

Aus dem Institut für Humangenetik im Biozentrum  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. H. Höhn

## **Molekulare Ursachen des hereditären Angioödems**

**Inaugural – Dissertation**  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
**Arkadius Kocot**  
aus Lohr am Main

Würzburg, Mai 2003

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Oldenburg  
Koreferent: Prof. Dr. C. R. Müller-Reible  
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2004

Der Promovend ist Arzt.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Thematische Grundlagen	3
2.1.	Das hereditäre Angioödem (HAE) im Formenkreis angioödematöser Erkrankungen	3
2.2.	Epidemiologie	4
2.3.	Klinik, Diagnostik und Therapie des HAE	4
2.3.1.	Klinische Symptome	4
2.3.2.	Diagnostik und Differentialdiagnosen	5
2.3.3.	Therapieoptionen	6
2.3.3.1.	Therapie der akuten Schwellungen	6
2.3.3.2.	Langzeitprophylaxe	6
2.3.3.3.	Kurzzeitprophylaxe	7
2.4.	Pathophysiologie des HAE	7
2.5.	Molekularbiologische Grundlagen des hereditären C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) - Mangels	9
2.5.1.	Vererbung und chromosomale Lokalisation	9
2.5.2.	Aufbau und Expression des C1-INH-Gens	9
2.5.3.	Struktur und Funktionsweise des C1-INH-Proteins	11
3.	Patienten, Material und Methoden	15
3.1	Patienten	15
3.2	Materialien	15
3.2.1.	Chemikalien, Kits	15
3.2.2.	Enzyme	16
3.2.3.	Radiochemikalien	16
3.2.4.	Puffer	16
3.2.5.	Lösungen	18
3.2.6.	Gele	19

3.2.7.	Oligonukleotide	20
3.2.8.	Arbeitsgeräte	21
3.2.9.	Sonstige Materialien	22
3.3.	Methoden	23
3.3.1.	Isolierung genomischer DNA aus Blut	23
3.3.2.	Polymerase Kettenreaktion ( PCR )	24
3.3.2.1.	Reaktionsansatz	25
3.3.2.2.	Reaktionsbedingungen	26
3.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.3.4.	Heteroduplexbildung der DNA-Fragmente	27
3.3.5.	Denaturierende Gradientengelelektrophorese ( DGGE )	27
3.3.6.	DNA-Sequenzierung unter Verwendung von P <sup>33</sup> -markierten ddNTPs	29
3.3.6.1.	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
3.3.6.2.	Reaktionsansatz	31
3.3.6.3.	Reaktionsbedingungen	31
3.3.6.4.	Denaturierende PAA-Gelelektrophorese der sequenzierten Produkte	32
3.3.7.	DNA-Sequenzierung unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs	33
3.3.7.1.	Aufreinigung der PCR-Produkte	33
3.3.7.2.	Reaktionsansatz	33
3.3.7.3.	Reaktionsbedingungen	34
3.3.7.4.	Fällung der PCR-Produkte	34
3.3.7.5.	Verarbeitung und EDV-unterstützte Auswertung der DNA-Fragmente	34
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Beurteilung der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese ( DGGE ) als Screeningverfahren zur Mutationssuche in einzelnen Exons des C1-Inhibitor-Gens	36
4.2.	Endgültige Charakterisierung der Mutationen durch Sequenzierung	43
4.3.	Darstellung der identifizierten Mutationen	45

4.4.	Polymorphismen im C1-Inhibitor-Gen	47
4.5.	Beschreibung der diagnostischen Vorgehensweise bei einer Familie mit hereditärem Angioödem	47
5.	Diskussion	49
5.1.	Stellenwert der Mutationsdiagnostik beim hereditären Angioödem	49
5.2.	Beurteilung der DGGE als Screeningverfahren zur Mutationssuche im C1-Inhibitor-Gen	50
5.3.	Ergebnisse bisheriger Studien	51
5.4.	Vergleich des durchgeführten Mutationsscreenings mit bereits publizierten Daten	58
5.5.	Mechanismen der Mutationsentstehung im C1-Inhibitor-Gen	61
5.6.	Identifizierung neuer Mutationen	62
6.	Zusammenfassung	65
7.	Literaturverzeichnis	67

Danksagungen

Lebenslauf

## Verzeichnis der Abkürzungen

a	aktiviert
A	Adenin
AAE	Aquired Angioedema (erworbenes Angioödem)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ad	auf / bis
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
bp	Basenpaar/e
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
Del	Deletion
dest.	destilliert
d(d)NTP	(Di)desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
Ex	Exon
f	forward (vorwärts)
Frameshift	Rasterverschiebung
g	Gramm
G	Guanin

Glu	Glutaminsäure
h	Stunde/n
HAE	Hereditäres Angioödem
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ins	Insertion
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
max.	maximal
min	Minute/n
Nr.	Nummer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	pondus hydrogenii (Säuregrad einer Lösung)
Pos.	Position
r	reverse (rückwärts)
s	Sekunde/n
SAP	Shrimp Alcaline Phosphatase (Shrimp Alkalische Phosphatase)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N',N' - Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Thr	Threonin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u	Unit

U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vs.	versus
V	Volt
V/cm	Volt pro Zentimeter
Val	Valin



## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Reaktionsansatz für eine PCR
Tab. 2:	Reaktionsbedingungen einer PCR
Tab. 3:	Elutionsprotokoll des QIAEX II Gel-Extraktion-Kits von Qiagen
Tab. 4:	Komponenten des Reaktionsansatzes einer <sup>33</sup> P-Sequenzierung
Tab. 5:	Komponenten der Sequenzierreaktion
Tab. 6:	Bedingungen für die Cycle-Sequenzierung
Tab. 7:	Protokoll der Ethanol-Präzipitation
Tab. 8:	Identifizierte Mutationen im untersuchten Patientenkollektiv
Tab. 9:	Bekannte Polymorphismen im C1-INH-Gen
Tab.10:	Missense-Mutationen im C1-INH-Gen
Tab.11:	Nonsense-Mutationen im C1-INH-Gen
Tab.12:	Mutationen der Spleissstellen im C1-INH-Gen
Tab.13:	kleine Deletionen und Insertionen im C1-INH-Gen
Tab.14:	bekannte Mutationen im Promoter-Bereich des C1-INH-Gens
Tab. 15:	große Deletionen im C1-INH-Gen

## Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Angriffspunkte (dargestellt durch graue Pfeile) des C1-INH und möglicher Pathomechanismus des HAE
- Abb. 2: Struktur des C1-INH-Gens (Pfeile repräsentieren Alu-repeats)
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des C1-INH-Proteins
- Abb. 4: Computergenerierte Struktur des C1-INH-Moleküls
- Abb. 5 : Invertierte Photographie eines Agarose-PCR-Gels aus dem Exon 7-Bereich
- Abb.6: Schmelzdiagramm des Exon 4 – Fragments mit einer weitgehend einheitlichen Schmelzdomäne
- Abb.7: Schmelzdiagramm des Exon 3.1 – Fragments mit mehreren Schmelzdomänen
- Abb. 8: Schmelzdiagramm des Exon 8 – Fragments mit zahlreichen voneinander sehr verschiedenen Schmelzdomänen
- Abb. 9: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 1-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 10: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 2-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 11: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 3.1-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 12: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 3.2-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 13: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 4-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 14: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 5-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 15: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 6-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 16: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 7-Bereich des C1-INH-Gens

- Abb. 17: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 8-Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 18: Darstellung von zwei Mutationen im Intron 3/Exon 4 Bereich des C1-INH-Gens
- Abb. 19: Ausschnitt aus dem Exon 8-Bereich (forward)
- Abb. 20: Ausschnitt aus dem Exon 8-Bereich (reverse)
- Abb. 21: Lokalisationen der identifizierten Mutationen im C1-INH-Gen. Die codierenden Genabschnitte sind mit römischen Zahlensymbolen bezeichnet.
- Abb. 22: Beispielstammbaum einer untersuchten Familie
- Abb. 23: Darstellung der Verteilung großer Deletionen im C1-Inhibitor-Gen
- Abb. 24: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der in dieser Arbeit identifizierten Mutationstypen im C1-Inhibitor-Gen.
- Abb. 25: Darstellung der Häufigkeitsverteilung aller bisher in der Literatur publizierten Mutationstypen im C1-Inhibitor-Gen

