6.2 Methylierungsuntersuchungen im Faktor-VIII-Gen

In den letzten Jahren gewann die Epigenetik immer mehr an Bedeutung. Vor allen Dingen bei der Aufklärung von erblichen Erkrankungen und bei der Tumorphathogenese spielen epigenetische Dysregulationen nachweislich eine wichtige Rolle [131-135]. Der Hauptmechanismus der epigenetischen Regulation basiert auf der Methylierung von einzelnen CpGs, welche sich meist innerhalb eines CpG-Clusters befinden. Diese Cluster werden auch CpG-Inseln genannt und befinden sich oftmals in regulatorischen Bereichen von Genen. Die epigenetische Methylierung ist eine kovalente Modifikation von Cytosinen, die zu einer Anlagerung von Methyl-CG-erkennenden Proteinen und zu posttranslationalen Histonmodifikationen führt. Diese beiden epigenetischen Veränderungen sind für die Verdichtung von Nukleosomen verantwortlich, die für Transkriptionsfaktoren unzugänglich werden und somit die komplette Genexpression beeinträchtigen [136, 137] (Abbildung 10).

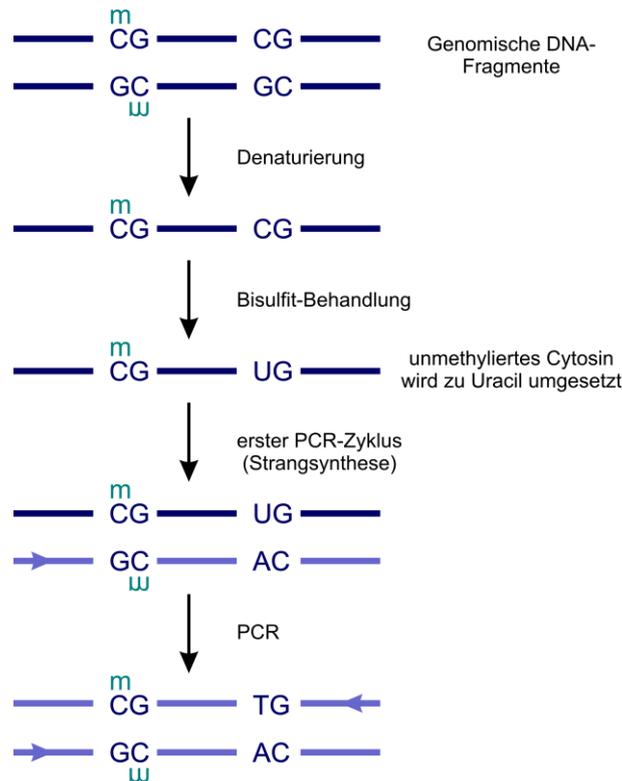
## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Methylierungsprozesses. Durch die Methylierung von Cytosinen, kommt es zur Anlagerung von Methyl-CG-erkennenden Proteinen an die DNA und zu posttranslationalen Histonmodifikationen (A). Diese Veränderungen bedingen die Verdichtung der Nucleosomen und behindern somit die Transkription des Gens (B) [138].**

Ein aberrantes Methylierungsmuster kann innerhalb einer CpG-Insel die vollständige Stilllegung eines Gens hervorrufen [139]. Vor allem aberrante Methylierungen in Promotorregionen führen zu Genexpressionsstörungen, aber auch im Gen selbst können abnormale Methylierungsmuster – vornehmlich im ersten Intron und Exon – die Transkription stark beeinflussen [137, 140, 141]. Um jene eventuell vorliegende Abweichungen von Methylierungsmustern aufzuklären, wurden die DNAs von 80 Hämophilie-A-Patienten ohne bekannte kausale *F8*-Mutation, 55 männliche und 55 weibliche Kontrollen Bisulfit-konvertiert und per Pyrosequenzierung untersucht (Abbildung 11).

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse



**Abbildung 11: Darstellung der Bisulfit-Konvertierung von genomischer DNA. Nach einem Denaturierungsprozess wird die einzelsträngige DNA mit Bisulfit behandelt. Hierbei werden nicht-methylierte Cytosine zu Uracil deaminiert. Eine darauffolgende PCR ersetzt das ursprüngliche nicht-methylierte Cytosin mit einem Thymin [142].**

Insgesamt konnten fünf CpG-Inseln (zwei im 5'UTR-Bereich, drei im Intron 1) im *F8*-Gen identifiziert werden. Bisher wurden im *F8*-Gen von gesunden Blutspendern nur ein einzelnes CpG und eine CpG-Inselle im Intron 22 auf ihren Methylierungsstatus hin überprüft, wobei bei beiden Untersuchungen eine nahezu vollständige Methylierung nachzuweisen war [143, 144]. Allgemein werden auf dem aktiven X-Chromosom CpG-Inselle in regulatorischen Bereichen nicht methyliert, im Gegensatz zu CpG-Inselle auf dem inaktiven X-Chromosom, die meistens zu 100 % methyliert sind [145, 146].

Die fünf CpG-Inselle wurden mittels vier verschiedener Pyroassays und elf verschiedener Pyrosequenzierungen analysiert (Anlage 2, Tabelle 2). In der weiblichen Kontrollgruppe konnte ein durchschnittlicher 5'UTR-Methylierungsstatus von ungefähr 20 % nachgewiesen werden. Nach der Lyon-Hypothese, die die komplette Methylierung aller CpG-Inselle des inaktiven X-Chromosoms vorhersagt, würde aber ein Methylierungswert von 50 % erwartet werden [147].

Der 5'UTR-Bereich von 79 Hämophilie-A-Patienten wie auch aller männlichen Kontrollen war nahezu unmethyliert. Ein einziger Hämophilie-A-Patient zeigte eine höhe-

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

re Methylierung von ungefähr 35 %. Im Nachhinein wurde dieser Patient als Klinefelter-Patient (XXY) diagnostiziert, der eigentlich den gleichen Methylierungsstatus wie die weiblichen Kontrollen aufzeigen sollte. Hier wird eine erhöhte Dosis-Kompensation vermutet.

Weiterhin konnte durch Pyrosequenzierung eine nahezu komplette Methylierung aller CpG-Inseln im Intron 1 bei 78 Patienten wie auch aller männlichen und weiblichen Kontrollen aufgezeigt werden. Im Detail war der Methylierungsstatus der weiblichen Kontrollen minimal niedriger als der der männlichen Kontrollen. Diese Beobachtung wurde schon von El-Maarri et al. [143] beschrieben und auf die Heterogenität der untersuchten Sequenz zurückgeführt.

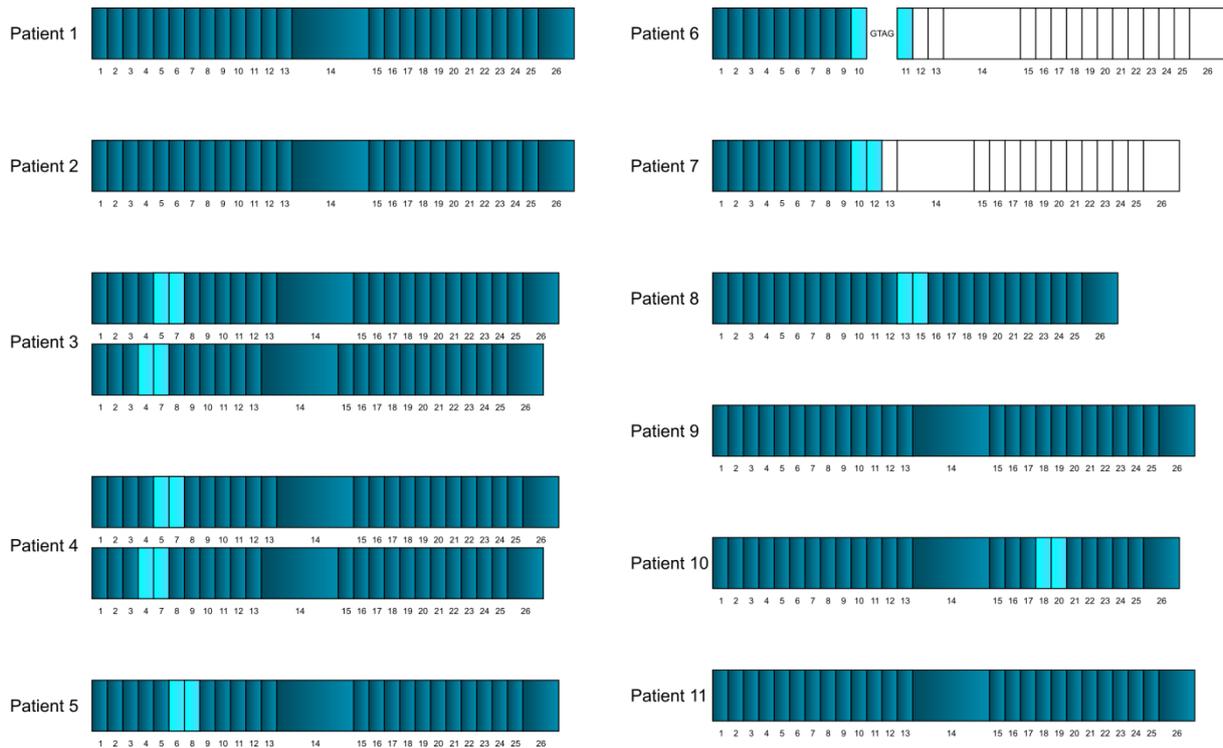
Für einen einzigen Hämophilie-A-Patienten konnte kein PCR-Produkt für die zweite CpG-Insel im Intron 1 amplifiziert werden. Um dieses Ereignis aufzuklären, wurden Long-Range-PCRs zwischen der ersten und letzten CpG-Insel im Intron 1 vorgenommen. Leider konnte auf diese Weise kein PCR-Produkt zur Aufklärung hergestellt werden. Es wird vermutet, dass eventuell innerhalb dieser Region im Intron 1 ein Insertions-, Deletions- oder Inversionsereignis stattgefunden hat, das die Amplifikation der zweiten CpG-Insel verhindert. Außerdem wurde bei einem weiteren Hämophilie-A-Patienten eine aberrante Methylierung in der letzten CpG-Insel im Intron 1 festgestellt, die auf eine von der Referenzsequenz abweichende Sequenz zurückgeführt werden kann. Diese abweichende Basenfolge konnte weder per Sequenzierung verlängert noch per BLAST im menschlichen Genom identifiziert werden. Long-Range-PCR-Analysen, welche die nicht identifizierte Region umschlossen, scheiterten. Auch für diese Abweichung im Intron 1 sind wahrscheinlich Umlagerungen verantwortlich. Eine detaillierte Analyse dieser beiden Spezialfälle konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Hierzu wären neue kostspielige und aufwändige Untersuchungstechniken nötig.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass aberrante Methylierungsmuster nicht zum Krankheitsbild der Hämophilie A beitragen. Allerdings konnten zwei Patienten identifiziert werden, welche Veränderungen im Intron 1 aufweisen, die einen Einfluss auf die FVIII-Expression und die Entstehung von Hämophilie A haben könnten. Dies lässt vermuten, dass die Untersuchung weiterer intronischer Sequenzen bei Patienten mit ungeklärter genetischer Ursache wahrscheinlich noch weitere kausale Mutationen zu Tage fördern würde.

### 6.3 Faktor-VIII-mRNA-Analysen zur Identifizierung von Spleißstellen-Mutationen und stillen Mutationen

Um ein korrektes Spleißen auf mRNA-Ebene zu gewährleisten, sind insgesamt vier verschiedene Signale notwendig: die zwei intronischen Konsensus-Sequenzen an Donor- und Akzeptorspleißstelle, die Verzweigungsstelle und der Polypyrimidin-Abschnitt [148, 149]. Weiterhin können verschiedene *cis*-aktive Elemente wie ESEs (exonic splicing enhancers), ESSs (exonic splicing silencers), ISEs (intrinsic splicing enhancers) und ISSs (intrinsic splicing silencers) den Spleißprozess beeinflussen [149, 150]. Etwa 3 % aller Hämophilie-A-Fälle werden von Mutationen verursacht, welche entweder eine Spleißstelle zerstören oder neu erschaffen. Dies kann zur Folge haben, dass einzelne Basen inseriert oder deletiert werden oder auch komplette Exons übersprungen werden (Exon skipping). Die Auswirkungen solcher Spleißmutationen auf einen Hämophilie-A-Phänotyp sind letztendlich davon abhängig, ob eine Leserasterverschiebung stattfindet, ein Rest der wildtypisch gespleißten mRNA vorhanden ist oder ein entstandener Informationsverlust überwunden werden kann [76, 84]. Da die genauen Konsequenzen von stillen Mutationen wie auch Spleißmutationen nur auf mRNA-Ebene untersucht werden können und dies oftmals nicht möglich ist, werden für eine diagnostische Einordnung *in silico* Spleißvorhersage-Programme wie z.B. die in Alamut v2.0 genutzt. Innerhalb eines längeren Zeitraumes konnten von insgesamt elf Patienten mit mutmaßlichen Spleißmutationen oder stillen Mutationen Blutproben für eine weiterführende mRNA-Untersuchung gesammelt werden. Aus den Blutproben wurde die mRNA isoliert und daraus cDNA hergestellt, welche anschließend mittels PCR und Sanger-Sequenzierung untersucht wurde. Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit wurden sieben dieser Patienten untersucht, wobei bei drei Patienten eine aberrante mRNA entdeckt werden konnte, die wahrscheinlich für die Hämophilie-A-Phänotypen der Patienten verantwortlich ist. In dieser vorliegenden Arbeit werden vier weitere Patienten vorgestellt, bei denen ein abnormaler Spleißprozess belegt werden konnte (Abbildung 12).