## **1. Einleitung und Zielsetzung**

Erstmals 1882 wurde über akut auftretende Hautödeme berichtet, die in den untersuchten Familien gehäuft auftraten [Quinke, 1882]. Für diese Erkrankung wurde sechs Jahre später ein autosomal dominanter Erbgang aufgezeigt und die Bezeichnung „Hereditäres angioneurotisches Ödem“ eingeführt [Osler, 1888]. Durch die Untersuchungen von Donaldson konnte ein Mangel des Proteins C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) als Ursache für die heute als hereditäres Angioödem (HAE) bezeichnete Erkrankung identifiziert werden [Donaldson, 1963]. Das hauptsächlich in den Hepatozyten gebildete C1-INH ist ein wichtiger Inhibitor verschiedener Serinproteasen und reguliert durch eine 1:1 Komplexbildung mit diesen Proteasen die Aktivierungsphasen des Fibrinolyse-, Kinin- und Komplementsystems [Kreuz et al., 1998]. Ein partieller oder kompletter Mangel an C1-INH führt durch die unkontrollierte Freisetzung vasoaktiver Substanzen aus diesen Systemen zur Steigerung der Gefäßpermeabilität und in der Folge zur Ausbildung lokaler Schwellungen der Haut, der Schleimhäute oder innerer Organe. Die am meisten gefürchtete Komplikation und gleichzeitig die häufigste Todesursache ist das Erstickten infolge eines im Bereich des Larynx lokalisierten Ödems, das zu einer vollständigen Obstruktion der Luftwege führen kann. Um diese Komplikation zu vermeiden ist es wichtig, das HAE differentialdiagnostisch von den viel häufigeren Angioödemem anderer Genese abzugrenzen, da die Therapie und Prophylaxe akuter Schübe des HAE ein völlig anderes Vorgehen erfordert. Während Histamin-vermittelte Angioödeme wirkungsvoll mit Cortikosteroiden und Antihistaminika behandelt werden können, ist diese Medikation beim HAE wirkungslos, so dass eine Substitution des C1-INH mit Hilfe eines aus Plasma gereinigten C1-INH Proteinkonzentrates (z.B. Berinert<sup>®</sup> HS) notwendig ist. Die Diagnose HAE kann heute aus der klinischen Symptomatik, der positiven Familienanamnese und durch die Bestimmung der relevanten Laborparameter gestellt werden [Wüthrich et al, 1999]. Da die Erstmanifestation des HAE in der überwiegenden Zahl der Patienten vor dem 20. Lebensjahr auftritt und dabei bezüglich des Alters einer Variabilität unterliegt [Kreuz et al, 1998], können mit Hilfe einer molekulargenetischen Untersuchung des mutierten C1-INH-Allels betroffene, jedoch klinisch noch nicht aufgefallene Mitglieder einer HAE-Familie identifiziert werden.

Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund einer Spontanmutationsrate von 20% die Familienanamnese bezüglich eines HAE oft negativ ist [Lischer et al, 2001]. Die Identifikation des zugrundeliegenden Gendefekts, welcher letztendlich die Grundlage für den entsprechenden Phänotyp darstellt, ermöglicht eine Sicherung der Diagnose HAE sowie den Ausschluss anderer Differentialdiagnosen. Dies steigert die Behandlungssicherheit des Patienten enorm und lässt darüberhinaus eine gezielte genetische Untersuchung weiterer Familienmitglieder zu.

Über 100 verschiedene Mutationen im C1-INH-Gen, die zur Ausbildung eines HAE führen, sind bisher in der Literatur beschrieben worden [Lischer et al, 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 58 HAE-Familien und ihren Mitgliedern verwendet, um eine Screeningmethode zur Mutationssuche zu etablieren, mit deren Hilfe Mutationen detektiert und durch eine anschließende Sequenzierung identifiziert werden können. Die Ergebnisse sollen mit einer durch eine ausführliche Literaturrecherche erstellten Datenbank aller bisher bekannten Mutationen des C1-INH-Gens, die zur Ausbildung eines HAE führen, verglichen werden, wobei neu entdeckte Mutationen weitere Aufschlüsse über die molekulargenetischen Ursachen des HAE liefern könnten. Durch die Untersuchung von Patientenkollektiven, deren Individuen den gleichen Gendefekt aufweisen, wäre es möglich, Vorhersagen darüber zu treffen, inwieweit der zugrundeliegende Gendefekt und der klinische Verlauf miteinander korrelieren. Anhand von Individuen mit gleichem Gendefekt, die sich sowohl im Zeitpunkt der Erstmanifestation als auch im Ausmaß und Art ihrer klinischen Beschwerdesymptomatik deutlich voneinander unterscheiden, wäre es möglich modifizierende Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluß auf die Ausbildung des Phänotyps haben [Pappalardo et al, 2001]. Gleichzeitig wäre aber auch die Untersuchung derjenigen Familien von besonderem Interesse, bei deren Mitgliedern eine dem klinischen Bild des HAE entsprechende Symptomatik besteht, ein Defekt im C1-Inhibitor-Gen jedoch nicht vorhanden ist. Hierbei müsste nach neuen Gendefekten bzw. neuen Genkandidaten für diesen Phänotyp gesucht werden.

## **2. Thematische Grundlagen**

### **2.1. Das hereditäre Angioödem (HAE) im Formenkreis angioödematöser Erkrankungen**

Die Klassifikation angioödematöser Erkrankungen, die zu akuten Ödemen führen, kann nach dem Mechanismus ihrer Entstehung erfolgen. Man unterscheidet hierbei zum einen Histamin-vermittelte Angioödeme und Angioödeme bei Urtikaria, zum anderen Angioödeme, die aufgrund eines C1-Inhibitor(C1-INH)-Mangels entstehen [Herold, 2000].

Histamin-vermittelte Angioödeme beruhen auf einer Typ I Immunreaktion. Dabei führt die Überbrückung mindestens zweier benachbarter membranständiger IgE-Rezeptoren an Mastzellen durch ein bivalentes Antigen zu einer akuten Freisetzung von Histamin, einem der wichtigsten vasoaktiven Mediatoren. Diese vermag das ganze Symptomenspektrum einer allergischen Sofortreaktion auszulösen. Hierzu zählen die Vasodilatation (Erythembildung), Steigerung der Gefäßpermeabilität (Ödem), Kontraktion der glatten Muskulatur (Bronchospasmus, Koliken), Hypersekretion der Schleimhäute (Rhinitis) und Juckreiz. In diesem Zusammenhang wären die idiopathischen Angioödeme, Intoleranzangioödeme, deren Hauptauslöser Acetylsalicylsäure (ASS) ist, des weiteren Angioödeme durch Angiotensin-Converting-Enzym-(ACE)-Hemmer, IgE-vermittelte allergische Angioödeme und durch physikalische Reize (Druck, Vibration, Kälte, Licht) ausgelöste Angioödeme zu nennen [Jung, 1998].

Im Gegensatz dazu beruht das hereditäre Angioödem auf einem vererbten Mangel an C1-Esterase-Inhibitor, welcher den Organismus vor einer unkontrollierten Aktivierung des Komplementsystems schützt. Davon abzugrenzen ist der erworbene Mangel an C1-Esterase-Inhibitor (AAE (acquired angioedema)), dem kein genetischer Defekt zugrunde liegt. Hierbei ist der als AAE Typ I bezeichnete C1-INH-Mangel mit einer lymphoproliferativen Erkrankung oder anderen malignen Prozessen assoziiert, im Rahmen derer es zur Produktion antiidiotypischer Antikörper gegen das monoklonale Immunglobulin kommt. In der Folge resultiert eine erhöhte Aktivierung des Komplementfaktors C1 und dadurch ein beschleunigter Katabolismus des C1-INH, der

somit nicht mehr in ausreichender Plasmakonzentration für weitere Reaktionen zur Verfügung steht. Beim AAE Typ II sind infolge eines Autoimmunprozesses Antikörper nachweisbar, die direkt gegen das C1-INH Protein gerichtet sind, wodurch die Bindung von C1-INH an C1 verhindert wird. Durch das auf diese Weise unkontrollierte C1 wird C1-INH in ein inaktives Protein gespalten und das Komplementsystem verstärkt aktiviert, was eine Entwicklung von Angioödemem zur Folge hat [Bork et al., 1997].

## **2.2. Epidemiologie**

Das hereditäre Angioödem ist eine sehr seltene Erkrankung, über die genaue Zahlen zur Inzidenz und Prävalenz nicht bzw. nur unzureichend vorliegen. Die Häufigkeit wird in der Literatur mit 1:10000 bis 1:150000 angegeben, wobei eine hohe Dunkelziffer vermutet wird [Lischer et al., 2001]. Während beispielsweise in Italien in nur einem von insgesamt drei HAE-Zentren 235 Patienten ermittelt werden konnten [Agostini et al. 1992], wurden in einer Erhebung die anamnestischen, präklinischen und klinischen Daten von über 242 HAE-Patienten in sechs Zentren Deutschlands, Österreichs und der Schweiz ausgewertet [Göring et al., 1998]. Dies verdeutlicht den hohen Seltenheitsgrad der Angioödeme mit einem C1-INH-Mangel als Ursache im Vergleich zu den idiopathischen oder allergischen Formen [Wüthrich et al., 1999].

## **2.3. Klinik, Diagnostik und Therapie des HAE**

### **2.3.1. Klinische Symptome**

Zu den Hauptsymptomen des HAE gehören umschriebene Ödeme der Gliedmaßen, des Gesichts, des Stamms und selten der Luftwege. Die Schwellungen der Haut sind zumeist von praller Konsistenz, hautfarben bis blass und treten in Einzahl, manchmal jedoch auch an mehreren Körperbezirken gleichzeitig auf. Eine abdominelle Symptomatik in Form krampfartig wiederkehrender Schmerzen ist ebenfalls möglich, wobei diese isoliert oder mit Hautveränderungen kombiniert auftreten kann. Prodromale Syndrome werden häufig als Spannungsgefühl und Prickeln der Körperbezirke ca. eine Stunde vor dem sichtbaren Ödem beschrieben. Des weiteren

klagen die Patienten in der unmittelbaren Prodromalphase eines Ödems über Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Kältegefühl, erhöhte Geräuschempfindlichkeit und ein allgemeines Missbehagen, während Gliederschmerzen und eventuell Fieber häufig den Schwellungen einen Tag vorausgehen können. Die fast nie juckenden, jedoch spannenden Ödeme bestehen durchschnittlich ein bis drei Tage, wobei sie bereits nach einigen Stunden oder erst nach mehreren Tagen abklingen können. Ihre Lokalisation, Dauer und Ausmaß variieren beim selben Patienten mit jedem Anfall. Die Extremitäten sind bei fast allen, das Gesicht bei ca. 85% der Patienten befallen. Die Einbeziehung der oberen Luftwege während eines Anfalls birgt die Gefahr der Ausbildung eines lebensbedrohlichen Larynxödems, welches immer noch die häufigste Todesursache bei HAE-Patienten darstellt. Dieses entwickelt sich verglichen mit Histamin-vermittelten Ödemen relativ langsam, so dass die Symptomatik zunächst mit Schluckbeschwerden und Stimmveränderungen beginnt, ehe es zur Atemnot und Erstickung kommt. Dennoch ist eine unverzügliche Therapie und Vorbereitung auf eine eventuelle Intubation oder Tracheotomie unabdingbar, da der Verlauf im Einzelfall nicht vorhersehbar ist. Die gastrointestinale Symptomatik, von der zwei Drittel der Patienten betroffen sind, äußert sich in Form krampfartiger Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen, sowie über mehrere Tage andauernder Diarrhöen, was zu erheblichen Flüssigkeitsverlusten mit der Folge einer Hämokonzentration bis hin zum Schock führen kann. Während vielfältige Faktoren, wie Injektionen, Operationen oder auch nur Minimaltraumen eine Attacke auslösen können, ist bei einem großen Teil der Patienten jedoch häufig kein auslösender Faktor identifizierbar, so dass ein spontanes Auftreten der Schwellungen angenommen werden muß.

### **2.3.2. Diagnostik und Differentialdiagnosen**

Bei klinischem Verdacht auf einen hereditären C1-INH-Mangel sollte die Labordiagnostik die Bestimmungen der Parameter C1-INH immunologisch, C1-INH funktionell, die Komplementfaktoren C1, C2, C4, CH50 und gegebenenfalls Autoantikörper gegen C1-INH zum Ausschluss eines AAE beinhalten.

85% der am HAE erkrankten Patienten weisen eine erniedrigte Plasmakonzentration an C1-INH auf, die zwischen 0 und 50 % liegt und durchschnittlich 17 bis 25 % der Norm



(Normwert gesunder Probanden: 15-35 mg/dl) beträgt, wobei in akuten Schüben der Erkrankung dieser Wert noch stärker erniedrigt ist. Eine Vorhersage über das Ausmaß eines Anfalls kann jedoch aus den C1-INH-Plasmakonzentrationen nicht abgeleitet werden. Die Bestimmung des Komplementfaktors C1 im Plasma wird zur Abgrenzung des HAE vom AAE herangezogen. Während C1 beim HAE im Normbereich liegt, ist er beim AAE Typ I fast immer erniedrigt. Des Weiteren ist beim HAE die Plasmakonzentration des Faktors C4 des Komplementsystems erniedrigt. Insgesamt wird die Diagnose HAE aus den rezidivierenden Hautödemen, den krampfartigen Abdominalbeschwerden, dem Larynxödem und der positiven Familienanamnese in Verbindung mit den zugehörigen Laborbefunden gestellt. Dies sollte so früh wie möglich geschehen, um eine wirkungsvolle Langzeitprophylaxe einzuleiten zu können und Komplikationen zu vermeiden [Bork et al, 1997].

### **2.3.3. Therapieoptionen**

#### **2.3.3.1. Therapie der akuten Schwellungen**

Während periphere Schwellungen und viszerale Attacken im allgemeinen tolerabel und nicht behandlungsbedürftig sind, ist eine Therapie bei Ödemen im Gesicht oder im Bereich der Mund-, Pharynx- und Larynxschleimhäute aufgrund der drohenden Erstickungsgefahr absolut indiziert. Bei einer durch ein massives Glottisödem verursachter und vital bedrohender Atemnot sollte eine Intubation oder, wenn dies nicht möglich ist, im Notfall sogar eine Tracheotomie erfolgen. Die medikamentöse Therapie der Wahl stellt die direkte Gabe eines C1-INH-Konzentrates (Berinert® HS) dar. Dabei muß beachtet werden, dass die Rückbildung der Symptomatik erst nach etwa ein bis zwei Stunden eintritt und schwere Verläufe manchmal mehrere Injektionen erfordern [Bork et al, 1997].

#### **2.3.3.2. Langzeitprophylaxe**

Aufgrund seiner erheblichen Nebenwirkungen wurde das früher zur Langzeitprophylaxe akuter Schübe des HAE verwendete Methyltestosteron von Danazol, einem anabol

wirkenden und weitaus besser verträglichem Androgenderivat abgelöst. Es handelt sich bei dieser Substanz um einen Inhibitor der Hypophysengonadotropinhormone, welcher zu einem Anstieg der Plasma C1-INH- und C4-Konzentration führt. Das im allgemeinen sehr gut wirkende Präparat darf jedoch bei Schwangeren und Kindern nicht eingesetzt werden. Obwohl die Behandlung mit  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, einem Antifibrinolytikum bei vielen Patienten eine deutliche Wirksamkeit aufweist, ist diese durch Nebenwirkungen, wie Phlebothrombosen, Myositiden und quälenden Analpruritus beschränkt. In den Fällen, in denen weder Danazol noch  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure eingesetzt werden können, ist eine Langzeitprophylaxe mit C1-INH-Konzentrat indiziert [Bork et al, 1997].

### **2.3.3.3. Kurzzeitprophylaxe**

Vor operativen Eingriffen im Kopf-, Mund- und Gaumenbereich sollte ebenfalls eine Prophylaxe durch Gabe eines C1-INH-Konzentrates (Berinert<sup>®</sup> HS) erfolgen. Prinzipiell ist dies ebenfalls mit Danazol oder  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure möglich [Bork et al, 1997].

## **2.4. Pathophysiologie des HAE**

Ein funktioneller Mangel an C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH), einem Regulatorprotein des klassischen Komplementreaktionsweges, stellt die Ursache für das HAE dar. Es wird vornehmlich in den Hepatozyten gebildet, obwohl zahlreiche andere Zellarten wie z. B. Monozyten, Mikrogliazellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Megakryozyten ebenfalls zur Synthese und Sekretion dieses Proteins befähigt sind [Prada et al. 1998]. Der genaue Pathomechanismus der Entstehung von Angioödemem durch einen Mangel an C1-INH ist bis heute nicht vollständig geklärt. Ausgelöst durch Minimaltraumen oder auch spontan bewirkt die unter einen bestimmten Schwellenwert erniedrigte C1-INH-Plasmakonzentration eine Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems und des Kininsystems, was zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität führt. Es werden prinzipiell zwei Pathomechanismen diskutiert, in denen einerseits ein Kininlike-C2-Fragment und andererseits Bradykinin für die Entstehung der Ödeme verantwortlich sein sollen. Das Kininlike-C2-Fragment entsteht als abnormes

vasoaktives Spaltprodukt aus dem aktivierten Faktor C2 (C2a und C2b). Die Rolle des Bradykinins, das aus dem nicht ausreichend durch C1-INH inhibierten Kallikrein entsteht, als Mediator kann angenommen werden, da es während eines akuten HAE-Anfalls bis zum zwölffachen des Normwertes erhöht ist. Jedoch muß dabei berücksichtigt werden, daß Bradykinin nach Hautinjektion nicht zu Angioödemem, sondern zu schmerzhaften umschriebenen Hauterythemen führt. Somit scheint erst das Zusammenwirken des Kinin-like-C2-Fragments mit Bradykinin das HAE auszulösen. Die Abb. 1 zeigt die zahlreichen Angriffspunkte des C1-INH in den verschiedenen Systemen und die sich aus einem C1-INH-Mangel ergebenden Folgen.