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse



**Abbildung 12: Übersicht über die cDNA-Untersuchung von elf Patienten mit Spleißmutationen oder stillen Mutationen. Bei den Patienten 3 und 4 konnten jeweils zwei Transkripte nachgewiesen werden. Dunkelblau = cDNA, die in Protein übersetzt wird, hellblau = an die Mutation angrenzende Exons, weiß = von der Leserasterverschiebung betroffene, nicht translatierte Exons.**

Patient 3 (c.787+2T>A) und Patient 4 (c.787+6T>C) zeigten zwei mutmaßliche Spleißmutationen, welche sehr nah beieinander liegen und die gleiche Spleißdonorstelle betreffen. Die interaktive Biosoftware Alamut sagt bei der c.787+2T>A-Mutation einen starken Einfluss auf die Spleißdonorstellen-Nutzung vorher (fünf von fünf integrierten Programmen zeigten einen starken Einfluss (Anlage 3 Abbildung 1 a)), im Gegensatz zur c.787+6T>C-Mutation, bei der Alamut nur einen leichten Einfluss auf die Spleißdonorstellen-Nutzung anzeigte (vier von fünf integrierten Programmen zeigten einen minimalen Einfluss (Anlage 3 Abbildung 1 b)). Mittels mRNA-Analyse konnte demonstriert werden, dass beide Mutationen die gleichen Auswirkungen auf den Spleißprozess haben, da bei beiden zwei verkürzte Transkripte nachgewiesen werden konnten: Dem einen Transkript fehlt Exon 6 und dem anderen die Exons 5 + 6. Der Einfluss auf die Spleißdonorstelle konnte also für beide Mutationen bestätigt werden. Das Leseraster bleibt in beiden Fällen erhalten. Trotzdem fehlen beiden Transkripten essenzielle Teile der A1-Domäne, welche einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des FVIII-Proteins leistet. Wegen der von Alamut vorhergesagten starken Auswirkungen der c.787+2T>A-Mutation wird hier ein schwerer Hämophilie-A-Phänotyp des Patienten vermutet. Die Mutation c.787+6T>C ist weiter entfernt von

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

der direkten Spleißstelle und lässt daher einen weniger starken Einfluss und damit auch Hämophilie-Schweregrad annehmen. Diese Vermutung trifft auf den c.787+6T>C-Patienten zu, der Hämophilie-Schweregrad des c.787+2T>A-Patienten ist leider unbekannt. Bisher wurde in der Literatur in direkter Nähe noch eine weitere Mutation c.787+3A>G von drei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben [85, 151, 152]. Bidichandani et al. [152] schilderten die mRNA-Analyse eines Patienten mit mittelschwerer Hämophilie A, bei welcher nur ein verkürztes Transkript mit fehlenden Exons 5 + 6 aufgezeigt werden konnte. Dagegen dokumentierte El-Maarri et al. [85] einen Patienten mit schwerer Hämophilie A und den gleichen Transkripten, wie Patient 3 und 4. Des Weiteren beschrieb Theophilus et al. [151] einen Patienten, der an einer schweren Hämophilie A leidet und bei dem durch eine mRNA-Analyse ein verkürztes Transkript ohne Exon 6 nachgewiesen werden konnte. Zusammenfassend wurden also drei Patienten mit der gleichen Mutation und drei verschiedenen Auswirkungen auf mRNA-Ebene vorgestellt. Wahrscheinlich sind die variablen mRNA-Ergebnisse auf die unterschiedliche Produktion von aberranten Transkripten in der Leber zurückzuführen.

Bei Patient 5 wurde ein einzelner Basenaustausch 14 Basen vor dem eigentlichen Exon 7 entdeckt (c.788-14C>T), der laut Alamut nur minimale Auswirkungen auf die Akzeptorspleißstellen-Nutzung haben sollte (drei von fünf Programmen zeigten einen minimalen Effekt (Anlage 3, Abbildung 1 c)). In diesem Fall konnte aber eindeutig mittels mRNA-Analyse ein verkürztes Transkript nachgewiesen werden, dem Exon 7 fehlt und dessen Leseraster hiervon nicht beeinträchtigt wurde. Da auch das Exon 7 für die Synthese einer funktionellen A1-Domäne erforderlich ist, wird hier ein destabilisierender Effekt auf das FVIII-Protein erwartet, welcher wahrscheinlich zu einem milden Hämophilie-A-Phänotyp führt. Leider ist auch hier der Phänotyp des Patienten unbekannt. Zeitgleich zu dieser Studie veröffentlichte Reitter-Pfoertner et al. [153] eine mRNA-Analyse von sieben Patienten mit milder Hämophilie und der gleichen c.788-14C>T-Mutation. Die Ergebnisse aus dieser Publikation bestätigen das mRNA-Untersuchungsergebnis für Patient 5.

Für Patient 6 mit der Mutation c.1538-6G>A sagte Alamut eindeutig einen positiven Effekt zu Gunsten einer neu entstehenden Spleißakzeptorstelle voraus (fünf von fünf Programmen zeigten einen drastischen Effekt (Anlage 3, Abbildung 1 d)). Dieses Ergebnis konnte durch mRNA-Untersuchung eindeutig bestätigt werden. Die neue Spleißstellen-Nutzung führt allerdings zu einer Insertion von insgesamt vier Basen

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

vor dem Exon 11. Diese bedingt eine Leserasterverschiebung und führt zu der Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons an Aminosäure-Position 513. Der vorzeitige Proteinsynthese-Abbruch verursacht wiederum wahrscheinlich den schweren Phänotyp des Patienten. Weiterhin wurden drei weitere Spleißmutationen in der Literatur beschrieben, welche die gleiche Spleißakzeptorstelle betreffen [154–156]. Alle drei Mutationen (c.1538-1G>A, c.1538-2A>T und c.1538-18G>A) verursachen eine stark reduzierte Spleißakzeptorstellen-Nutzung, wie auch durch Alamut vorhergesagt wurde (vier von fünf Programmen zeigten einen drastischen Effekt für die Mutationen c.1538-1G>A und c.1538-2A>T, nur eines von fünf Programmen zeigte einen minimalen Effekt für die Mutation c.1538-18G>A). Allerdings kommt es bei diesen Mutationen nicht zur Entstehung einer neuen Spleißstelle, sondern zur Nutzung einer alternativen Spleißstelle innerhalb des Exons 11. Daher konnte für alle drei Mutationen ein Transkript isoliert werden, bei welchem 36 bp vom Beginn des Exons 11 deletiert sind. Obwohl nur wenige Basen vom Exon 11 fehlen und die Mutation zu keiner Leserasterverschiebung führt, leiden zwei der drei Patienten an einer schweren und einer an einer milden Hämophilie. Wahrscheinlich haben die zwölf deletierten Aminosäuren eine wichtige funktionelle Bedeutung im FVIII-Protein. Darüber hinaus wurde bei der stillen Mutation c.1569G>T, p.Leu504Leu im Exon 11 auf RNA-Ebene die gleiche 36-bp-Deletion am Anfang von Exon 11 beobachtet. Alamut gab für diese stille Mutation, die 32 Basen im Exon 11 liegt, an, dass jene Teil einer ESE-Region ist und somit die Nutzung der kryptischen Spleißstelle unterstützt. Beide Patienten mit der stillen Mutation weisen einen milden Phänotyp auf.

In Ergänzung der mRNA-Untersuchungen wurde eine Liste aller bisher in der Literatur experimentell verifizierten Spleißmutationen erstellt (Anlage 3, Tabelle 3). Um die Spleißvorhersage von Alamut zu evaluieren, wurden die Alamut-Vorhersagen mit den verifizierten Ergebnissen aus der Literatur verglichen. Daraus ergab sich, dass von insgesamt 220 Vorhersagen 109 richtig waren, während 63 die richtige Tendenz hatten, aber nur einen minimalen Effekt anzeigten, und 48 eine unzutreffende Vorhersage machten. Die meisten inkorrekten Vorhersagen fielen bei stillen Mutationen, Insertionen, Deletionen und weit im Intron liegenden Substitutionen an. In diesen Fällen sind die Spleißvorhersage-Parameter von Alamut wahrscheinlich nicht gut angepasst. Außerdem ist die Nutzung von Alamut bei Spleißmutationen, welche weit im Intron liegen, sehr eingeschränkt, da hier der dargestellte Sequenzausschnitt zu beiden Seiten der Mutation zu gering ist. Doch die Kombination der fünf in Alamut inte-

grierten Spleißvorhersage-Programme lieferte im Allgemeinen gute Übereinstimmungen mit den durchgeführten mRNA-Analysen, auch wenn einzelne Programme gelegentlich versagten.

Die mRNA-Analysen ermöglichten die Untersuchung und Validierung von insgesamt vier weiteren mutmaßlichen Spleißstellen-Mutationen. Mittels dieser und in der Literatur beschriebener, verifizierter mRNA-Untersuchungen im *F8*-Gen, konnte die Spleißvorhersage-Software der interaktiven Biosoftware Alamut evaluiert werden. Trotz einiger Mängel bei einzelnen Vorhersagen, sind die kombinierten Ergebnisse von Alamut meistens sehr verlässlich.

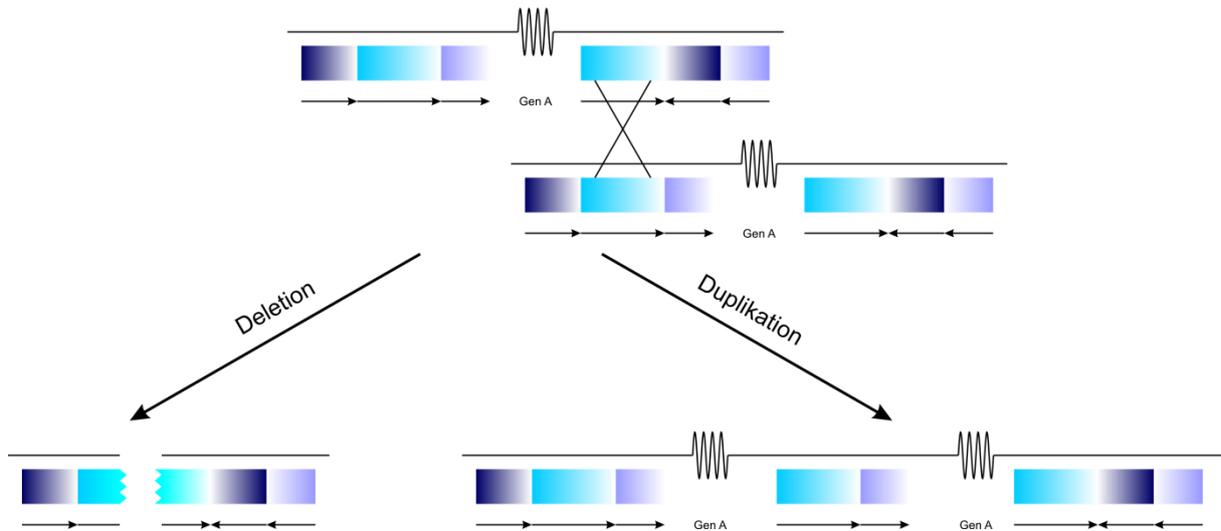
### 6.4 Charakterisierung von Duplikationsbruchpunkten im Faktor-VIII-Gen

Erst durch die Entwicklung einer spezifischen MLPA, die Sonden für alle Exons des *F8*-Gens umfasst, konnten für Hämophilie A ursächliche Duplikationen relativ einfach identifiziert werden [83]. Inzwischen wird diese Methode in der Hämophilie-A-Routinediagnostik angewandt. Hiermit wurden im Laufe der letzten Jahre ungefähr 2.500 Hämophilie-A-Patienten untersucht, von denen 16 eine große Duplikation im *F8*-Gen aufwiesen (Inzidenz 0,6–0,7 %). Da die Entstehung von Duplikationen im *F8*-Gen noch ungeklärt ist, sollte die Untersuchung der Duplikationsbruchpunkte Aufschluss über die zugrunde liegenden Mechanismen geben. Unter der Annahme, dass die duplizierten Elemente sich in einer tandemartigen Anordnung befinden, wurde mittels Long-Range-PCR versucht ein Fragment zu amplifizieren, welches den Bruchpunkt enthalten müsste. Hierzu wurden Primer in die an den Bruchpunkt angrenzenden Exons gelegt (siehe Anlage 4, Abbildung 1). Wenn kein Fragment amplifiziert werden konnte, wurden neue intronische Primer gewählt und miteinander kombiniert. Auf diese Weise konnte für insgesamt zehn Patienten je ein Fragment hergestellt werden, das jeweils den entsprechenden Bruchpunkt beinhaltete (siehe Anlage 4, Tabelle 1). Durch schrittweise Sequenzierung konnte letztendlich der Übergangsbereich zwischen den Duplikationen definiert und analysiert werden. Die direkten Bruchpunktsequenzen wurden innerhalb der vorangehenden Diplomarbeit erarbeitet und sind in Anlage 4, Abbildung 2 dargestellt. Die kleinste Duplikation umfasst 3 kb, die größte ungefähr 165 kb. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden die Bruchpunktsequenzen mit Hilfe von verschiedenen bioinformatischen Programmen näher analysiert.

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

Das Programm RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) ermöglichte die Identifizierung von repetitiven Einheiten innerhalb der Sequenzen zu beiden Seiten des Bruchpunktes. Bei insgesamt vier Patienten (7, 9, 15, 16) konnten jeweils zwei SINEs (short interspersed nuclear elements) in den angrenzenden Sequenzen aufgezeigt werden. SINEs, aber vor allen Dingen speziell Alu-Elemente, wurden oft in Zusammenhang mit ungleichen Rekombinationsprozessen gebracht [157]. Wenigstens drei Deletionen im *F8*-Gen wurden auf eine Alu-induzierte ungleiche Rekombination zurückgeführt [158–160]. Die Bruchpunkte der Patienten 7 und 9 sind nicht weit voneinander entfernt und befinden sich in den gleichen SINEs in den Introns 22 und 25. Bei diesen SINEs handelt es sich um zwei Alu-Elemente, die zu 89 % homolog sind (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Beide Patienten leiden an einer schweren Hämophilie, obwohl die Duplikation der Exons 23–25 in Tandem vorliegt und zu keiner Leserasterverschiebung führt. Daher wird vermutet, dass die Duplikation die Struktur der betroffenen C1- und C2-Domänen des FVIII-Proteins sehr stark beeinflusst und somit maßgeblich zum Schweregrad der Hämophilie beiträgt [100]. Die Duplikation des einzelnen Exons 6 wurde in zwei unabhängigen Patienten (15 + 16) mit milder Hämophilie nachgewiesen. Die Bruchpunkte und die dadurch entstandenen duplizierten Fragmente der beiden Patienten waren erstaunlicherweise identisch. Wie auch bei den Patienten 7 und 9, liegen auch hier die Bruchpunkte in Alu-Elementen, die eine 78-%ige Homologie aufweisen. Da diese Tandem-Duplikation relativ klein ist (39 Aminosäuren) und zu keiner Leserasterverschiebung führt, sind die Auswirkungen auf Protein-Ebene wahrscheinlich sehr gering und führen daher zu einem milden Hämophilie-A-Phänotyp. Überdies lässt die Übereinstimmung der Bruchpunkte dieser beiden Patienten vermuten, dass die Duplikation des Exons 6 entweder rekurrent ist oder die beiden Patienten über eine weitläufige Verwandtschaft ein gleiches Allel besitzen. „Non-allelic homologous recombination“ (NAHR) ist einer der Mechanismen, die zur Entstehung von rekurrenten Genumlagerungen führen können [161] (Abbildung 13).