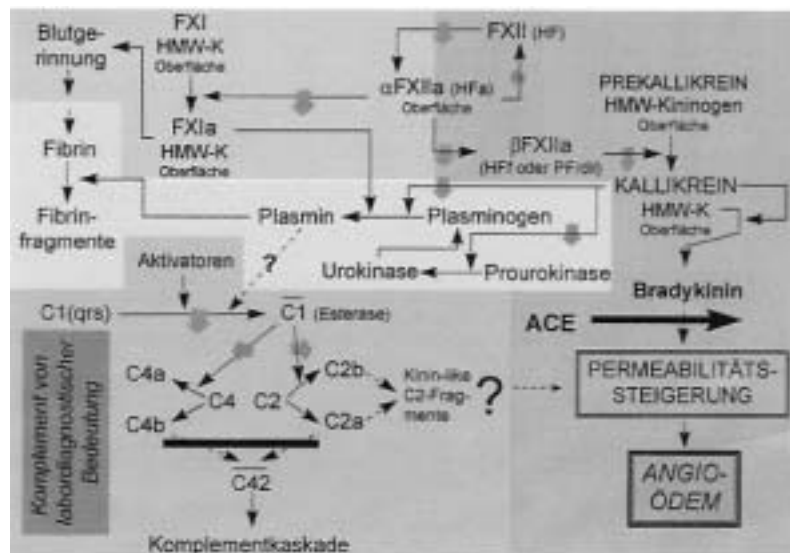


Abb. 1: Angriffspunkte (dargestellt durch graue Pfeile) des C1-INH und möglicher Pathomechanismus des HAE [Wüthrich et al, 1999]

Ist ein Trauma als auslösende Ursache der Ödeme eruierbar, so wird angenommen dass dieses zu einer Aktivierung der Gerinnungsfaktoren XI und XII führt, was einen Verbrauch an C1-INH und somit eine lokal verminderte Konzentration zur Folge hat [Bork et al, 1997].

## **2.5. Molekularbiologische Grundlagen des hereditären C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) - Mangels**

### **2.5.1. Vererbung und chromosomale Lokalisation**

Der angeborene C1-INH-Mangel und somit das HAE unterliegen einem autosomal dominanten Erbgang, wobei zwei verschiedene Genotypen und drei unterschiedliche Phänotypen unterschieden werden [Kreuz et al., 1998]. Der mit 85% häufigste Typ I beruht auf einer verminderten Synthese des C1-INH, wobei neben einem normal exprimierten C1-INH-Gen ein abnormes oder deletiertes Gen, welches nicht exprimiert wird, vorliegt (Phänotyp I). Dies hat sowohl eine Verminderung der C1-INH-Aktivität als auch des C1-INH-Antigens zur Folge. Beim HAE Typ II liegt zusätzlich zum intakten Allel ein abnormes Allel vor, welches zur Expressierung eines dysfunktionellen C1-INH-Proteins führt (Phänotyp II). Hierbei liegt die C1-INH-Konzentration im Normbereich bei ebenfalls verminderter oder fehlender Aktivität. Eine Sonderform stellt ein durch die Punktmutation Arg 444 gegen His oder Cys verändertes Protein dar, welches zu einem Phänotyp führt, bei dem das funktionslose Protein in höherer Konzentration an Serumalbumin gebunden ist [Aulak et al., 1988]. Obwohl bei allen Typen ein intaktes Allel vorhanden ist, liegt die Plasmaaktivität mit 15-20% weit unter der theoretisch angenommenen von 50 %, was mit einem erhöhten C1-INH-Umsatz bei HAE-Patienten erklärt wird [Kreuz et al., 1998]. Das für den C1-INH kodierende Gen wurde zunächst auf Chromosom 11 (q11.2-q13) nahe des Zentromers lokalisiert [Bock et al., 1986], ehe es mit Hilfe einer in-situ Hybridisierung auf Chromosom 11 (q11-q13.1) genauer präzisiert werden konnte [Theriault et al., 1989, 1990].

### **2.5.2. Aufbau und Expression des C1-INH-Gens**

Das für den C1-INH codierende Gen besitzt eine Länge von 17159 bp und besteht aus 8 Exons und 7 Introns, über die insgesamt 17 repetitive Sequenzen der Alu-Familie verteilt sind (siehe Abb. 2).

# C1-Inhibitor Gen

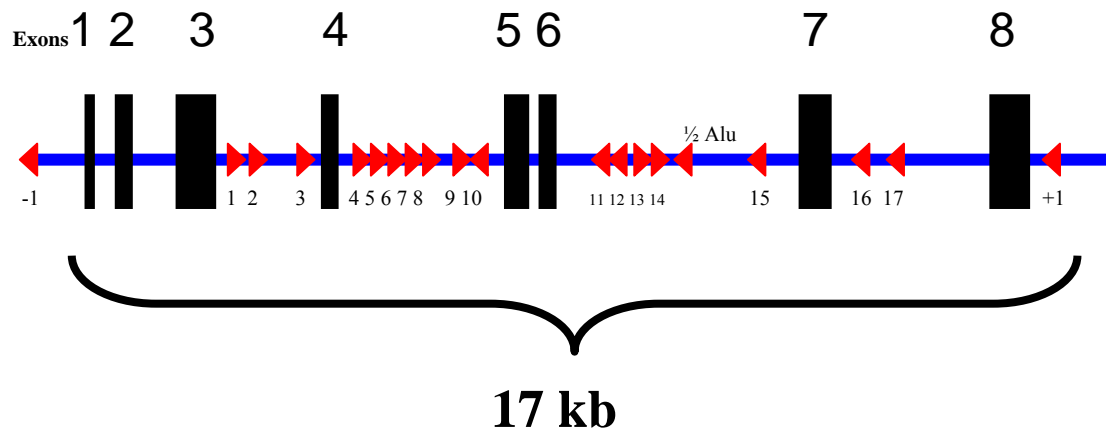


Abb. 2: Struktur des C1-INH-Gens (Pfeile repräsentierten Alu-repeats)  
[Verpy et al, 1993]

Das 38 bp lange Exon 1 (Position 1-38) wurde als Beginn der C1-INH m-RNA identifiziert. Im Gegensatz zu anderen eukaryontischen Promotoren besitzt das C1-INH-Gen keine für diese typische TATA-Box, sondern weist an der entsprechenden Position (Position -48 bis -17) eine pyrimidin-reiche Region mit einer potentiellen H-DNA-Struktur auf, innerhalb der die Nukleotide -35 bis -17 starke Ähnlichkeit mit einer Sequenz besitzen, die aufwärts des menschlichen c-myc-Gens liegt. Diese Sequenz stellt eine Bindungsstelle für Proteine dar, die als Regulatoren der Transkription agieren. Jedoch war lange Zeit nicht bekannt, ob dies ebenfalls auf die Transkription des C1-INH-Gens zutrifft. Zwei weiter aufwärts gelegene Abschnitte (Position -103 bis -100 und -61 bis -58) stellen möglicherweise jeweils eine CAAT-Box dar [Carter et al, 1990]. In neueren Untersuchungen wurden in den flankierenden 5'-Regionen sowie im Intron 1 bestimmte Abschnitte teilweise identifiziert, über die mittels IFN gamma, IFN alpha, IL6 und TNF die Transkription gesteuert wird. Obwohl, wie bereits in Abschnitt 2.3.3., dargestellt, Androgene und ihre Derivate (z.B. Danazol) zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration an C1-INH führen und damit zur Therapie und Prophylaxe akuter Schübe des HAE erfolgreich eingesetzt werden, ist der genaue Mechanismus noch weitgehend unbekannt [Prada et al, 1998]. Das Prinzip der Steuerung von

Genexpressionsvorgängen durch Steroidhormone ist an das Vorliegen spezifischer, intrazytoplasmatischer Rezeptorproteine geknüpft, an welche die Hormone nach Durchwanderung der Zellmembran binden und anschließend als Hormon-Rezeptor-Komplexe in den Zellkern wandern. An diesem Ort kann eine Bindung an bestimmte Stellen der DNA erfolgen, wodurch die Transkription eines eigenen Satzes von 50 bis 100 Genen induziert oder reprimiert wird [Stryer et al., 1996]. Beim C1-INH-Gen wurden zwar Elemente gefunden, die möglicherweise Bindungsstellen für Glukokortikoid- und Androgen-Rezeptor-Komplexe repräsentieren. Diese scheinen jedoch nicht eine Bindung dieser Komplexe in der Weise zu beantworten, als dass damit ein direkter Einfluß auf Synthese und Sekretion von C1-INH erklärt werden könnte [Prada et al, 1998].

### **2.5.3. Struktur und Funktionsweise des C1-INH-Proteins**

Der C1-Esterase Inhibitor gehört zur Familie der Serinproteaseinhibitoren, auch als Serpine bezeichnet, die untereinander homologe Strukturen und gemeinsame Reaktionsmodi mit ihren Zielproteasen aufweisen. Sie bestehen aus 400-450 Aminosäuren, die bezüglich der Sekundärstruktur in drei  $\beta$ -Faltblattstrukturen und acht oder neun  $\alpha$ -Helices organisiert sind. In der Funktionsweise der Serpine ist ein Prinzip der molekularen Mimikry erkennbar, bei dem die Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums der Serpine der des natürlichen Substrates entspricht und auf diese Weise mit den zu inhibierenden Proteasen zunächst in Form eines Michaelis-Komplexes interagieren kann. Nach dieser Interaktion bildet sich ein Intermediärkomplex aus Inhibitor und Protease aus, der entweder stabil verbleibt oder wieder in die Protease und den gespaltenen Inhibitor zerfällt, wobei die Dissoziation des stabilen Komplexes sehr langsam verläuft [Zahedi et al, 2001].

Die Aminosäurekette des C1-INH-Proteins besteht aus 478 Aminosäuren, deren Molekulargewicht von 52869 Dalton nur 51% des Gesamtgewichtes des posttranslational durch Glykosilierung mit Oligosacchariden modifizierten Proteins von 104000 Dalton ausmacht. Ein Teil der glykosilierten Aminosäurereste wurde bereits identifiziert. Über N-gebundene Glucosamin-Oligosaccharide sind die Asparaginreste Nr. 3, 47, 59, 216, 231, 330 glykosiliert, während O-gebundene Galaktosamin-

Oligosaccharide an den Aminosäureresten von Serin Nr. 42 und Threonin Nr. 26, 66, 70, 74 zu finden sind. Bei sieben weiteren Threoninresten (Nr. 77, 84, 85, 89, 93, 96 und 97) wird eine Glykosilierung vermutet. Das reaktive Zentrum des C1-INH, das eine Erkennungssequenz für die Zielprotease beinhaltet, wird bei der Bildung des Protease-Inhibitor-Komplexes gespalten (siehe Abb. 3), so dass ein neuer N-terminaler Threoninrest entsteht. Dabei handelt es sich um den als P1 bezeichneten Aminosäurerest von Arginin Nr. 444 und den durch die Spaltung entstandenen P1'-Aminosäurerest von Threonin Nr. 445 [Bock et al, 1986]. Da ein Serpin mit nur einer P1-Erkennungssequenz verschiedene Proteasen inhibieren würde, Serpine mit dem gleichen P1-Rest jedoch mit hoher Spezifität nur ihre Zielproteasen inhibieren, muß angenommen werden, dass weitere Aminosäurereste vorhanden sind, die dem Inhibitor seine Spezifität verleihen [Zahedi et al, 2001]. Beim C1-INH scheinen die Aminosäurereste Glutamin Nr. 452, Glutamin Nr. 453, Polin Nr. 454 und Phenylalanin Nr. 455 eine wichtige Rolle in der Erkennung und Bindung an den Komplementfaktor C1s zu spielen [He et al, 1997].

Zwei Disulfid-Brücken im C1-INH zwischen den Cysteinresten Nr. 101 und Nr. 406 sowie Nr. 108 und Nr. 183 sind für die Ausbildung der Tertiärstruktur und die Stabilität des Proteins unerlässlich, da sie die Konformation und Mobilität einer bestimmten  $\beta$ -Faltblattstruktur beeinflussen. Werden diese Disulfid-Brücken aufgelöst, resultiert eine verminderte inhibitorische Aktivität des C1-INH [Simonovic et al, 2000].

Abb.4 zeigt ein mit Hilfe von Silicon Graphics generiertes Modell des C1-INH-Proteins unter Verwendung der Koordinaten des Ovalbumins, wobei die Lokalisationen des reaktiven Zentrums Arginin Nr. 444 und einer der Aminosäurereste (Glutamin Nr. 452) der sekundären C1s-Bindungsstelle gekennzeichnet sind [He et al, 1997].

# C1 Inhibitor Domänenstruktur

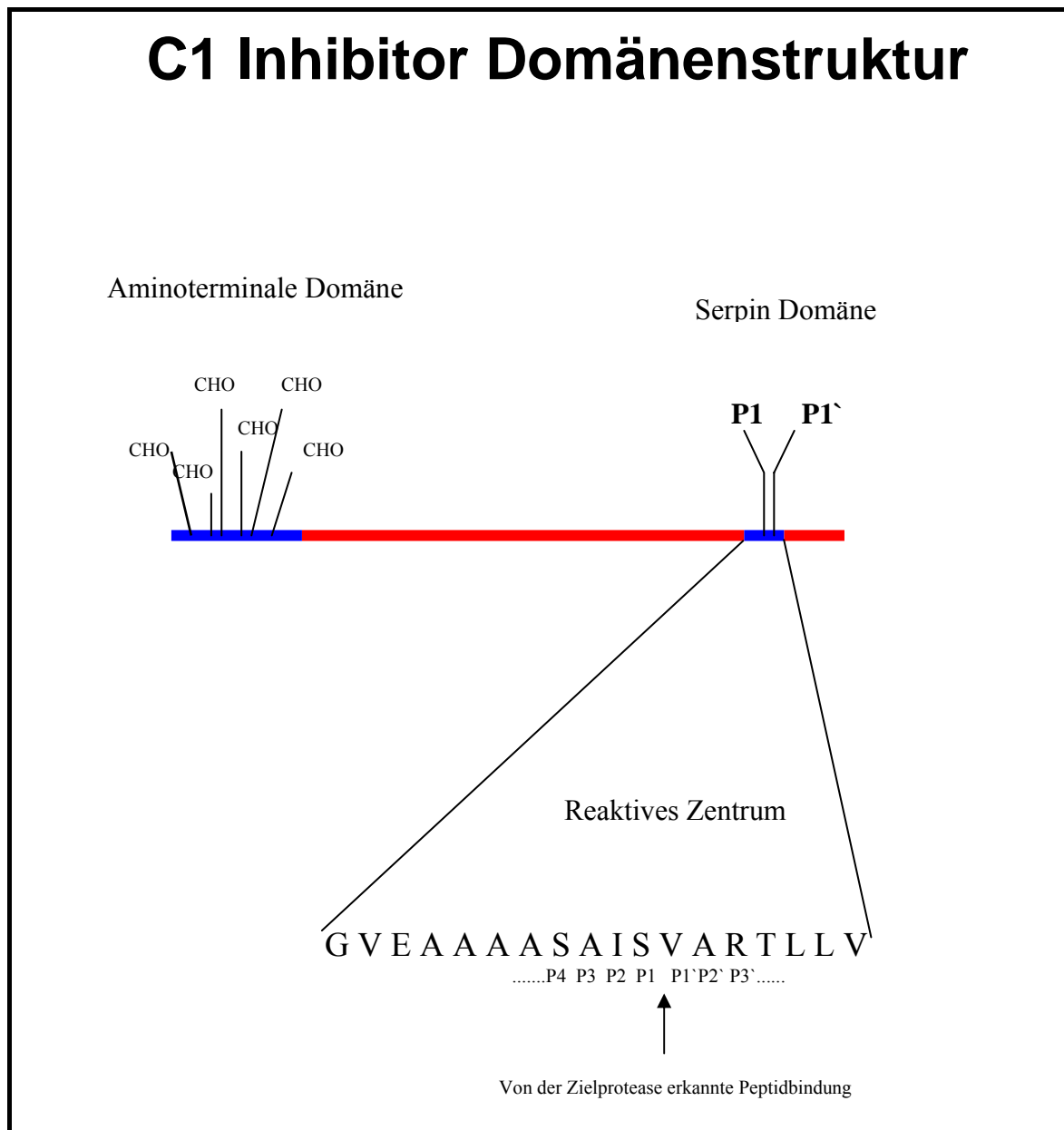


Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des C1-INH-Proteins: mit CHO sind O-gebundene Galaktosamin-Oligosaccharide bezeichnet [Aulak et al., 1993]



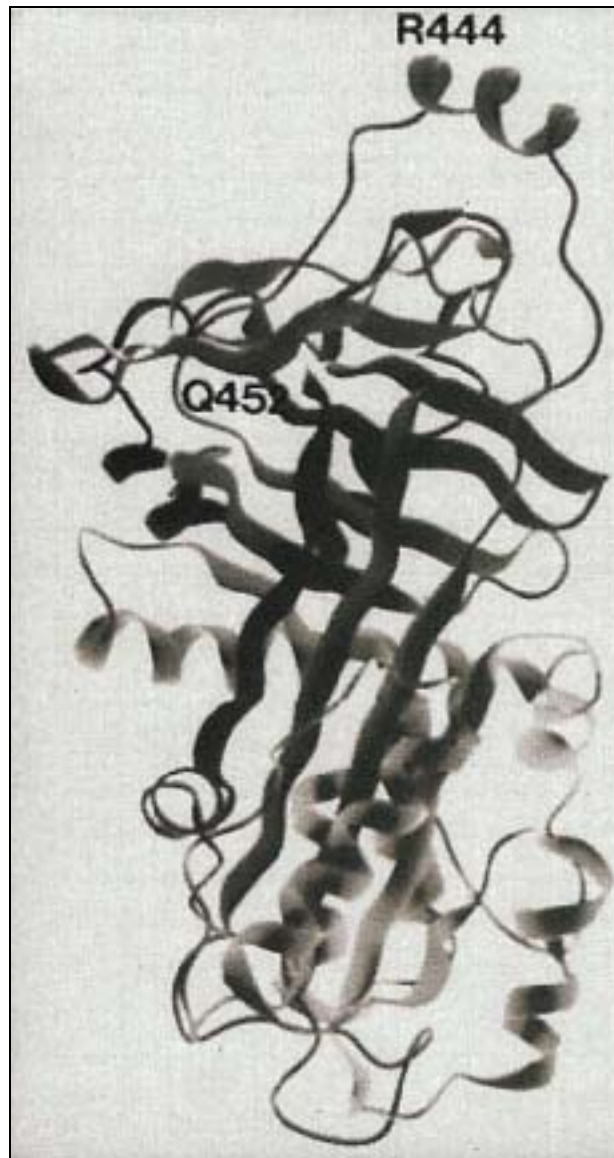


Abb. 4: Computergenerierte Struktur des C1-INH-Moleküls [He et al, 1997]

### 3. Patienten, Material, Methoden

#### 3.1. Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 58 HAE-Familien und ihren Mitgliedern untersucht, welche von der Frankfurter Kinderklinik zur molekulargenetischen Diagnostik eingesandt wurden. Die Selektion der Patienten erfolgte hierbei nach klinischen und laborchemischen Gesichtspunkten sowie einer positiven HAE-Familienanamnese. Hierbei konnte bei einem Teil der Patienten jedoch nur ein Verdacht auf eine HAE-Erkrankung geäußert werden, da diese bisher keine klinische Symptomatik aufwiesen oder andere Differentialdiagnosen nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. Diese klinischen und therapierelevanten Unsicherheiten sollten durch die molekulargenetische Untersuchung abgeklärt werden.