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse



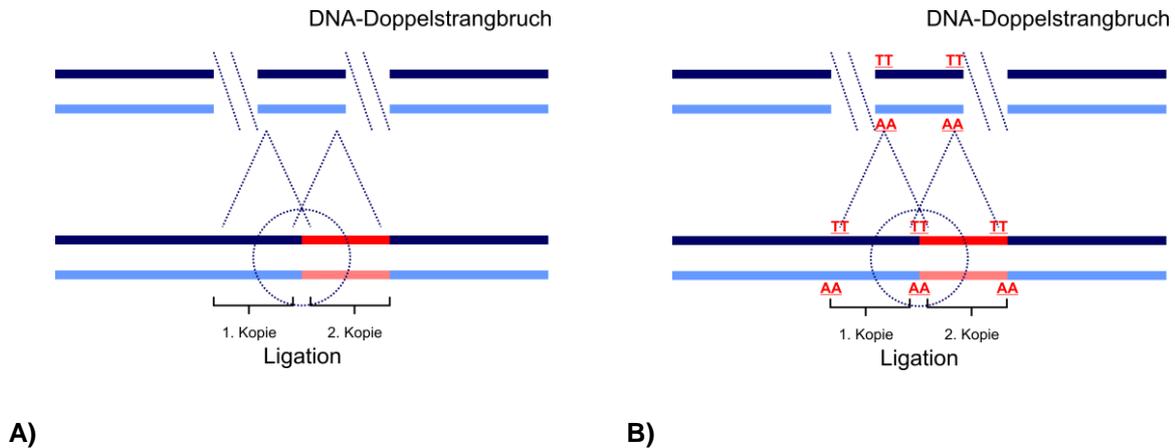
**Abbildung 13: Schematische Illustration des NAHR-Mechanismus. Hierbei kommt es zwischen zwei homologen, aber nicht allelischen Sequenzen zu einem Rekombinationsereignis. Daraus resultiert ein Verlust oder ein Zugewinn von Chromosomen-Material [162].**

Auslöser für NAHR sind entweder ungleiche Crossing-over-Ereignisse innerhalb von Reparatur-Vorgängen oder BIR (break-induced replication), wenn nach Abbruch der Replikationsgabel neue homologe Sequenzen für einen Neustart benötigt werden [163]. NAHR ist gewöhnlich auf eine Sequenzhomologie von über 95 % bei einer Länge von mehr als 1 kb angewiesen. Allerdings wurde von einigen Fällen berichtet, bei denen homologe Alu-Elemente einen NAHR-Mechanismus ausgelöst haben, der auch seltene CNVs (copy number variation) verursacht [161]. Daher wird angenommen, dass die Duplikationen der Patienten 7, 9, 15 und 16 ursprünglich durch den NAHR-Mechanismus entstanden sind.

Bei insgesamt fünf Patienten (1, 2, 4, 6 und 8) konnten in mindestens einer Bruchpunkt-angrenzenden Sequenz verschiedene LINEs (long interspersed nuclear elements) entdeckt werden, welche eine deutlich geringere Homologie aufweisen als SINEs. Ein einziger Patient (13) wies überhaupt keine repetitiven Elemente in der Nähe des Bruchpunktes auf, doch wurden bei diesem im Bruchpunkt vier inserierte Basen detektiert. Auch bei Patient 4 wurden 18 bp in den Bruchpunkt inseriert. Ferner konnten in drei Bruchpunkten (Patient 2, 6 und 8) Mikrohomologien festgestellt werden, die 2–3 bp umfassen. Wenn keine ausgedehnten Homologien um die Bruchpunkte aufzufinden sind, können auch andere Mechanismen die Formation von Duplikationen erklären: NHEJ (Non-homologous end-joining) und MMEJ (microhomology-mediated end-joining) sind zwei DNA-Reparaturmechanismen, die keine

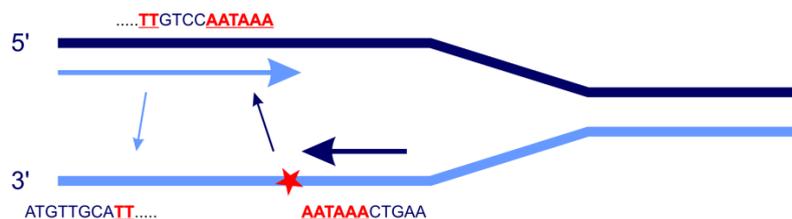
## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

oder nur eine minimale Sequenzhomologie innerhalb des Bruchpunktes benötigen, um einen Doppelstrangbruch wieder zusammenfügen zu können (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Schematische Illustration des A) NHEJ- und B) MMEJ-Mechanismus. Nach einem Doppelstrangbruch kommt es bei NHEJ zur Verknüpfung freier Enden. Bei MMEJ kommt es nach einem Doppelstrangbruch zur Verknüpfung von mikrohomologen Stellen [162].**

Darüber hinaus kann auch MMBIR (microhomology-mediated break-induced replication), ein Mechanismus, der auf der BIR-Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen basiert, zu der Entstehung von Duplikationen führen [163] (Abbildung 15). MMEJ und MMBIR können beide Mikrohomologien und auch Insertionen am Bruchpunkt hervorrufen.



**Abbildung 15: Schematische Illustration des MMBIR-Mechanismus. Innerhalb der Replikationsgabel kommt es zum Abbruch der Replikation. Ein Neustart beginnt an einer mikrohomologen Stelle [162].**

Die Patienten 1, 2, 6, 8 und 13 leiden alle an einer schweren Hämophilie A, da die jeweiligen Duplikationen zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einem vorzeitigen Stopp-Signal in der FVIII-Proteinsequenz führen.

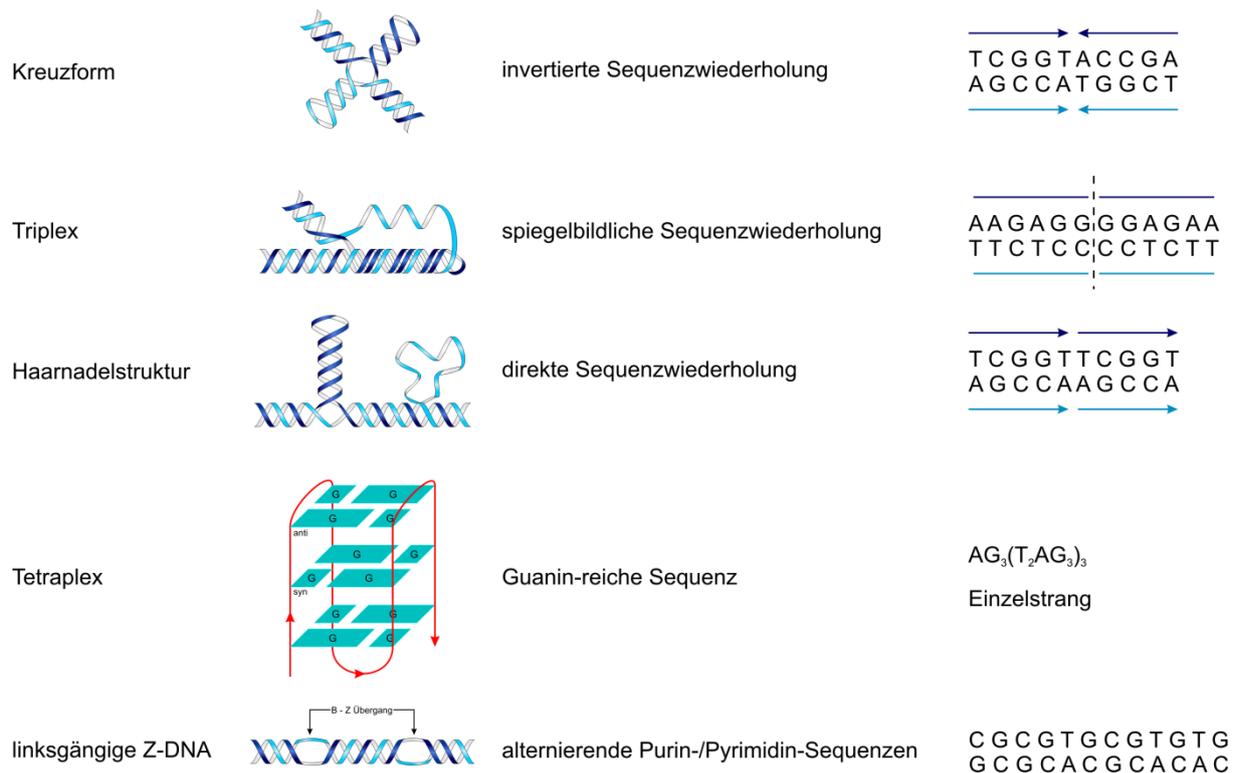
Die Duplikation des einzelnen Exons 13 von Patient 4 beruht auf einem Founder-Effekt, da diese zuvor schon von einer italienischen Arbeitsgruppe bei einem Patienten mit milder Hämophilie detailliert beschrieben wurde [164] und des Weiteren vornehmlich im Norden von Italien häufig bei Patienten mit mildem Phänotyp auftritt

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

[165]. Auch der hier untersuchte Patient zeigt einen milden Hämophilie-A-Verlauf, der wahrscheinlich durch die Beibehaltung des Leserasters begründet ist.

Murru et al. [164] brachte die Entstehung von Duplikationen in Zusammenhang mit Topoisomerase-Bindestellen, die sich in der Nähe solcher Duplikationen auffinden ließen. Auch Translin-Bindestellen wurden oft in direkter Nähe von Bruchpunkt-Grenzen lokalisiert und mit Rekombinationen in Verbindung gebracht [166, 167]. Mit Hilfe des Programms Fuzznuc (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc>) wurden die angrenzenden Sequenzen der zehn sequenzierten Bruchpunkte auf Topoisomerase- und Translin-Bindestellen durchsucht. Des Öfteren wurde auch die Entstehung von genomischen Umlagerungen auf DNA-Konformationen im Bruchpunkt zurückgeführt, die nicht der normalen B-Helix-Form entsprachen [162, 168, 169]. Durch die Software RepeatAround (<http://portugene.com/repeataround.html>) konnten direkte Sequenzwiederholungen, welche Haarnadelstrukturen in der DNA verursachen, spiegelbildliche Sequenzwiederholungen, die zu Triplexstrukturen und einzelsträngigen DNA-Schleifen führen, und invertierte Sequenzwiederholungen, welche kreuzförmige DNA-Schleifen verursachen, detektiert werden. Zusätzlich ermöglichte das bioinformatische Werkzeug ZHunt (<http://gac-web.cgrb.oregonstate.edu/zDNA>) die Identifizierung von links-gängiger DNA und das Programm QGRS (quadruplex-forming G-rich sequence) Mapper (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>) die Aufdeckung von Guanin-reichen Sequenzen, welche Tetraplexstrukturen in der DNA auslösen können (Abbildung 16).

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

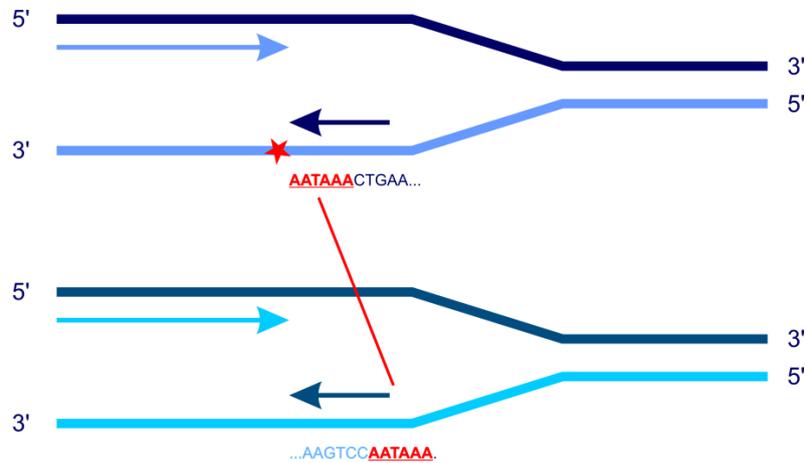


**Abbildung 16: Übersicht über verschiedene DNA-Konformationen. Durch diverse Sequenzwiederholungen kann die DNA von ihrer normalen B-Form in eine andere Konformation wechseln [168].**

Eine Übersicht über die durchgeführte bioinformatische Auswertung der Bruchpunktsequenzen ist in Anlage 4, Abbildung 3 zu sehen. Die Untersuchung ergab, dass in den Bruchpunkt-angrenzenden Sequenzen bei allen Patienten direkte Sequenzwiederholungen aufzufinden sind, die durch ihre DNA-destabilisierende Wirkung zu der Entstehung einer Duplikation beitragen können. Weiterhin wurden bei einigen Patienten auch invertierte und spiegelbildliche Sequenzwiederholungen, QGRS und Translin-Bindestellen entdeckt. Diese könnten ebenfalls bei der Duplikationsbildung mitwirken. Leider konnten innerhalb der vorangegangenen Diplomarbeit und der hier vorgestellten Arbeit nicht alle Duplikationsbruchpunkte mittels Long-Range-PCR aufgeklärt werden. Bei drei Patienten (10, 11 und 14) wurden Duplikationen erfasst, die entweder von oder bis zum Intron 22 reichen. Da das Intron 22 auch sehr stark in Inversionsprozesse involviert ist und durch die hier vorgenommene Untersuchung eine Duplikation in Tandem ausgeschlossen werden konnte, wird in diesen Fällen als Mechanismus eine Kombination aus Duplikation und Inversion vermutet. Bisher wurde in der Literatur nur ein Fall beschrieben, bei dem eine Intron-22-Inversion zusammen mit einer Deletion der Exons 16–22 nachgewiesen werden konnte [170]. Zusätzlich zur Duplikation der Exons 1–22 wurde durch MLPA auch eine Triplikation der Exons

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

23–25 bei Patient 12 identifiziert. Auch hier liegt wahrscheinlich ein komplexer Entstehungsmechanismus vor, der durch Long-Range-PCR nicht aufzuklären ist. Beschriebene komplexe Genumlagerungen sind vermutlich durch Mechanismen wie MMBIR oder FoSTeS (fork stalling and template switching) entstanden [171].



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des FoSTeS-Mechanismus. Nach einem Replikationsabbruch kommt es zu einem Neustart an einer vorigen Replikationsgabel, die eine Mikrohomologie aufweist [162].**

Darüber hinaus konnte bei zwei Patienten (5 + 14) keine Bruchpunktbestimmung stattfinden, da sich die Bruchpunkte in nicht abschätzbarer Entfernung im 5'- bzw. 3'-untranslatierten Bereich des *F8*-Gens befinden. Die Bruchpunktbestimmung des Patienten 3 blieb auch erfolglos. Möglicherweise ist die vorliegende Duplikation des Exons 14 nicht in Tandem. Trotzdem müsste das duplizierte Exon innerhalb des *F8*-Gens liegen, da sonst der schwere Phänotyp des Patienten nicht erklärt werden könnte.

Mittels dieser Studie konnten letztendlich zehn von 16 Tandem-Duplikationsübergängen aufgeklärt und bioinformatisch untersucht werden. Vier der Duplikationen entstanden wahrscheinlich durch NAHR, während sechs weitere durch Mechanismen wie NHEJ, MMEJ oder MMBIR hervorgerufen wurden. Eine komplette Aufklärung aller Bruchpunkte konnte nicht vorgenommen werden, da die Möglichkeiten der Untersuchung von untranslatierten Bereichen und komplexen Umlagerungen sehr eingeschränkt sind.

## 6.5 Analyse von auffälligen Intron-22- und Intron-1-Inversionen

Die ursprüngliche Methode zum Nachweis der rekurrenten Intron-22-Inversion war der Southern Blot [44]. Inzwischen ist die Detektion mittels Long-Range-PCR oder inverser PCR deutlich einfacher und zeitsparender [97, 172]. Die rekurrente Intron-1-Inversion kann dagegen mit zwei unterschiedlichen PCRs, die jeweils drei Primer verwenden, diagnostiziert werden [46]. Innerhalb der Routinediagnostik wurden insgesamt vier Intron-22-Inversionen und zwei Intron-1-Inversionen aufgedeckt, die ein abnormales Bandenmuster in der Southern-Blot- und/oder der PCR-Diagnostik vorwiesen. Daraufhin wurden diese Fälle innerhalb der vorangehenden Diplomarbeit nachträglich mit Hilfe einer MLPA untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem noch separate PCRs zur Abklärung der Inversions-Übergangsbereiche und Long-Range-PCR-Studien zur genauen Bruchpunkt-Aufklärung durchgeführt (Anlage 5, Abbildung 1).

Patient 10 wies ein heterozygoten Bandenmuster bei der Long-Range-PCR zur Diagnose einer Intron-22-Inversion auf. Zur genauen Abklärung wurden ergänzend separate PCRs zum Nachweis der Intron-22-Inversions-Übergangsbereiche durchgeführt. Hierbei konnte nur einer der beiden Inversionsbruchpunkte identifiziert werden. Die MLPA-Analyse ergab eine zusätzliche Duplikation des Exons 22.

Für Patient 11 konnte auf ein Southern-Blot-Ergebnis zurückgegriffen werden, das ein heterozygoten Bandenmuster mit einer fehlenden Inversionsbruchpunkt-Bande zeigte. Durch Long-Range-PCR konnte ein heterozygoten Bandenmuster nachgewiesen werden, aber eine genaue Abklärung der Inversions-Übergangsbereiche ließ auch hier das Vorhandensein nur eines Inversionsbruchpunktes erkennen. Weiterhin dokumentierte die MLPA-Analyse die Duplikation der Exons 7–22.

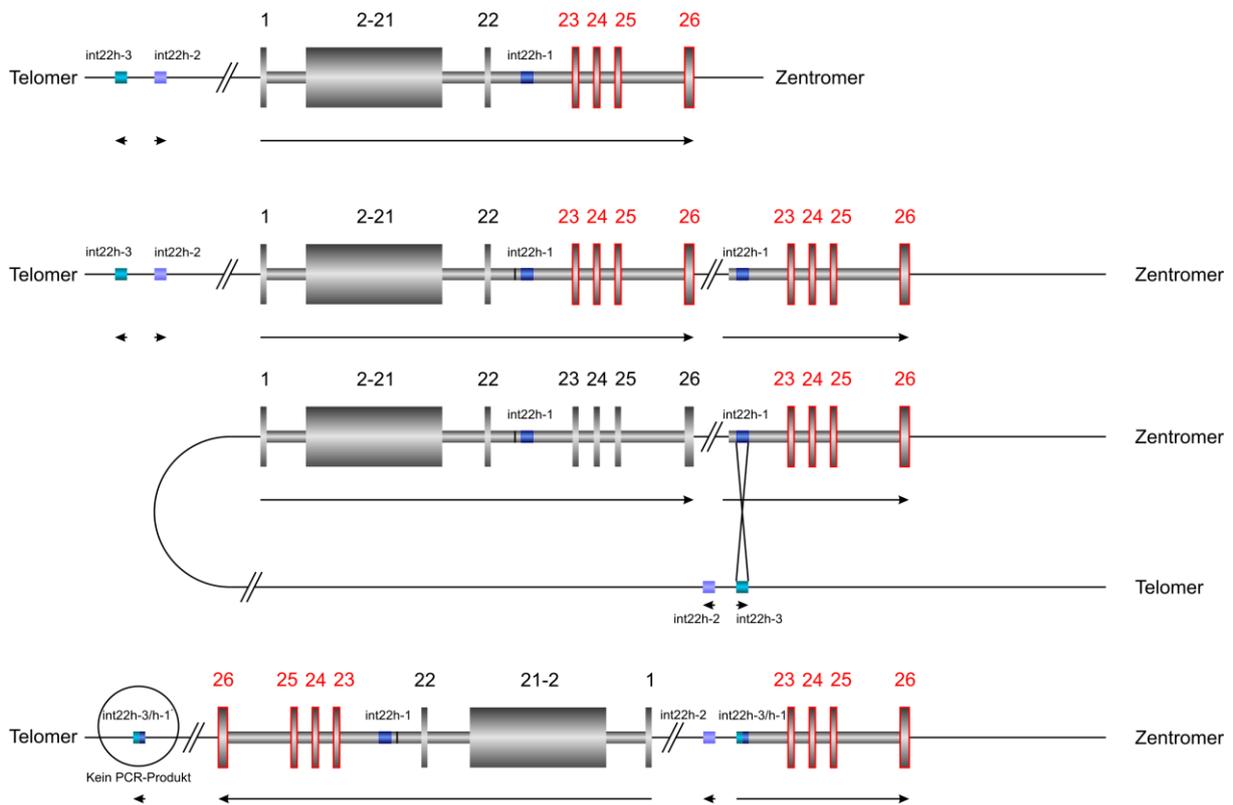
Die Southern-Blot-Untersuchung des Patienten 12 offenbarte ein vermutlich wildtypisches Bandenmuster mit einer zusätzlichen kleineren Bande, die wahrscheinlich durch die Duplikation der Exons 1–22 und der zusätzlichen Triplikation der Exons 23–25 zu erklären ist. Das Ergebnis der Long-Range-PCR-Analyse war unauffällig.

Des Weiteren wurde bei Patient 14 wie bei Patient 11 ein heterozygoten Bandenmuster mit einer fehlenden Inversionsbruchpunkt-Bande und einer verkürzten zusätzlichen Bande im Southern Blot festgestellt. Der fehlende Inversions-Übergangsbereich konnte mittels spezifischer Long-Range-PCR bestätigt werden. Die Inversions-PCR

zeigte ein heterozygoten Bandenmuster und die MLPA-Analyse eine Duplikation der Exons 23–26.

Das auffällige Southern-Blot-Untersuchungsergebnis von Patient 12 lässt sich wahrscheinlich allein auf die komplexe Duplikation mit Triplikation im *F8*-Gen zurückführen. Weitere Long-Range-PCR-Studien konnten keine Duplikationsbruchpunkte aufklären, was vermuten lässt, dass die Duplikation mit Triplikation nicht in Tandem vorliegt. Die heterozygoten Long-Range-PCR-Bandenmuster der Patienten 10, 11 und 14 wie auch die auffälligen Southern Blots können nicht allein mit den zusätzlichen positiven MLPA-Befunden erklärt werden. Die Existenz von nur einem Intron-22-Inversionsbruchpunkt deutet an, dass eine Inversion stattgefunden hat, aber wahrscheinlich der zweite Inversionsbruchpunkt von einem anderen Umlagerungsereignis wie einer Duplikation beeinträchtigt wurde. Für die drei Patienten 10, 11 und 14 wird also ein Inversionsereignis mit einem kombinierten Duplikationsereignis angenommen. Anschließend Long-Range-PCRs mit verschiedenen Primer-Kombinationen neben den jeweils vermuteten Inversions-Duplikations-Brechpunkten waren nicht erfolgreich. In Abbildung 18 und Anlage 5, Abbildung 2 wird für die Patienten 10 und 14 je ein Mechanismus vorgeschlagen, der erst ein Duplikationsereignis und dann eine Intron-22-Inversion vorschlägt. Der neu entstandene Genotyp der Patienten könnte die auffälligen Intron-22-Inversions-PCRs erklären.

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse



**Abbildung 18: Schematische Darstellung eines potenziellen Mechanismus zur Aufklärung der kombinierten Intron-22-Inversion mit Duplikation des Patienten 14. Hierbei wird angenommen, dass zunächst eine Duplikation der Exons 23–26 und anschließend eine Intron-22-Inversion stattfindet.**

Für die Intron-1-Inversion werden zwei getrennte PCRs durchgeführt, wobei sich die Ergebnisse der beiden PCRs ergänzen sollten. Dies war nicht der Fall bei Patient 2, der eine hemizygoten Intron-1-Inversion in der ersten PCR und ein wildtypisches Bandenmuster in der zweiten aufzeigte. Eine zusätzlich durchgeführte MLPA-Untersuchung deckte eine Deletion des Exons 1 auf (Anlage 5, Abbildung 3).

Im Gegensatz dazu zeigten Patient 4 und eine weibliche Verwandte ein heterozygoten Bandenmuster bei der Intron-1-Inversions-PCR. In diesen Fällen identifizierte eine MLPA-Analyse eine hemi- bzw. eine heterozygote Duplikation des Exons 1 (Anlage 5, Abbildung 3).

Auch bei diesen beiden Patienten können die MLPA-Ergebnisse allein nicht die Inversions-PCR-Bandenmuster erklären. Die Intron-1-Inversions-PCRs des Patienten 2 deuten wieder auf die Existenz eines einzelnen Inversionsbruchpunktes. Der zweite ist wahrscheinlich von einem Deletionsereignis betroffen, genauso wie die wildtypische Kontrollbande der PCR 1. Bei Patient 4 konnte ebenfalls nur ein Intron-1-Inversionsbruchpunkt identifiziert werden. Hier wird ebenso vermutet, dass das Duplikationsereignis den zweiten Inversionsbruchpunkt behindert. Auch für diesen Patien-

ten wird in Anlage 5, Abbildung 2 ein Entstehungsmechanismus dargestellt, der erst ein Duplikations- und dann ein Intron-1-Inversionsereignis annimmt.

Innerhalb dieser Studie konnte bewiesen werden, dass in mindestens fünf Patienten ein Inversionsereignis mit einem Duplikations- bzw. Deletionsereignis kombiniert wurde. Beim Auftreten von ungewöhnlichen oder zusätzlichen Inversionsbanden bietet sich daher immer eine weiterführende MLPA-Analyse an. Die genaue Untersuchung der jeweiligen Genumlagerungen ist allerdings herausfordernd und benötigt neue Techniken.

### 6.6 Untersuchung von Faktor-VIII-Nonsense-Mutationen im Hinblick auf die Entwicklung von Hemmkörpern

Wie schon beschrieben, ist die Hemmkörperbildung eine bekannte Nebenwirkung der FVIII-Substitutionstherapie [173]. Allgemein wird vermutet, dass Mutationen, die für eine komplette Abwesenheit des FVIII-Proteins sorgen, mit einem höheren Risiko für eine Hemmkörperhämophilie assoziiert sind als Mutationen, die für eine Reduktion der FVIII-Aktivität verantwortlich sind [117]. Wenn das Immunsystem des hämophilen Patienten niemals Kontakt mit dem FVIII-Protein haben konnte, kommt es wahrscheinlich zu einer Immunisierungsreaktion, weshalb Antikörper gegen substituierte FVIII-Präparate produziert werden. Im Zuge einer ausführlichen Metaanalyse konnte bestätigt werden, dass Nonsense-Mutationen allgemein mit einem sehr hohen Risiko behaftet sind, FVIII-Inhibitoren zu entwickeln und vor allen Dingen Nonsense-Mutationen in der leichten Kette. Diese Tatsache ist erstaunlich, da eigentlich eine inverse Korrelation der Menge an FVIII-Protein, das in der Blutzirkulation vorliegt, und des Risikos eine Hemmkörperhämophilie zu entwickeln angenommen wird. Im direkten Vergleich konnte bei 43 % aller Patienten mit Nonsense-Mutation in der leichten Kette eine Hemmkörperbildung beobachtet werden, im Gegensatz dazu bei nur 12 % aller Patienten mit Mutation in der schweren Kette [117]. Dieses Phänomen sollte mit Hilfe eines FVIII-Expressionssystems auf mRNA-, Protein- und Zellebene untersucht werden.

Hierzu wurde die komplette *F8*-cDNA in einen pCIneo-Vektor kloniert. Mit dem wildtypischen *F8*-Konstrukt wurden anschließend Mutagenesen vorgenommen, wobei in jede FVIII-Domäne eine bei Patienten natürlich vorkommende Nonsense-Mutation eingefügt wurde (R336X/A1-Domäne, R583X/A2-Domäne, R795X/B-Domäne, R1941X/A3-Domäne, R2116X/C1-Domäne, R2209X/C2-Domäne). Die sechs ver-

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

schiedenen mutierten *F8*-Konstrukte, das wildtypische Konstrukt und ein pCIneo-Vektor ohne Insert wurden jeweils in HEK293- und COS7 (CV1 Origin Simian Virus 40)-Zellen transient transfiziert und für eine FVIII-Expression inkubiert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen und die Zelllysate isoliert und untersucht.