#### 3.2. Materialien

##### 3.2.1. Chemikalien, Kits

Amersham:	Trishydroxymethylaminomethan (Tris) ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ), Sequenase PCR Product Sequencing Kit, Acrylamid
Biozym:	Agarose
Delta-Pharma GmbH:	$\text{H}_2\text{O}$ (aqua ad iniectabilia)
Fluka:	Formamid ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ), (+) Saccharose
Gibco:	Bis-Acrylamid, 100 bp ladder
Merck:	Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), Dichlordimethylsilan (2%ige Lsg. in 1, 1, 1 –Trichlorethan), Glycerin( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), Harnstoff ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), Kaliumhydrogenkarbonat ( $\text{KHCO}_3$ ), Kaliumchlorid (KCl), Natronlauge (NaOH), Salzsäure (HCl)
National Diagnostics:	Sequagel-6 (6%ige Sequenzierlösung) und buffer reagent
Peqlab:	Agarose
Qiagen:	QIAEX Lsg. 1, QIAEX Lsg. 2 (Glasmilch), QIAEX Lsg. 3
Roth:	Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), Ethanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), Ethidiumbromid-

Lsg. (1%ige Färbelsg.), Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH), Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Sigma: Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, Xylencyanol, N, N, N, N – Tetramethyldiamin (TEMED)

Serva: EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)

### 3.2.2. Enzyme

Exonuklease I	Amersham Pharmacia Biotech
Proteinkinase K (10 mg/μl)	Merck
Sequenase	Amersham Pharmacia Biotech
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Amersham Pharmacia Biotech
Taq-Polymerase	Gibco BRL

### 3.2.3. Radiochemikalien

[α <sup>33</sup> P] ddNTP	Amersham Pharmacia Biotech
---------------------------	----------------------------

### 3.2.4. Puffer

Auftragungspuffer: 40 ml 250 mM EDTA ( pH 6,8 )

(für Agarose- und DGGE-Gele) 50 g Saccharose  
0,1 g Bromphenolblau  
aqua dest. ad 100 ml

Lysispuffer: 8,29 g NH<sub>4</sub>Cl = 155 mM  
(autoklaviert / pH 7,4) 1 g KHCO<sub>3</sub> = 10 mM  
0,034 g Na<sub>2</sub>EDTA = 0.1 mM  
aqua dest. ad 100 ml

PAA-Puffer:  
(für Sequenziergele)

95 ml	Formamid = 95%
250 ml	4M NaOH = 5 mM
100 mg	Bromphenolblau = 0,1%
100 mg	Xylencyanol = 0,1%
aqua dest. ad 100 ml	

PCR-Puffer:

100 µl	10 x Polymerase-Puffer
160 µl	Nukleotid-Stammlösung
30 µl	MgCl <sub>2</sub>
610 µl	aqau dest.

---

900 µl	1 x Puffer (1,66 mM Mg <sup>2+</sup> )
--------	--

10 x Polymerase-Puffer:

2,4 g	Tris/HCl ( pH 8,3)	=	200 mM
3,7 g	KCl	=	500 mM
aqua dest. ad 100 ml			

SE-Puffer:  
(autoklaviert / pH 8,0)

4,39 g	NaCl	=	75 mM
8,41 g	Na <sub>2</sub> EDTA	=	25 mM
aqua dest. ad 1 l			

50 x TAE-Puffer:

42 g	Tris
55,1 ml	Essigsäure
100 ml	0.5 M EDTA
aqua dest. ad 1 l	

5 x TBE-Puffer:

270 g	Tris
137,5 g	Borsäure
3,75 g	EDTA

aqua dest. ad 5 l

<u>TE-Puffer:</u>	1,21 g	Tris/HCl (pH 8.0)	=	10 mM
	0,34 g	EDTA	=	1 mM

### 3.2.5. Lösungen

<u>Acrylamid-Lsg. (40%):</u>	39 g	Acrylamid
	1,07 g	Bis-Acrylamid
	aqua dest. ad 100 ml	

<u>APS-Lsg. (40%):</u>	0,4 g	Ammoniumpersulfat
	850 µl	aqua dest.

#### Denaturierungslösungen für DGGE-Gele:

- 0%ige Lsg.:	25 ml	40 %ige Acrylamid-Lsg.
	2 ml	50 x TAE - Puffer
	aqua dest. ad 100 ml	

- 100%ige Lsg.:	25 ml	40 %ige Acrylamid-Lsg.
	2 ml	50 x TAE - Puffer
	40 ml	Formamid
	42 g	Harnstoff
	aqua dest. ad 100 ml	

- 80%ige Lsg.:	80 ml	100%ige Lsg.
	20 ml	0%ige Lsg.

- 20%ige Lsg.:	20 ml	100%ige Lsg.
	80 ml	0%ige Lsg.

<u>Nukleotid-Lsg.:</u>	12,5	µl	dATP = 100 mM
	12,5	µl	dATP = 100 mM
	12,5	µl	dATP = 100 mM
	12,5	µl	dATP = 100 mM
	950	µl	aqua dest.
<u>SDS-Lsg.:</u>	20	g	SDS
			aqua dest. ad 100 ml
<u>Sequenziergellsg.:</u>	288	ml	Sequagel-6 Sequenzierlsg.
	72	ml	buffer reagent

### 3.2.6. Gele

- \* Agarosegel (2%ig): 2,0 g Agarose in 100 ml 1 x TAE, 5 µl Ethidiumbromid  
→ Elektrophorese mit 1 x TAE-Puffer
- \* DGGE-Gel:  
(Gradient 0%-80%) 28 ml Denaturierungs-Lsg. (14 ml 80%ige Gradientenlsg.  
+ 14 ml 0%ige Gradienten-Lsg.), 16 µl TEMED, 40 µl  
40%ige APS-Lsg.  
→ Elektrophorese mit 1 x TAE-Puffer
- \* DGGE-Gel:  
(Gradient 20%-100%) 28 ml Denaturierungs-Lsg. (14 ml 100%ige Gradientenlsg.  
+ 14 ml 20%ige Gradienten-Lsg.), 16 µl TEMED, 40 µl  
40%ige APS-Lsg.  
→ Elektrophorese mit 1 x TAE-Puffer
- \* Sequenziergel: 75 ml Sequenziergel-Lsg., 150 µl 40 %ige APS-Lsg.  
→ Elektrophorese mit 1 x TBE-Puffer

### 3.2.7. Oligonukleotide

Für die einzelnen Exons des C1-INH Gens wurden die Primer so gewählt, dass die zu amplifizierenden Bereiche in ausreichendem Maß von Intronabschnitten flankiert werden. Das Exon 3 wurde überlappend in die Exonbereiche 3.1 und 3.2 geteilt, um eine für die DGGE zu große Fragmentlänge nicht zu überschreiten. Für die Amplifikation wurden folgende Primer verwendet:

#### EXON 1 ( Länge 200 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-ACACCAGCGATCAATCTTCC-3' ( Pos. -114 - -95 )

Reverse-Primer (r): 5'-TCCATGCTTTCCACCCTACT-3' ( Pos. 67 - 86 )

#### EXON 2 ( Länge 216 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-GGAGGAGGGAATTCGCTAAG-3' ( Pos. 443-463 )

Reverse-Primer (r): 5'-ATCCCACAAGGGACCACATA-3' ( Pos. 639-658 )

#### EXON 3.1 ( Länge 373 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-CATCCACACCTTCTCTTCCTG-3' ( Pos. 2017-2127 )

Reverse-Primer (r): 5'-TCTGTTGGGAGCTGGGTAGT-3' ( Pos. 2460-2479 )

#### EXON 3.2 ( Länge 350 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-TACCACTGATGAACCCACCA-3' ( Pos. 2387-2406 )

Reverse-Primer (r): 5'-TGTCCAACAAATGACCTGGA-3' ( Pos. 2717-2736 )

#### EXON 4 ( Länge 287 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-AGCAGGGAATACCCTCCATT-3' ( Pos. 4248-4267 )

Reverse-Primer (r): 5'-TCCTCTCAGGACCCTCCTCT-3' ( Pos. 4515-4534 )