Für die mRNA-Untersuchung wurden nur COS7-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert, da die transfizierte menschliche mRNA von der endogenen Affen-mRNA durch spezifische PCR unterschieden werden kann. Aus den COS7-Zelllysaten wurde die mRNA isoliert und cDNA synthetisiert. Um die cDNA des menschlichen *F8*-Gens zu erfassen, wurden spezifische Primer für sechs verschiedene PCR-Produkte in den sechs FVIII-Domänen entwickelt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese und anschließender Sanger-Sequenzierung analysiert. Letztendlich konnten in allen Zelllysaten die cDNAs aller Domänen detektiert werden außer in den Zelllysaten der mock-Transfektion und der untransfizierten Zellen (Anlage 6, Abbildung 1). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass trotz eingeführter Nonsense-Mutation eine normale *F8*-Transkription möglich ist und kein oder nur minimaler NMD erfolgt. Ähnliche Resultate wurden auch von David et al. [174] publiziert. In dieser Studie wurden in einen BDD (B domain deleted)-*F8*-Vektor zwei verschiedene Nonsense-Mutationen eingebracht. Nach einer stabilen Transfektion des wildtypischen und der zwei mutierten Konstrukte in CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen, konnte die mRNA isoliert und mit Real-Time-PCR untersucht werden. Die Analyse ergab die gleiche Quantität und Qualität aller PCR-Produkte, die aus cDNA der drei verschiedenen Zelllysate gewonnen wurden.

Für die Untersuchung der FVIII-Aktivität wurden HEK- und COS7-Zellen mit den verschiedenen *F8*-Konstrukten transfiziert (Anlage 6, Abbildung 2). In beiden Zelllinien konnte FVIII-Aktivität (FVIII:C) im Überstand und im Zelllysate von wildtypisch transfizierten Zellen nachgewiesen werden, wobei die gemessenen Aktivitäten in HEK-Zellen höher waren als in COS7-Zellen. Des Weiteren war in COS7-Zellen die FVIII-Aktivität im Überstand von wildtypisch transfizierten Zellen höher als im Zelllysate, wohingegen sich dieser Sachverhalt in HEK-Zellen genau gegensätzlich verhielt. Die FVIII-Aktivitäten der Überstände und Zelllysate aller Transfektionen mit allen Nonsense-Konstrukten waren nahezu null. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Nonsense-Mutationen die Synthese von aktivem FVIII-Protein im Zelllysate wie auch im Überstand drastisch reduzieren und somit einen schweren Hämophilie-A-Phänotyp verursachen können. Die unterschiedlichen Werte von wildtypischen HEK- und COS7-

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

Transfektionen sind wahrscheinlich auf unterschiedliche zellspezifische Eigenschaften zurückzuführen, die die Expression modulieren. Die gemessenen Aktivitätslevels sind jedoch nicht mit den Aktivitätswerten von Patienten-Blutproben zu vergleichen.

Weiterhin wurde zur Detektion von inaktivem oder fragmentiertem FVIII-Protein ein polyklonaler Antigen (Ag)-ELISA-Assay herangezogen (Anlage 6, Abbildung 3). Interessanterweise konnte im Überstand von wildtypisch transfizierten Zellen nur ein minimaler FVIII:Ag-Wert nachgewiesen werden. Auch in allen anderen Überständen lag der gemessene FVIII:Ag-Wert nahe bei null, d.h. von mock-transfizierten Zellen. Nachweisbare FVIII:Ag-Werte fanden sich nur in den Zelllysaten. Nach Transfektion mit dem Wildtyp-Konstrukt, dem R1941X/A3-, R2116X/C1- oder dem R2209X/C2-*F8*-Plasmid konnten im Zelllysate sehr hohe FVIII:Ag-Werte detektiert werden. Nur minimale Antigen-Levels waren in Zelllysaten der R336X/A1-, R583X/A2- und R795X/B-Transfektionen nachzuweisen. Dieser Versuch wurde in beiden Zelllinien mit identischen Ergebnissen durchgeführt.

Durch Verwendung von monoklonalen Antigen-ELISA-Assays wäre es prinzipiell möglich, die Zusammensetzung der trunkierten Proteine näher zu charakterisieren. Es stand nur ein monoklonaler Assay zur Verfügung, dessen Detektionsantikörper die C2-Domäne des FVIII-Proteins erkennen soll (Anlage 6, Abbildung 4). Mit diesem Assay konnte in keinem der Überstände FVIII:Ag detektiert werden. Auch die Antigenwerte der Zelllysate waren nur minimal. Einzig im Zelllysate von Transfektionen mit dem Wildtyp-Konstrukt konnte ein ähnlich hoher FVIII:Ag-Level wie beim polyklonalen Antigenassay gemessen werden. Eine Differenzierung der trunkierten Proteine war also mit diesem Ansatz nicht möglich. Unter Berücksichtigung beider Assay-Resultate wird vermutet, dass bei einer Transfektion mit den Konstrukten R1941X/A3, R2116X/C1 und R2209X/C2 tatsächlich verkürzte FVIII-Proteine in der Zelle hergestellt werden können, die dann aber in der Zelle zurückgehalten und nicht sezerniert werden. Wie schon erwähnt, wurden von David et al. [174] ähnliche Experimente mit einem BDD-*F8*-Konstrukt und zwei BDD-*F8*-Nonsense-Konstrukten in einer stabilen CHO-Zelllinie durchgeführt: Ein monoklonaler Antigenassay mit Detektionsantikörper in der leichten Kette zeigte keinen messbaren Antigenwert im Überstand der wildtypisch transfizierten Zellen. Nach mehreren Selektionsrunden mit Methotrexat zur Herstellung einer stabilen Zelllinie, konnte dagegen ein FVIII:Ag-Wert gemessen werden. Weiterhin konnten David et al. [175] kein FVIII:Ag im Überstand von Zellen detektieren, welche mit den Konstrukten R1966X/A3/BDD oder

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

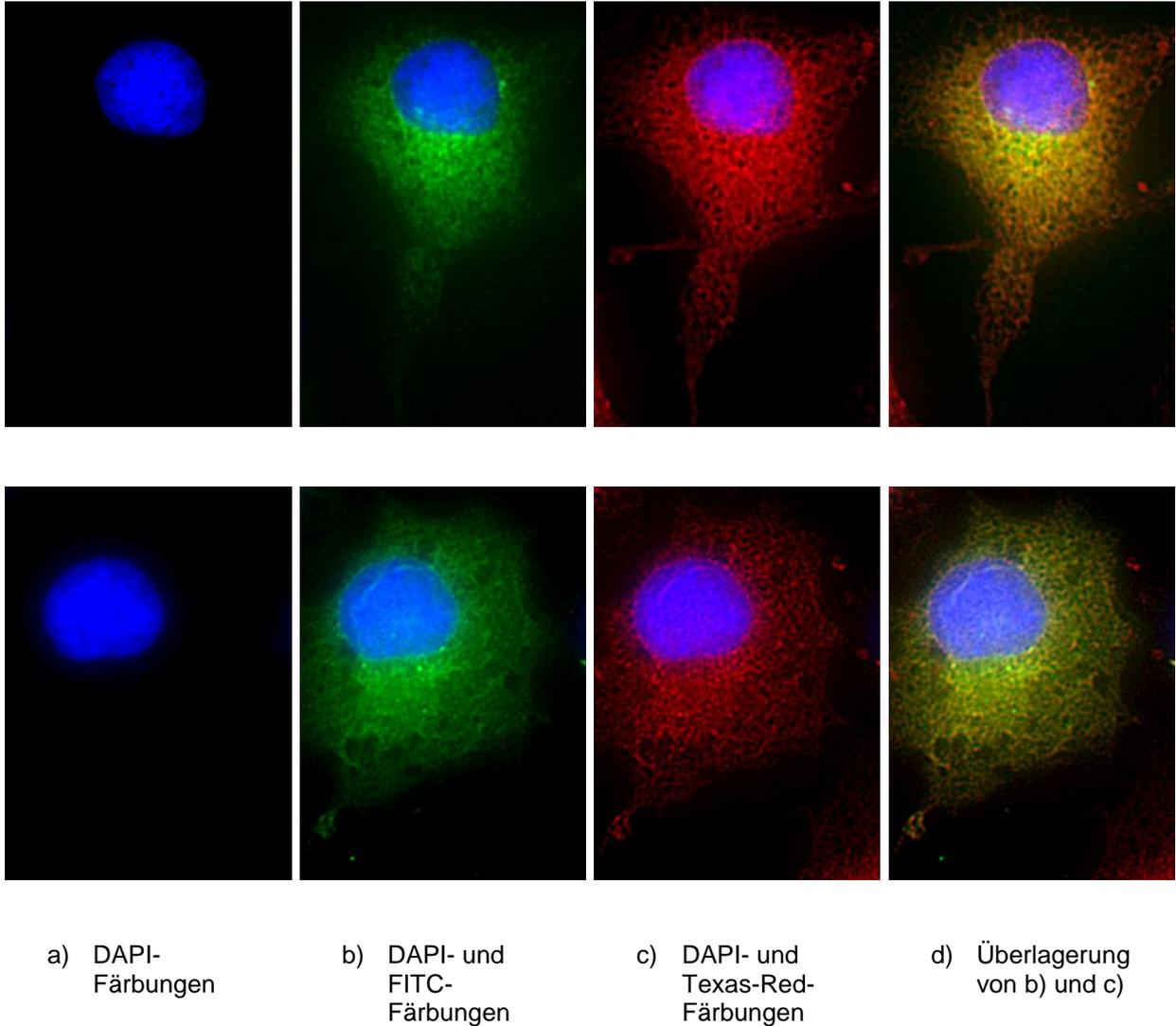
R2116X/C1/BDD stabil transfiziert wurden. Im Gegensatz dazu konnte allerdings ein relativ hoher FVIII:Ag-Wert für das Lysat von wildtypisch transfizierten Zellen und geringe aber detektierbare Werte für die Lysate von R1966X/A3/BDD- und R2116X/C1/BDD-transfizierten Zellen bestimmt werden. Die letztgenannten Messwerte sind im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen in COS7- und HEK-Zellen. Die messbaren FVIII:Ag-Werte der R1966X/A3/BDD- und R2116X/C1/BDD-Zelllysate sind wahrscheinlich auf eine verstärkte FVIII-Expression in stabilen Zelllinien zurückzuführen. Ungeachtet dessen, kann bei genauer Betrachtung aller Antigenmessungen ein Zusammenhang festgestellt werden zwischen trunkierten FVIII-Proteinen inklusive B-Domäne (R1941X/A3, R2116X/C1 und R2209X/C2) und trunkierten FVIII-Proteinen ohne B-Domäne (R336X/A1, R583X/A2, R795X/B, R1966X/A3/BDD und R2116X/C1/BDD): In Anwesenheit der B-Domäne werden die Proteine in der Zelle zurückgehalten und nicht sezerniert. Bei Abwesenheit der B-Domäne kommt es offenbar zu einem intrazellulären Abbau der Proteine.

Da die B-Domäne im reifen FVIII-Protein nicht enthalten und für die volle Aktivität entbehrlich ist, befassten sich in den letzten Jahren viele Arbeiten mit der Funktion der B-Domäne [176, 177]. Die große Anzahl von Glykosylierungsstellen spricht für eine wichtige intrazelluläre Funktion der B-Domäne [51, 178]. Diese Vermutung wurde von Ellgaard und Helenius [54] bestätigt, die nachweisen konnten, dass Mannosereiche, N-gebundene Oligosaccharide der B-Domäne an Chaperone wie Calnexin und Calreticulin binden. Diese Chaperone sorgen generell für die richtige Proteinfaltung und die Zurückhaltung von falsch gefalteten Proteinen im ER. Eine weitere Studie über die proteolytische Inaktivierung von aktiviertem FVIII-Protein kam zu dem Schluss, dass die Anwesenheit der B-Domäne die Domänen A1 und A2 vor proteolytischem Verdau schützt [179]. Daher wird angenommen, dass die B-Domäne einen stabilisierenden Effekt auf trunkierte FVIII-Proteine hat. Verkürzte Proteine ohne B-Domäne scheinen der direkten Degradierung im Zellinneren ausgesetzt zu sein (niedrige Antigenwerte), während trunkierte Proteine mit B-Domäne sich in der Zelle ansammeln, aber nicht sezerniert werden können (hohe Antigenwerte). Offenbar wirken Chaperone, die an die interaktiven Glykosylierungsstellen der B-Domäne binden, als Qualitätskontrolleure: Sie erkennen falsch gefaltete FVIII-Moleküle, deren Weitertransport verhindert wird. Darum werden wahrscheinlich verkürzte Proteine inklusive B-Domäne vom Zellinneren nicht nach außen gelangen können. Trunkierte Proteine ohne B-Domäne sind zwar vor einer intrazellulären Degradation nicht geschützt, aber

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

auch nicht am Transport aus der Zelle gehindert. Es ist denkbar, dass vereinzelte trunkierte Proteine ohne B-Domäne in die Blutbahn gelangen und dort für eine Sensibilisierung des Immunsystems ausreichen. FVIII wäre dann als ein „self“-Protein bekannt und substituierte FVIII-Präparate könnten somit keine Immunreaktion auslösen.

Zur Überprüfung dieser „Retentionshypothese“ sollte die subzelluläre Lokalisation der trunkierten, nicht sezernierten FVIII-Proteine untersucht werden. COS7-Zellen wurden mit verschiedenen *F8*-Konstrukten transfiziert, auf einem Deckgläschen kultiviert und anschließend mit verschiedenen Antikörpern angefärbt. Insgesamt wurden für die Detektierung des FVIII-Proteins fünf verschiedene monoklonale Antikörper gegen fünf verschiedene FVIII-Domänen (A1, A2, A3, C1 und C2) genutzt, die dann durch einen sekundären FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Antikörper als grüne Fluoreszenz dargestellt wurden. Zur Markierung des ER wurde ein weiterer Antikörper gegen Calnexin verwendet und mit einem sekundären Texas-Red-Antikörper sichtbar gemacht. Abbildung 19 zeigt die Lokalisation des wildtypischen FVIII-Proteins (grün) im ER (rot) von COS7-Zellen.



**Abbildung 19: Fluoreszenz-Färbungen von *F8*-Wildtyp-Transfektionen in COS7-Zellen. Mit Hilfe von a) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) konnte der Zellkern in Blau angefärbt werden, mit b) FITC das FVIII-Protein in Grün und mit c) Texas Red das ER in Rot. In d) wird ein Überlagerungsbild der drei Fluoreszenzfärbungen gezeigt.**

Bei einer Transfektion von COS7-Zellen mit den R336X/A1-, R583X/A2- und R795X/B-Konstrukten wurde keine grüne FVIII-Fluoreszenzfärbung beobachtet. Dagegen wurde in einem Teil der Zellen, die mit den R1941X/A3-, R2116X/C1- und R2209X/C2-Konstrukten transfiziert wurden, FVIII-Anfärbungen nachgewiesen (Anlage 6, Tabelle 2). Entsprechend der Lage des R1941X/A3-Nonsense-Codons ist zu erwarten, dass Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert wurden, ein verkürztes Protein ohne partielle A3-, komplette C1- und C2-Domäne produzieren. Bei Transfektionen mit dem R2116X/C1-Vektor sollte ein Protein mit verkürzter C1- und ohne C2-Domäne entstehen und Zellen, die mit dem R2209X/C2-Plasmid transfiziert wurden, sollten ein FVIII-Protein mit verkürzter C2-Domäne herstellen. Die Anzahl der für die einzelnen Antikörper in den

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

verschiedenen Transfektionen beobachteten FITC-positiven Zellen bestätigt diese Vermutungen weitgehend (Anlage 6, Tabelle 2). Generell wichen nur die Daten bei Verwendung des monoklonalen C2-Antikörpers von dem erwarteten Ergebnis ab. Dieser Antikörper bindet möglicherweise unspezifisch. Einschränkend ist zu bedenken, dass mit dieser Methode die Transfektionseffizienz nicht unabhängig bestimmt werden kann. Es konnte also nicht ermittelt werden, ob alle transfizierten Zellen auch ein trunkiertes Protein exprimieren. Auch könnte durch die zufällige Auswahl von 20 ausgezählten Gesichtsfeldern die Anzahl der positiven Zellen verfälscht worden sein. Im Trend stimmen die Immuno-Lokalisationsexperimente aber völlig mit den Daten des polyklonalen Antigen-Assays überein: Bei distal liegenden Nonsense-Mutationen war mit beiden Methoden eine Proteinexpression nachweisbar, bei proximalen Nonsense-Mutationen aber nicht.

Abschließend ist daran zu erinnern, dass die Auswirkungen von Nonsense-Mutationen in dieser Studie in einem *In-vitro*-Expressionssystem untersucht wurden. Die hier vorherrschenden Bedingungen entsprechen nicht den *In-vivo*-Gegebenheiten in der menschlichen Leber, dem Hauptsyntheseorgan der Gerinnungsfaktoren. Daher sind die vorliegenden Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren. Die vorgestellten Ergebnisse stützen die Vermutungen, dass der B-Domäne eine Schlüsselrolle bei der post-translationalen Proteinprozessierung zukommt, erfordern aber weitere Untersuchungen. Die Daten können den Zusammenhang zwischen der Lage einer Nonsense-Mutation innerhalb des Gens und dem Risiko für die Produktion von Hemmkörpern nicht ohne Weiteres erklären. Es wurden hier nur intrazelluläre Vorgänge der rekombinanten FVIII-Synthese beobachtet. Für die Entstehung von Antikörpern dürfte aber die Frage entscheidend sein, ob und wie FVIII-Protein in die Blutbahn gelangt. Außerdem ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, die Ausbildung von Hemmkörpern auch von weiteren genetischen Faktoren abhängig und wird zudem durch Umwelteinflüsse beeinflusst.

Mit Hilfe eines neuen Expressionssystems konnten in dieser Studie die Auswirkungen von Nonsense-Mutationen auf mRNA-, Protein- und Zellebene untersucht werden. Dabei konnte mittels mRNA-Analysen nachgewiesen werden, dass trotz Nonsense-Mutation eine komplette *F8*-Transkription stattfindet. Durch Antigenanalysen konnte weiterhin die Existenz von trunkierten Proteinen trotz Nonsense-Mutation in der leichten Kette (A3-C1-C2) nachgewiesen werden. In Lysaten von Zellen, die mit *F8*-Konstrukten mit Nonsense-Mutation in der schweren Kette (A1-A2-(B)) transfiziert wurden, konnten

## 6 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse

keine verkürzten FVIII-Proteine nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde auf spezielle Eigenschaften der B-Domäne zurückgeführt: Sie ermöglicht die Bindung von Chaperonen, die als Proteinkontrolleure fungieren, und schützt das FVIII-Protein vor Degradation.

## 7 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene molekulargenetische Untersuchungsmethoden zur Aufdeckung von neuen Varianten, die eine Hämophilie A verursachen, zur Aufklärung von Mutationsmechanismen im *F8*-Gen und zur funktionellen Analyse einzelner *F8*-Mutationen auf Protein-Ebene angewandt.

Insgesamt können nun vier Promotor-Mutationen als kausale Varianten im *F8*-Gen betrachtet werden. Der Prozentsatz von Promotor-Mutationen unter allen Hämophilie-Fällen bleibt aber mit 0,1 % sehr gering.

Die Methylierungsuntersuchungen im 5'UTR und im Intron 1 wiesen in keinem Fall aberrante Methylierungsmuster auf, doch konnten innerhalb dieser Untersuchung zwei Patienten mit ungewöhnlichen genomischen Umbauten im Intron 1 identifiziert werden. Mittels neuer Methoden wie NGS (Next Generation Sequencing) oder Array-CGH (comparative genomic hybridization) bzw. SNP (Single nucleotide polymorphism)-Array könnten diese Varianten wahrscheinlich genauer aufgeklärt und eventuell auch als kausale Veränderungen bestätigt werden.

Weiterhin konnten durch mRNA-Analysen einige intronische und stille Mutationen im *F8*-Gen als kausal definiert werden. Mit diesen Daten und einer Re-Analyse publizierter mRNA-Studien konnten einige gängige Spleißvorhersage-Programme validiert werden. Für die diagnostische Anwendung solcher Software ist wichtig zu wissen, dass trotz allgemein guter „Trefferquote“ Vorhersage und tatsächliches Spleißverhalten unterschiedlich sein können. Daher sollte für noch nicht beschriebene intronische oder stille Mutationen – sofern möglich – eine Abklärung auf mRNA-Ebene erfolgen. Zur genaueren Bestimmung von Qualität und Quantität der vorliegenden Transkripte wäre die Durchführung einer Real-Time-PCR sinnvoll.

Die Untersuchung von Duplikationsbruchpunkten brachte Aufklärung über die an die Bruchpunkte angrenzenden Sequenzen. Diese deuten darauf hin, dass die ursächlichen Mechanismen, die zur Entstehung von Duplikationen führen, variabel sind und von mehreren Faktoren beeinflusst werden. Unaufgeklärte Duplikationsbruchpunkte könnten ebenfalls mit neueren Methoden wie NGS oder hochauflösenden Array-Analysen untersucht und charakterisiert werden.

Ungewöhnliche intragene Inversionen konnten bei insgesamt fünf Patienten in direkten Zusammenhang mit CNVs gebracht werden. Die Aufklärung der Entstehungsmechanismen von kombinierten Inversionen und CNVs setzen genauere Analysen vo-

raus. Die genaue Anordnung dieser komplexen Umlagerungen ist noch unbekannt und könnte wahrscheinlich ebenfalls durch aufwändigere neuere Techniken untersucht und aufgeklärt werden. Die Aufdeckung der molekularen Anordnung würde vermutlich auch einen Hinweis zum Entstehungsmechanismus liefern.

Trotz der (teilweisen) Aufklärung dieser ungewöhnlichen und seltenen Mutationen bleibt weiterhin ein kleiner Teil der Hämophilie-A-Patienten ohne molekulargenetische Diagnose. Mit den diagnostischen Routinemethoden können v. a. größere Inversionen und tief im Intron liegende Mutationen nicht erkannt werden. Auch hierfür könnte der Einsatz der neuen Methoden wie NGS oder Array-CGH bzw. SNP-Arrays Erfolg versprechend sein.

Die Analysen zur Expression von *F8*-cDNA-Konstrukten mit Nonsense-Mutationen in einem *In-vitro*-System lassen auf eine wichtige Rolle der B-Domäne bei der Prozessierung des FVIII-Proteins schließen. Die Stabilität der trunkierten Proteine scheint von der Anwesenheit der B-Domäne abzuhängen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Lage eines Nonsense-Codons und dem Risiko zur Entwicklung von Hemmkörpern bei der FVIII-Substitutionstherapie kann aus den Daten nicht abgeleitet werden. Dazu wären *In-vivo*-Untersuchungen zur (residuellen) FVIII-Expression bei Hämophilie-Patienten nötig.

Hämophilie A ist eine monogene Erkrankung, die bis heute unheilbar und trotz großer medizinischer Fortschritte noch immer für Patienten mit erheblichen Beeinträchtigungen ihres Lebens verbunden ist. Daher gilt die Ursachenforschung auf molekulargenetischer Ebene als Grundvoraussetzung, um die Krankheit verstehen und letztendlich heilen zu können. Obwohl Hämophilie A in vielerlei Hinsicht als sehr intensiv erforschte Krankheit gilt, bleiben weiterhin Fragen zu den molekulargenetischen Ursachen und zur Pathogenese offen, deren Aufklärungen sehr interessant und auch als Modell für andere Krankheiten hilfreich sein könnten.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Keitel W. *Johann Lukas Schonlein (1793-1864). The degraded honorary citizen.* Zeitschrift für Rheumatologie. 2007; 66(8): 716-723.
2. Harper D. *Online etymology dictionary.* [http://www.etymonline.com/index.php?allowed\\_in\\_frame=0&search=hemophilia&searchmode=none](http://www.etymonline.com/index.php?allowed_in_frame=0&search=hemophilia&searchmode=none). Abgerufen am 19.09.2012.
3. Schulte GH. *Blutgerinnungsforschung in Würzburg: Die Forscher und ihre Beiträge von den Anfängen bis heute.* Dissertationsdruck Schmitt & Meyer; 1985.
4. Hopff F. *Über die Hämophilie oder die erbliche Anlage zu tödlichen Blutungen.* Carl-Wilhelm Becker, Universitäts-Buchdruck; 1828.
5. Gerhardt CACJ. *Handbuch der Kinderkrankheiten.* H. Laupp'schen; 1878.
6. Tan SY, Brown J. *Rudolph Virchow (1821-1902): "pope of pathology".* Singapore medical journal. 2006; 47(7): 567-568.
7. Hajdu SI. *A note from history: Rudolph Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist.* Annals of clinical and laboratory science. 2005; 35(2): 203-205.
8. Morawitz P. *The Chemistry of Blood Coagulation.* Ch. C. Thomas; 1958.
9. Morawitz P, Denecke, G. *Blut und Blutkrankheiten. Handbuch der inneren Medizin.* Mohr & Staehelin; 1927.
10. Marx R. *Edgar WOEHLISCH in memoriam (1890-1960).* Blut. 1961; 7: 115-116.
11. Wohlisch E. *Blood coagulation: research workers and factors.* Schweizerische medizinische Wochenschrift. 1954; 84(29): 774-776.
12. Fischer H, Wohlisch, E. *Inactivation of thrombin by resorbable thromboplastic substances.* Zeitschrift für Biologie. 1952; 105(3): 198-213.
13. Schröer H, Zimmermann, E. *Molekularbiologische Aspekte der Blutgerinnungsvorgänge.* Pharmazie in unserer Zeit. 1973; 2(3): 79-86.
14. Schröer H, Hauck, G., Groben, D. *The complex nature of prothrombin.* Pflugers Archiv : European journal of physiology. 1969; 312(1): R1.
15. Schröer H. *Physiological inhibitors of thrombin and thrombin synthesis.* Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch. 1973; 99(2): 212-222.
16. Hauck G, Schröer, H. *Advances in the field of blood coagulation.* Hippokrates. 1969; 40(1): 2-8.
17. Schröer H, Hauck, G. *Influence of the clotting potential on the barrier function of the vessel wall.* Bibliotheca anatomica. 1969; 10: 418-423.
18. Oldenburg J. *Molekulargenetische Untersuchungen zur Diagnostik, Pathogenese und Klinik der Hämophilie A und B.* Habilitationsschrift der Universität Würzburg; 1998.
19. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al. *Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2.* Nature. 2004; 427(6974): 537-541.
20. Marx R. *Hämostaseologie.* Habilitationsschrift der Ludwig-Maximilians-Universität; 1953.
21. Müller-Berghaus G, Pötzsch, B. *Hämostaseologie. Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.* Vol 1. Springer-Verlag GmbH; 1998.

22. Pötzsch B, Madlener, K. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. Vol 2. Springer-Verlag GmbH; 2010.
23. Kemkes-Matthes B, Oehler G. *Blutgerinnung und Thrombose*. Georg Thieme Verlag; 2001.
24. Linnemann M, Kühl M, Güler S, Holletz T. *Biochemie für Mediziner*. Springer-Verlag GmbH; 2003.
25. Kirchhof B. *Gerinnungsstörungen. Ein Leitfaden für die Intensivmedizin*. Vol 2. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1998.
26. Miller FP, Vandome AF, John MB. *Haemophilia A*. VDM Publishing; 2010.
27. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Häcker B. *Biochemie*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag; 2007.
28. Barthels M, Poliwoda H, Hemker HC. *Gerinnungsanalysen.: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen*. Georg Thieme Verlag; 1998.
29. Riddel JP, Jr., Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. *Theories of blood coagulation*. Journal of pediatric oncology nursing : official journal of the Association of Pediatric Oncology Nurses. 2007; 24(3): 123-131.
30. Ahamed J, Belting M, Ruf W. *Regulation of tissue factor-induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1*. Blood. 2005; 105(6): 2384-2391.
31. Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. *Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103(9): 3106-3111.
32. Meyer JG. *Blutgerinnung und Fibrinolyse: Diagnostik, Therapie, Prophylaxe*. Vol 7. Dt. Ärzte-Verlag; 1993.
33. Esmon CT. *Regulation of blood coagulation*. Biochimica et biophysica acta. 2000; 1477(1-2): 349-360.
34. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. *The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation*. Biochemistry. 1991; 30(43): 10363-10370.
35. Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC, et al. *Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin)*. The Journal of biological chemistry. 1988; 263(30): 15454-15461.
36. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. *Characterization of the human factor VIII gene*. Nature. 1984; 312(5992): 326-330.
37. Antonarakis SE. *Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 1998; 4 Suppl 2: 1-11.
38. Kotischke S. *Inhibitorinzidenz bei erstbehandelten Hämophilie A-und B-Patienten: Ergebnisse der prospektiven, multizentrischen Studie der Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (GTH)*, Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main; 2003.
39. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Jr., Gitschier J. *A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene*. Genomics. 1990; 7(1): 1-11.
40. Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. *Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene*. Genomics. 1992; 14(3): 585-589.
41. Peters MF, Ross CA. *Isolation of a 40-kDa Huntingtin-associated protein*. The Journal of biological chemistry. 2001; 276(5): 3188-3194.