#### EXON 5 ( Länge 277 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-TCATGCCTCCCTTTCTCAAC-3' ( Pos. 8295-8314 )

Reverse-Primer (r): 5'-AGGACCCAGAATGGGAAGAC-3' ( Pos. 8552-8571 )

EXON 6 ( Länge 277 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-GGATCTCAATGTCCCTGCAC-3' ( Pos. 8620- 8639 )

Reverse-Primer (r): 5'-TTTCAAACAGGAGAAGGAAAGG-3' ( Pos. 8875-8896 )

EXON 7 ( Länge 328 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-CCAGGAGAGAGATGCGGTAG-3' ( Pos. 13978-13997 )

Reverse-Primer (r): 5'-GATCCCCCTTTCTCCTCTGA-3' ( Pos. 14286-14305 )

EXON 8 ( Länge 345 bp ):

Forward-Primer (f): 5'-CATGCTGGCTTCTGACTCTG-3' ( Pos. 16600-16619 )

Reverse-Primer (r): 5'-GAGCTGAGGCTGGAGAGGTA-3' ( Pos. 16925-16944 )

An jeden Forward-Primer (f) wurde eine GC-Clamp angehängt, durch die ein Teil der DNA doppelsträngig bleibt. Dies ermöglicht deren Anfärbbarkeit mit Ethidiumbromid und somit die Darstellbarkeit im UV-Licht.

Sequenz der GC-Clamp(GC)<sub>x</sub>: 5'-CGC CCG CCG CCC GCC CCG CCC GCC  
GCC CGC CCC GCC CGC-3'

### 3.2.8. Arbeitsgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Modell</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	Bioklav	Schütt
Autoradiographiekassette		Kodak
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agerosegele	Horizon 14	Gibco-BRL
Elektrophoresekammern für DGGE-Gele und gesamtes DGGE-Zubehör		Bio-Rad
Elektrophoresekammern für Sequenziergele mit dazu gehörenden Glasplatten	Modell S2	Life Technologies Gibco
Entwicklermaschine für Röntgenfilme	Compact 35	Protec
Gel-Trockner	Mod. 583	Bio-Rad



Heizblock		Liebisch
Kamera		Herolab
Magnetrührer	Ikamag	Ika
Mischkammer	100 ml	H. Hölzel
Netzgeräte	PS 9009	Gibco-BRL
	PS 9009 TC	Gibco-BRL
		Consort
PCR-Cycler	Thermocycler 60	Biomed
	PTC 200	Biozym
	Mastercycler 5330	Eppendorf
pH-Meter	pH 537	Wtw
Pipetten		Gilson
		Eppendorf
		Brand
Pumpe	MS-Reglo	Ismatec Sa
Rödler	3025	Gfl
Schüttler	3013	Gfl
Spektralphotometer	Gene Quant II	Pharmacia Biotech
UV-Transluminator		Bachhofer
Vakuumpumpe		Vacuubrand
Videokamera		Herolab
Videoprinter		Mitsubishi
Vortex		Ika
Waage	Delta Range 3600	Mettlet
Wasserbad		Lauda
Zentrifuge (groß)	Minifuge RF	Heraeus sepatech
Zentrifuge (klein)	Biofuge A	Heraeus Christ

### 3.2.9. Sonstige Materialien

Caps (1.5 ml Reaktionsgefäße)		Eppendorf
DNA-tubes	cryo-tubes	Nunc

Entwickler und Fixierer		Adefo
Filterpapier		Whatman
Mikrotiterplatte		Nunc
Photopapier	K 65 HM	Mitsubishi
Röhrchen	50 ml	Falcon
Röntgenfilme	Retina XBD	Fotochemische Werke
Sterilfilter	0.2 µm	Schleicher&Schuell
	0.8 µm	Lida

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Blut

Zur erfolgreichen Isolierung genomischer DNA aus Blut sind mehrere Schritte notwendig: Lyse der Erythrozyten, Fällung der DNA und die Konzentrationsbestimmung der gefällten DNA im Spektralphotometer.

##### a) Lyse der Erythrozyten:

Zu maximal 10 ml Vollblut wurde das dreifache Volumen Lysispuffer gegeben. Der Ansatz wurde gemischt, mind. 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 200 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sollte ein weißes Lymphozytenpallet sichtbar sein. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet durch Zugabe von ca. 10 ml Lysispuffer und erneute Zentrifugation gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pallet mit 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Abschließend wurden 100 µl Proteinase K und 250 µl 20%ige SDS-Lsg. zugegeben, gemischt und die Suspension über Nacht bei 37°C im Wasserbad belassen.

##### b) Fällung der DNA:

Nach der Proteolyse wurden dem Ansatz 2,5 ml SE-Puffer zugegeben. Hierbei musste beachtet werden, dass dieser Schritt nicht notwendig war, falls zu Beginn weniger als 10 ml Vollblut eingesetzt worden waren. Anschließend wurde pro ml Lymphozytensuspension 0,3 ml gesättigte NaCl-Lsg. hinzupipettiert, die Mischung 10 s lang gemischt und mind. 10 min bei 55°C in ein Wasserbad gestellt. Dadurch wurden

ausgefallene Salze gelöst. Nach der darauffolgenden Zentrifugation bei 4000 U/min und Raumtemperatur wurde der dadurch entstandene Überstand in ein Röhrchen übergeführt. Nach Zugabe des doppelten Volumens an 100%igem Ethanol wurde das Röhrchen so lange hin- und hergekippt, bis eine DNA-Wolke sichtbar wurde. Mit einer speziellen, an ihrem Ende nach oben gebogenen und sterilen Pasteurpipette konnte die DNA herausgefischt werden. Des Weiteren wurde die DNA kurz in 70 %igen Ethanol getaucht und danach für einige Sekunden zur Verdunstung des Ethanols bei Zimmertemperatur belassen. Je nach DNA-Menge wurde diese abschließend in 200-900 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen und zur Lösung für einige Stunden auf dem Schüttler belassen.

#### c) Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Durch die Messung der optischen Dichte (OD) bzw. der Absorption bei 260nm im UV-Spektrometer konnte eine Konzentrationsbestimmung der isolierten genomischen DNA durchgeführt werden, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum der aromatischen Purin- und Pyrimidinreste in DNA-Molekülen liegt.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz und unter Berücksichtigung der im Labor etablierten Verhältnisse wurde aus dem photometrisch bestimmten Messwert bei einer verwendeten Verdünnung von 1:100 die entsprechende DNA-Konzentration (µg DNA/ml) in einer Lösung ermittelt.

Etablierte Verhältnisse:

- \* 1 OD ~ 50 µg DNA/ml Lsg. für doppelsträngige DNA
- \* 1 OD ~ 20 µg DNA/ml Lsg. für einzelsträngige DNA

### **3.3.2. Polymerase Kettenreaktion ( PCR )**

Bei der Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion) handelt es sich um eine in vitro-Methode, die es ermöglicht gezielt DNA-Abschnitte in beliebiger Menge zu amplifizieren [Newton and Graham, 1994]. Für die Amplifikation wird genomische DNA verwendet, die zuvor aus Blut isoliert wurde. Um ein bestimmtes Fragment vervielfältigen zu können, muß dieses von zwei zuvor ausgewählten und zueinander weisenden DNA-Sequenzen, sogenannten Primern (Oligonukleotiden) flankiert

werden. Ein auf dem Lesestrang liegender forward-Primer (f) und ein auf dem komplementären Strang liegender reverse-Primer (r) sind hierzu notwendig, da die DNA-Polymerase nur in 5'-3'-Richtung synthetisieren kann. Die zyklische Wiederholung der drei Einzelreaktionen, Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation ermöglicht bei n-Zyklen die Produktion von theoretisch  $2^n - 1$  Kopien. Bei einer Zykluszahl von 30-35 wird folglich der spezifische DNA-Bereich um den Faktor  $2 \cdot 5 \times 10^5$  vervielfältigt [Saiki et al., 1987].

Die PCR beginnt mit einer bei 95°C stattfindenden Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA, die als Vorlage (Template) für die PCR dient. Hierdurch wird eine Einzelsträngigkeit der DNA erreicht, an deren Anschluß als zweite Teilreaktion eine Anlagerung (Annealing) der synthetisch hergestellten Primer erfolgt. In der dritten Teilreaktion, die als Elongation bezeichnet wird, synthetisiert eine DNA-Polymerase beginnend an den angelagerten Primern und komplementär zu der einzelsträngig vorliegenden DNA den zu kopierenden DNA-Abschnitt. Die aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine ausreichend hohe Thermostabilität aus, so dass ihre Enzymaktivität nach einmaliger Zugabe auch bei hohen Temperaturen über mehrere Stunden erhalten bleibt.