42. Valleix S, Jeanny JC, Elsevier S, et al. *Expression of human F8B, a gene nested within the coagulation factor VIII gene, produces multiple eye defects and developmental alterations in chimeric and transgenic mice.* Human molecular genetics. 1999; 8(7): 1291-1301.
43. Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. *Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions.* Human molecular genetics. 1995; 4(7): 1217-1224.
44. Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. *Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A.* Nature genetics. 1993; 5(3): 236-241.
45. Oldenburg J, El-Maarri O. *New insight into the molecular basis of hemophilia A.* International journal of hematology. 2006; 83(2): 96-102.
46. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. *Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A.* Blood. 2002; 99(1): 168-174.
47. Hollestelle MJ, Thinnes T, Crain K, et al. *Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look.* Thrombosis and haemostasis. 2001; 86(3): 855-861.
48. Hoeben RC, Fallaux FJ, Cramer SJ, et al. *Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region.* Blood. 1995; 85(9): 2447-2454.
49. Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. *Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin.* The Journal of biological chemistry. 1998; 273(14): 8537-8544.
50. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. *The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function.* Blood. 1998; 92(11): 3983-3996.
51. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. *Structure of human factor VIII.* Nature. 1984; 312(5992): 337-342.
52. Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G. *A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin.* Blood. 1997; 89(7): 2413-2421.
53. Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. *The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins.* The Journal of cell biology. 1987; 105(6 Pt 1): 2665-2674.
54. Ellgaard L, Helenius A. *Quality control in the endoplasmic reticulum.* Nature reviews Molecular cell biology. 2003; 4(3): 181-191.
55. Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC, et al. *Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex.* Nature genetics. 2003; 34(2): 220-225.
56. Pittman D, Wasley L, Murray B, Wang J, Kaufman R. *Analysis of structural requirements for factor VIII function using site-directed mutagenesis.* Thromb Haemostasis. 1987; 58: 344.
57. Fay PJ, Anderson MT, Chavin SI, Marder VJ. *The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin.* Biochimica et biophysica acta. 1986; 871(3): 268-278.
58. Kaufman RJ, Pipe SW. *Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor.* Thrombosis and haemostasis. 1999; 82(2): 201-208.
59. Wang W, Wang YJ, Kelner DN. *Coagulation factor VIII: structure and stability.* International journal of pharmaceutics. 2003; 259(1-2): 1-15.

60. Pittman DD, Kaufman RJ. *Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988; 85(8): 2429-2433.
61. Newell JL, Fay PJ. *Proteolysis at Arg740 facilitates subsequent bond cleavages during thrombin-catalyzed activation of factor VIII*. The Journal of biological chemistry. 2007; 282(35): 25367-25375.
62. Fay PJ, Smudzin TM. *Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa*. The Journal of biological chemistry. 1992; 267(19): 13246-13250.
63. Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. *Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex*. Trends in cardiovascular medicine. 1999; 9(7): 185-192.
64. Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, et al. *Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease*. British journal of haematology. 1982; 52(2): 259-267.
65. Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K. *The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2005; 3(6): 1257-1265.
66. Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ. *LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo*. Blood. 2005; 106(3): 906-912.
67. Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kembell-Cook G, Holzenburg A. *3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography*. Blood. 2002; 99(4): 1215-1223.
68. Thompson AR. *Structure and function of the factor VIII gene and protein*. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2003; 29(1): 11-22.
69. Tuddenham EG, Pemberton S, Cooper DN. *Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology*. Thrombosis and haemostasis. 1995; 74(1): 313-321.
70. Oldenburg J, Schwaab R. *Molecular biology of blood coagulation*. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2001; 27(4): 313-324.
71. Hoyer LW. *Molecular pathology and immunology of factor VIII (hemophilia A and factor VIII inhibitors)*. Human pathology. 1987; 18(2): 153-161.
72. Mannucci PM. *Back to the future: a recent history of haemophilia treatment*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2008; 14 Suppl 3: 10-18.
73. Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. *A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group*. Journal of internal medicine. 1994; 236(4): 391-399.
74. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. *Haemophilias A and B*. Lancet. 2003; 361(9371): 1801-1809.
75. Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. *Molecular basis of haemophilia A*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2004; 10 Suppl 4: 133-139.
76. Bowen DJ. *Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights*. Molecular pathology : MP. 2002; 55(2): 127-144.

77. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. *Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study*. Blood. 1995; 86(6): 2206-2212.
78. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, et al. *Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells*. Human molecular genetics. 1994; 3(7): 1035-1039.
79. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. *Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions*. Human molecular genetics. 1993; 2(11): 1773-1778.
80. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. *Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2005; 3(11): 2598-2599.
81. Asselta R, Duga S, Spina S, et al. *Congenital afibrinogenemia: mutations leading to premature termination codons in fibrinogen A alpha-chain gene are not associated with the decay of the mutant mRNAs*. Blood. 2001; 98(13): 3685-3692.
82. Maquat LE. *When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells*. RNA. 1995; 1(5): 453-465.
83. Rost S, Löffler S, Pavlova A, Müller CR, Oldenburg J. *Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2008; 6(11): 1996-1999.
84. Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. *The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4*. Nucleic acids research. 1998; 26(1): 216-219.
85. El-Maarri O, Herbiniaux U, Graw J, et al. *Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2005; 3(2): 332-339.
86. Pattinson JK, Millar DS, McVey JH, et al. *The molecular genetic analysis of hemophilia A: a directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene*. Blood. 1990; 76(11): 2242-2248.
87. Cooper DN, Krawczak M. *The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions*. Human genetics. 1990; 85(1): 55-74.
88. Young M, Inaba H, Hoyer LW, Higuchi M, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE. *Partial correction of a severe molecular defect in hemophilia A, because of errors during expression of the factor VIII gene*. American journal of human genetics. 1997; 60(3): 565-573.
89. Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. *Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure*. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1953; 41(4): 637-647.
90. Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gernez A, Goudemand M. *Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers: consequences for therapy and genetic counselling*. British journal of haematology. 1990; 76(3): 372-379.
91. Gaucher C, Mercier B, Jorieux S, Oufkir D, Mazurier C. *Identification of two point mutations in the von Willebrand factor gene of three families with the 'Normandy' variant of von Willebrand disease*. British journal of haematology. 1991; 78(4): 506-514.

92. Gaucher C, Jorieux S, Mercier B, Oufkir D, Mazurier C. *The "Normandy" variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene*. Blood. 1991; 77(9): 1937-1941.
93. Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M. *A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction*. Blood. 1990; 75(1): 20-26.
94. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. *New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII*. Blood. 1989; 74(5): 1591-1599.
95. Zhang B, Ginsburg D. *Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2004; 2(9): 1564-1572.
96. Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, et al. *Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII*. Cell. 1998; 93(1): 61-70.
97. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. *Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR*. Clinical chemistry. 2005; 51(7): 1154-1158.
98. Mullis KB, Faloona FA. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology. 1987; 155: 335-350.
99. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977; 74(12): 5463-5467.
100. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. *Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies*. Nature reviews Genetics. 2005; 6(6): 488-501.
101. Birch CLF. *Hemophilia: clinical and genetic aspects*. University of Illinois; 1937.
102. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, et al. *Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor*. Nature. 1984; 312(5992): 342-347.
103. Roth DA, Tawa NE, Jr., O'Brien JM, Treco DA, Selden RF. *Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A*. The New England journal of medicine. 2001; 344(23): 1735-1742.
104. Powell JS, Ragni MV, White GC, et al. *Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion*. Blood. 2003; 102(6): 2038-2045.
105. Reddy PS, Sakhuja K, Ganesh S, et al. *Sustained human factor VIII expression in hemophilia A mice following systemic delivery of a gutless adenoviral vector*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2002; 5(1): 63-73.
106. Hay CR, Baglin TP, Collins PW, Hill FG, Keeling DM. *The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization (UKHCDO)*. British journal of haematology. 2000; 111(1): 78-90.
107. Kreuz W, Becker S, Lenz E, et al. *Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII*. Seminars in thrombosis and hemostasis. 1995; 21(4): 382-389.
108. Kreuz W, Ettingshausen CE, Zyschka A, et al. *Inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: a prospective long-term follow-up comparing*

- plasma-derived and recombinant products*. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2002; 28(3): 285-290.
109. de Biasi R, Rocino A, Papa ML, Salerno E, Mastrullo L, De Blasi D. *Incidence of factor VIII inhibitor development in hemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates*. Thrombosis and haemostasis. 1994; 71(5): 544-547.
  110. Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, et al. *Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. recombinant Factor VIII Study Group*. The New England journal of medicine. 1990; 323(26): 1800-1805.
  111. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, et al. *Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors*. thromb Diath Haemorrh. 1975; 34(2): 612.
  112. White GC, 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. *Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Thrombosis and haemostasis. 2001; 85(3): 560.
  113. Lindgren A, Wadenvik H, Tengborn L. *Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia A*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2002; 8(5): 644-648.
  114. Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Misra N, et al. *The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A*. New England Journal of Medicine. 2002; 346(9): 662-667.
  115. Spiegel PC, Jr., Jacquemin M, Saint-Remy JM, Stoddard BL, Pratt KP. *Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII*. Blood. 2001; 98(1): 13-19.
  116. Scandella DH, Nakai H, Felch M, et al. *In hemophilia A and autoantibody inhibitor patients: the factor VIII A2 domain and light chain are most immunogenic*. Thrombosis research. 2001; 101(5): 377-385.
  117. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al. *F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis*. Blood. 2012; 119(12): 2922-2934.
  118. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. *HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII*. Thrombosis and haemostasis. 1997; 77(2): 238-242.
  119. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK. *Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007; 5(2): 263-265.
  120. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. *Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A*. Blood. 2006; 107(8): 3167-3172.
  121. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, et al. *Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A*. Blood. 2006; 108(12): 3739-3745.
  122. Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. *Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study*. Blood. 2007; 109(11): 4648-4654.
  123. Calvez T, Laurian Y, Goudemand J. *Inhibitor incidence with recombinant vs. plasma-derived FVIII in previously untreated patients with severe hemophilia A:*

- homogeneous results from four published observational studies.* Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2008; 6(2): 390-392.
124. Figueiredo MS, Brownlee GG. *cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene.* The Journal of biological chemistry. 1995; 270(20): 11828-11838.
  125. Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, et al. *Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A.* Human mutation. 2007; 28(1): 54-60.
  126. Riccardi F, Rivolta GF, Franchini M, Pattacini C, Neri TM, Tagliaferri A. *Characterization of a novel mutation in the F8 promoter region associated with mild hemophilia A and resistance to DDAVP therapy.* Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2009; 7(7): 1234-1235.
  127. McGlynn LK, Mueller CR, Begbie M, Notley CR, Lillicrap D. *Role of the liver-enriched transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 in transcriptional regulation of the factor V111 gene.* Molecular and cellular biology. 1996; 16(5): 1936-1945.
  128. Dai L, Cutler JA, Savidge GF, Mitchell MJ. *Characterization of a causative mutation of hemophilia A identified in the promoter region of the factor VIII gene (F8).* Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2008; 6(1): 193-195.
  129. Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. *Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation.* Pharmacological reviews. 2004; 56(2): 291-330.
  130. Ryden TA, Beemon K. *Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein.* Molecular and cellular biology. 1989; 9(3): 1155-1164.
  131. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.* Human molecular genetics. 2001; 10(7): 687-692.
  132. Esteller M. *Epigenetics in cancer.* The New England journal of medicine. 2008; 358(11): 1148-1159.
  133. Toyota M, Yamamoto E. *DNA methylation changes in cancer.* Progress in molecular biology and translational science. 2011; 101: 447-457.
  134. Herman JG, Baylin SB. *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.* The New England journal of medicine. 2003; 349(21): 2042-2054.
  135. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.* Nature. 2004; 429(6990): 457-463.
  136. Jaenisch R, Bird A. *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.* Nature genetics. 2003; 33 Suppl: 245-254.
  137. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome.* Nature genetics. 2007; 39(4): 457-466.
  138. Waggoner D. Mechanisms of disease: epigenesis. Paper presented at: Seminars in pediatric neurology, 2007.
  139. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. *Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing.* Mutation research. 2008; 659(1-2): 40-48.
  140. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. *Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells.* Nature structural & molecular biology. 2004; 11(11): 1068-1075.

141. Brenet F, Moh M, Funk P, et al. *DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing*. PloS one. 2011; 6(1): e14524.
142. Zilberman D, Henikoff S. *Genome-wide analysis of DNA methylation patterns*. Development. 2007; 134(22): 3959-3965.
143. El-Maarri O, Becker T, Junen J, et al. *Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males*. Human genetics. 2007; 122(5): 505-514.
144. De Brasi CD, Bowen DJ, Collins PW, Larripa IB. *The CpG island in intron 22 of the factor VIII gene is predominantly methylated on the X chromosome of human males*. Journal of human genetics. 2002; 47(5): 239-242.
145. Hellman A, Chess A. *Gene body-specific methylation on the active X chromosome*. Science. 2007; 315(5815): 1141-1143.
146. Maestrini E, Rivella S, Tribioli C, et al. *Identification of novel RFLPs in the vicinity of CpG islands in Xq28: application to the analysis of the pattern of X chromosome inactivation*. American journal of human genetics. 1992; 50(1): 156-163.
147. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, et al. *Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells*. Nature. 2008; 454(7205): 766-770.
148. Taneri B, Asilmaz E, Gaasterland T. *Biomedical impact of splicing mutations revealed through exome sequencing*. Mol Med. 2012; 18(1): 314-319.
149. McManus CJ, Graveley BR. *RNA structure and the mechanisms of alternative splicing*. Current opinion in genetics & development. 2011; 21(4): 373-379.
150. Darnell RB. *Developing global insight into RNA regulation*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 2006; 71: 321-327.
151. Theophilus BD, Enayat MS, Williams MD, Hill FG. *Site and type of mutations in the factor VIII gene in patients and carriers of haemophilia A*. Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2001; 7(4): 381-391.
152. Bidichandani SI, Shiach CR, Lanyon WG, Connor JM. *A novel splice donor mutation affecting position +3 in intron 6 of the factor VIII gene*. Human molecular genetics. 1994; 3(4): 651-653.
153. Reitter-Pfoertner S, von Haeseler A, Horvath B, et al. *Identification of an ancient haemophilia A splice site mutation*. Thrombosis research. 2012; 130(3): 445-450.
154. Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, Sanna S, Santagostino E, Rodeghiero F. *F8 mRNA studies in haemophilia A patients with different splice site mutations*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2010; 16(5): 786-790.
155. El-Maarri O, Klein, C., Junen, J., Schröder, J., Müller, C.R., Oldenburg, J. *Splice site mutations effect on the F8 mRNA splicing*. 36th Hemophilia Symposion Hamburg 2005. 2007; VII: 291-294.
156. Laurie AD, Smith MP. *Effect of the F8 mutation c.1538-2A>T on pre-mRNA splicing*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2009; 15(6): 1348-1350.
157. Price AL, Eskin E, Pevzner PA. *Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history*. Genome research. 2004; 14(11): 2245-2252.
158. Vidal F, Farssac E, Tusell J, Puig L, Gallardo D. *First molecular characterization of an unequal homologous alu-mediated recombination event responsible for hemophilia*. Thrombosis and haemostasis. 2002; 88(1): 12-16.

159. Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. *Homeologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia*. Human mutation. 2004; 24(5): 440.
160. Nakaya SM, Hsu TC, Geraghty SJ, Manco-Johnson MJ, Thompson AR. *Severe hemophilia A due to a 1.3 kb factor VIII gene deletion including exon 24: homologous recombination between 41 bp within an Alu repeat sequence in introns 23 and 24*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2004; 2(11): 1941-1945.
161. Gu W, Zhang F, Lupski JR. *Mechanisms for human genomic rearrangements*. PathoGenetics. 2008; 1(1): 4.
162. Vissers LE, Bhatt SS, Janssen IM, et al. *Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture*. Human molecular genetics. 2009; 18(19): 3579-3593.
163. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. *Mechanisms of change in gene copy number*. Nature reviews Genetics. 2009; 10(8): 551-564.
164. Murru S, Casula L, Pecorara M, Mori P, Cao A, Pirastu M. *Illegitimate recombination produced a duplication within the FVIII gene in a patient with mild hemophilia A*. Genomics. 1990; 7(1): 115-118.
165. Aquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Biccocchi MP. *Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy*. Haematologica. 2004; 89(6): 758-759.
166. Aoki K, Suzuki K, Sugano T, et al. *A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations*. Nature genetics. 1995; 10(2): 167-174.
167. Kasai M, Matsuzaki T, Katayanagi K, et al. *The translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hot spots in the human genome*. The Journal of biological chemistry. 1997; 272(17): 11402-11407.
168. Bacolla A, Wells RD. *Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease*. The Journal of biological chemistry. 2004; 279(46): 47411-47414.
169. Wells RD. *Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease*. Trends in biochemical sciences. 2007; 32(6): 271-278.
170. Muhle C, Zenker M, Chuzhanova N, Schneider H. *Recurrent inversion with concomitant deletion and insertion events in the coagulation factor VIII gene suggests a new mechanism for X-chromosomal rearrangements causing hemophilia A*. Human mutation. 2007; 28(10): 1045.
171. Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. *The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans*. Nature genetics. 2009; 41(7): 849-853.
172. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. *Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A*. Blood. 1998; 92(4): 1458-1459.
173. Wight J, Paisley S. *The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review*. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2003; 9(4): 418-435.
174. David D, Santos IM, Johnson K, Tuddenham EG, McVey JH. *Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2003; 1(1): 139-146.
175. Chowdhury F, Lawrence K, Baglin T, Perry D. *Rituximab failure in a patient with allo-FVIII inhibitor*. British journal of haematology. 2006; 135(3): 412.

176. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ. *A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986; 83(16): 5939-5942.
177. Fay PJ. *Factor VIII structure and function*. Thrombosis and haemostasis. 1993; 70(1): 63-67.
178. Pipe SW. *Functional roles of the factor VIII B domain*. Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2009; 15(6): 1187-1196.
179. Khrenov AV, Ananyeva NM, Saenko EL. *Role of the B domain in proteolytic inactivation of activated coagulation factor VIII by activated protein C and activated factor X*. Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis. 2006; 17(5): 379-388.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
aPC	Aktiviertes Protein C
APTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ASGPR	Asiaglycoprotein receptor
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Bethesda-Einheiten
BIR	Break-induced replication
bp	Basenpaare
C/EBP	CCAAT/Enhancer-binding protein
CGH	Comparative genomic hybridization
CHO	Chinese Hamster Ovary
CNV	Copy number variation
COS	CV1 Origin Simian Virus 40
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBP	D-site-binding protein
DDAVP	Desmopressin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
F8	Faktor VIII-Gen
FEIBA	Faktor VIII-Inhibitor-Bypassing-Aktivität
FI	Faktor I
Fla	Aktivierter Faktor I
FII	Faktor II
FIIa	Aktivierter Faktor II
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FIX	Faktor IX
FIXa	Aktivierter Faktor IX
FoSTeS	Fork stalling and template switching
FV	Faktor V
FVa	Aktivierter Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIIa	Aktivierter Faktor VIII
FVIII, AHF	Faktor VIII
FVIII:C	Faktor-VIII-Aktivität
FVIIIa	Aktivierter Faktor VIII
FVIII:Ag	Faktor-VIII-Antigen
FX	Faktor X
FXa	Aktivierter Faktor X
FXI	Faktor XI
FXIa	Aktivierter Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIIa	Aktivierter Faktor XII
FXIII	Faktor XIII
FXIIIa	Aktivierter Faktor XIII
Gly	Glycin
HEK	Human embryonic kidney
Hep	Hepatocellular carcinoma
His	Histin
HLA	Humane Leukozytenantigen-Allele
HMWK	High-molecular-weight Kininogen
HNF-1	Hepatocyte nuclear factor I
IE	Internationale Einheiten
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Il-10	Interleukin-10
int1h	Intron-1-homologe Region
int22h	Intron-22-homologe Region
ISE	Intronic splicing enhancer

ISS	Intronic splicing silencer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LINE	Long interspersed nuclear elements
LMAN1	Lectin Mannose-Binding 1
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
MCFD2	Multiple coagulation factor deficiency protein 2
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMBIR	Microhomology-mediated break-induced replication
MMEJ	Micro-homology-mediated end-joining
NAHR	Non-allelic homologous recombination
NF-Y	Nuclear factor Y
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non-homologous end-joining
NMD	Nonsense mediated decay
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAI-2	Plasminogen activator inhibitor-2
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pro	Prolin
QGRS	Quadruplex-forming G-rich sequence
SINE	Short interspersed nuclear elements
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	Signalpeptid
TF	Gewebefaktor
TFPI	Tissue-factor-pathway-inhibitor
TNF-a	Tumornekrosefaktor-a
t-PA	Tissue type plasminogen activator
u-PA	Urokinase
UTR	Untranslated region
vWD Typ 2N	Von Willebrand-Typ 2 Normandy
vWF	Von Willebrand Faktor

## 10 Liste der vorgelegten Publikationen

### Anlage 1:

*Identification and characterization of mutations in the promoter region of the factor VIII gene.*

Zimmermann MA, Meier D, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

J Thromb Haemost. 2012 Feb;10(2):314-7.

### Anlage 2:

*Methylation analysis of the promoter region and intron 1 of the factor VIII gene in haemophilia A patients.*

Zimmermann MA, Hansmann T, Haaf T, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

Akzeptiert bei Hamostaseologie. 2013.

### Anlage 3:

*Analysis of F8 mRNA in haemophilia A patients with silent mutations or presumptive splice site mutations.*

Zimmermann MA, Gehrig A, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

Haemophilia. 2012 Oct 23. doi: 10.1111/hae.12039.

### Anlage 4:

*Characterization of duplication breakpoints in the factor VIII gene.*

Zimmermann MA, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

J Thromb Haemost. 2010 Dec;8(12):2696-704.

### Anlage 5:

*Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene.*

Zimmermann MA, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

Hamostaseologie. 2011 Nov;31 Suppl 1:S69-73.

Anlage 6:

*Expression studies of mutant factor VIII alleles with premature termination codons (with regard to inhibitor formation).*

Zimmermann MA, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

Eingereicht beim Journal of Thrombosis and Haemostasis.

## 11 Sonderdrucke der vorgelegten Publikationen

### 11.1 Anlage 1

*Identification and characterization of mutations in the promoter region of the factor VIII gene.*

## 11.2 Anlage 2

*Methylation analysis of the promoter region and intron 1 of the factor VIII gene in haemophilia A patients.*

### 11.3 Anlage 3

*Analysis of F8 mRNA in haemophilia A patients with silent mutations or presumptive splice site mutations.*

## 11.4 Anlage 4

*Characterization of duplication breakpoints in the factor VIII gene.*

## 11.5 Anlage 5

*Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene.*

## 11.6 Anlage 6

*Expression studies of mutant factor VIII alleles with premature termination codons (with regard to inhibitor formation).*

## 12 Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name: **Melanie Andrea Zimmermann** *geb. Reis*  
 Geburtstag: 24.02.1985  
 Geburtsort: Erlenbach am Main

### Schul- und Hochschulbildung:

seit Januar 2010	Promotion am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg Titel: Charakterisierung und Expressionsanalysen von Hämophilie-A-Mutationen
10/2004-11/2009	Studium der Biologie (Diplomstudiengang) an der Universität Würzburg Hauptfach: Biotechnologie Nebenfächer: Humangenetik, Biochemie Zusätzliches Fach: Pflanzenphysiologie und Biophysik Diplomarbeit im Fach Humangenetik Titel: Charakterisierung spezieller Mutationen im Faktor-VIII-Gen
2002–2004	Besuch des Karl-Theodor-v.-Dalberg-Gymnasiums, Aschaffenburg Hauptfächer: Mathematik und Sport Abschluss Abitur
1995–2002	Besuch des Hermann-Staudinger-Gymnasiums, Erlenbach am Main
1991–1995	Besuch der Dr.-Ernst-Hellmut-Vits-Volksschule, Erlenbach am Main

## Kongress-Teilnahmen:

- 2012 Teilnahme an der ESHG-Konferenz in Nürnberg (Postertitel: Mild haemophilia A in a female patient with an Xq27.3-q28 deletion and a missense mutations in the F8 gene)
- 2011 Teilnahme am 42. Hämophilie-Symposion in Hamburg (Postertitel: Analysis of F8 mRNA from three haemophilia A patients with presumptive splice site mutations)
- 2011 Teilnahme an der GfH-Tagung in Regensburg (Postertitel: Identification and luciferase activities of four different mutations in the promoter region of the factor VIII gene)
- 2010 Teilnahme am 41. Hämophilie-Symposion in Hamburg (Postertitel: Identification and luciferase activities of four different mutations in the promoter region of factor VIII; Abnormal band patterns in analyses of intron 1 and intron 22 inversions)
- 2010 Teilnahme an der GfH-Tagung in Hamburg (Postertitel: Analysis of F8 mRNA in haemophilia patients with silent mutations or presumptive splice site mutations; Detection of duplication breakpoints in the factor VIII gene)
- 2009 Teilnahme am 40. Hämophilie-Symposion in Hamburg (Postertitel: Analysis of F8 mRNA in haemophilia A patients with silent mutations or presumptive splice site mutations; Detection of duplication breakpoints in the factor VIII gene)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Müller-Reible für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die stetige fachliche Unterstützung während dieser Zeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Simone Rost bedanken für die hervorragende intensive fachliche Betreuung und für die entgegengebrachte Geduld. In der Zeit hier am Lehrstuhl habe ich einfach so viel gelernt, wie nirgendwo anders.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Benavente meinen Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens entgegenbringen.

Bei Herrn Prof. Dr. Oldenburg möchte ich mich für die Idee zum Doktorarbeitsthema und für die gute Zusammenarbeit mit dem Bonner Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin bedanken. An dieser Stelle möchte ich auch noch Zaid Aburubaiha, Ursula Herbiniaux, Saskia Pahl und Anne Thomas erwähnen, von denen ich hilfreiche Tipps für die Expressionsanalyse bekommen habe.

Auch einen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Haaf für die fachlichen Auskünfte bezüglich der Methylierungsstudie.

Weiterhin möchte ich auch meinen Dank aussprechen an Dr. Daniel Müller aus der AG-Schindler und Tamara Hansmann aus der AG-Haaf, die mir mit ihrem Fachwissen auf den Gebieten Luciferase-Assay und Methylierung weitergeholfen haben.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle und der AG-Schmid für die Unterstützung bei den Faktor-VIII-Lokalisations-Experimenten.

Dem Institut für Mikrobiologie danke ich für die zur Verfügungstellung des ELISA-Readers.

Letztendlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller-Reible für die super Arbeitsatmosphäre und Unterstützung von jedem Einzelnen während der letzten vier Jahre bedanken. Ihr seid einfach ein starkes Team. Besonderer Dank gilt der Forschergruppe, vor allen Dingen Dr. Anne Schaafhausen, Elisa Bach und Mirjam Larsen, die mir bei meinen Experimenten eine dritte und vierte Hand zu Verfügung stellten und mich seelisch und moralisch rundum unterstützt haben.

Überdies noch ein großes Dankeschön an Wolfgang Baumeister für seine Korrekturarbeiten und die genialen Formatierungstipps zur Erstellung dieser Arbeit.

Zuletzt ist natürlich noch meiner Freundin Elisabeth Müller, meiner Familie Stefan und Leonore Reis sowie Julia und Sebastian Ballsieper und meinem Mann Christian zu danken, die mir in jeglicher Hinsicht den Rücken gestärkt und alle Weichen für mich gestellt haben.