### 3.3.2.1. Reaktionsansatz

50	µl	PCR-Puffer
1,5	µl	f-Primer (20 pmol/µl)
1,5	µl	r-Primer (20 pmol/µl)
0,6	µl	Taq-Polymerase
2	µl	DNA (x µg/ml)
55,6	µl	Ansatz

Tab. 1: Reaktionsansatz für eine PCR

### 3.3.2.2. Reaktionsbedingungen

	95°C	5'	
Denaturierung	95°C	45''	35 Zyklen
Annealing	x°C	45''	
Elongation	72°C	1'	
	72°C	7'	
	4°C	konstante Inkubation	

Tab. 2: Reaktionsbedingungen einer PCR

### 3.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis von PCR-Produkten wurde die horizontale Gel-Elektrophorese verwendet [Meyers et al., 1976]. Das Prinzip beruht darauf, dass DNA-Moleküle aufgrund der Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates in einem elektrischen Feld wandern, wobei kürzere DNA-Fragmente sich im Gel schneller bewegen, als längere.

Es wurden 2,0 %ige Agarosegele mit einem Ethidiumbromidzusatz von 0,5 µg/ml Gel und als Laufpuffer TAE-Puffer verwendet. Nach Zugabe von 6 µl Auftragungspuffer zu 50 µl PCR-Produkt und anschließendem Mischen, wurden 10 µl in die durch zuvor eingelegte Kämme vorgegebenen Taschen pipettiert. Im Anschluß daran wurde eine Spannung von 8V/cm Laufstrecke angelegt. Der zum Agarosegel zugegebene Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid wurde während der Elektrophorese in die DNA-Helix eingebaut, wobei der sich dadurch gebildete DNA/Farbstoff-Komplex aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften bei Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) die Darstellung der DNA-Fragmente in Form von Banden ermöglichte. Zur Größenermittlung der DNA-Fragmente wurde ein parallel aufgetragener Längenstandard (100 bp ladder) verwendet.

### **3.3.4. Heteroduplexbildung der DNA-Fragmente**

Vor der Durchführung der DGGE wurden alle PCR-Produkte inklusive Stopppuffer 10 min lang bei 95 °C denaturiert, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen gelöst und die PCR-Produkte in einzelsträngige DNAs übergeführt wurden. Die anschließende, zehnminütige Inkubation bei 55 °C bewirkte eine Reorganisation zu Doppelstrang-DNA in der Weise, dass es zur Ausbildung sogenannter Homo- und Heteroduplexes kam. Dieses Prinzip beruht darauf, dass dies zu einem deutlich veränderten Schmelz- und damit auch Laufverhalten im Gradientengel führt und somit eine Detektion von Mutationen in der sich anschließenden DGGE ermöglicht. Im Idealfall kommt es zur Ausbildung eines charakteristischen 4-Banden-Musters [Myers et al., 1988]. Die Voraussetzung für eine Hetero- bzw. Homoduplexbildung beim HAE ist durch die Heterozygotie und die autosomale Lokalisation des C1-INH Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 11 gegeben [Theriault et al., 1989, 1990].

### **3.3.5. Denaturierende Gradientengelelektrophorese ( DGGE )**

a) Prinzip der DGGE [Cariello und Skopek, 1993], [Newton und Graham, 1994]:

Die DGGE stellt eine empfindliche und schnelle Methode zum Nachweis von Sequenzunterschieden in der DNA (Mutationen und Polymorphismen) dar. Als Screeningmethode zur Mutationssuche kann sie jedoch nur Unterschiede zwischen DNA-Fragmenten aufzeigen, die dann in einer anschließenden Sequenzierung genauer charakterisiert werden müssen.

Bei dieser Methode wird ein Elektrophoresegel verwendet, das eine von oben nach unten zunehmende Konzentration einer denaturierenden Substanz enthält. In diesem lässt man DNA-Doppelstränge wandern. Das Prinzip beruht hierbei darauf, dass die Schmelzeigenschaften doppelsträngiger DNA, deren Stränge sich nur in einem Basenpaar voneinander unterscheiden, voneinander abweichen. Die Wanderung der DNA-Moleküle verläuft bis zu einer bestimmten Position im Gel, an der die DNA-Doppelstränge aufschmelzen und in ihre Einzelstränge getrennt werden. Hierbei erfolgt Aufschmelzung sowohl chemisch (0-40%iges Formamid und 0-7 M Harnstoff) als auch

thermisch (60 °C), so dass es bei Fragmenten mit unterschiedlichem Schmelzverhalten, welches von der Sequenz und der Basenzusammensetzung (GC-Gehalt) der DNA bestimmt wird, zur Ausbildung verschiedener Banden kommt. Im idealen Fall erhält man vier Banden, zwei Hetero- und zwei Homoduplizes.

Da in der DGGE die Basenunterschiede in der zuletzt aufschmelzenden Domäne nicht erfasst werden können, muß bereits während der PCR eine künstliche Domäne mit ausreichend hoher Schmelztemperatur angehängt werden. Diese besteht aus einer GC-Clamp (GC-Klammer) mit ca. 40 C- und G-Basen, die an einen der PCR-Primer hinzugefügt wird, und gewährleistet unter den gewählten Bedingungen einen teilweisen Verbleib der DNA in doppelsträngiger Konfiguration.

#### b) Herstellung denaturierender Gradientengele

Für die zu untersuchenden Fragmente aus dem C1-INH Gen konnte zum Teil auf die im Labor bereits etablierten Bedingungen für die DGGE zurückgegriffen werden. Während für die zu untersuchenden Bereiche aus den Exons 1, 3.1, 3.2, 4, 5, 6, 7, 8 ein für viele andere Fragmente bereits etablierter von oben nach unten ansteigender Gelgradient von 0%-80% verwendet werden konnte, musste für den Exon 2 Bereich ein Gradient von 0%-100% eingesetzt werden, um eine zufriedenstellende Bandendarstellung zu ermöglichen.

Für die Aufnahme des Gels wurden zunächst Gießkammern vorbereitet, die jeweils aus einer 10,1 cm x 8,2 cm und einer 12,1 cm x 8,2 cm mit den entsprechenden Abstandshaltern und Halterungen bestanden. Ein Zwei-Kammer-Gradientenmischgerät mit zwei Magnetrührern wurde zur Herstellung der Gele verwendet. Die hintere, vom Auslauf weiter entfernte Kammer wurde mit 14 ml 0%iger und die vordere mit 80%iger ( für den Exon 2-Bereich 100%iger) Gradientenlösung befüllt. Anschließend wurde in beide Kammern jeweils 16 µl TEMED und 40 µl 40%iges APS pipettiert und durch Einschalten des Magnetrührers gemischt. Nach Öffnung des Verbindungsventils und Aktivierung der Pumpe, konnte die Gieskammer über den Auslauf und den daran befestigten Schlauch gefüllt und abschließend ein Kamm in das noch flüssige Gel eingelegt werden. Da das gegossene Gel nach ca. 60 min erhärtet war, wurden die insgesamt zwanzig durch die Kämme gebildeten Geltaschen mit den PCR-Produkten inklusive des Stoppuffers beladen.

### c) Elektrophorese

Nach der Fixation von zwei beladenen Gelen an einem speziellen Einsatz konnte dieser in die mit 1 x TAE-Laufpuffer gefüllte und auf 63°C vorgeheizte Elektrophoresekammer gestellt werden. Bei einer konstanten Temperatur von 60 °C, die durch eine Umwälzpumpe gewährleistet wurde, betrug die Laufzeit 4 h bei einer angelegten Spannung von 150 V.

### d) Färben der Gele mit Ethidiumbromid

Die nach der Elektrophorese vorsichtig von den Glasplatten getrennten Gele wurden in eine Färbelösung (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer) gelegt und für ca. 15 min auf einen Schüttler gelegt. Anschließend konnten die mit UV-Licht bestrahlten und auf diese Weise sichtbar gemachten Banden im UV-Transluminator fotografiert werden.

## **3.3.6. DNA-Sequenzierung unter Verwendung von P<sup>33</sup>-markierten ddNTPs**

Mit einer Sequenzierung nach dem Prinzip des Kettenabbruchs durch Didesoxynukleotide nach Sanger [Sanger et al., 1977] ist es möglich die Basensequenz eines zuvor in der PCR amplifizierten DNA-Abschnitts zu ermitteln.

Der verwendete Ansatz enthält hierbei neben normalen Nukleotiden (dNTPs) zusätzlich basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs), denen die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom fehlt. Kommt es im Verlauf der DNA Synthese entlang einer einzelsträngigen Matrize durch die DNA-Polymerase zum Einbau eines ddNTPs in die wachsende DNA-Kette, kann an seinem 3'-Kohlenstoffatom keine Phosphodiesterbindung geknüpft werden, was zu einem Abbruch der DNA-Synthese führt. Die Konzentration der ddNTPs wird im Vergleich zu den dNTP entsprechend geringer gewählt, so dass es nur zu einem partiellen Kettenabbruch kommt. Es resultiert in der Folge eine große Zahl an Fragmenten unterschiedlicher Größe, deren 5'-Ende durch den Primer festgelegt wird, ihr 3'-Ende jedoch variabel und durch das jeweilige ddNTP abgeschlossen ist. Der Längenunterschied beträgt jeweils ein einziges Basenpaar. Die auf diese Weise entstandenen Fragmente lassen sich in einem denaturierenden PAA-Gel längenspezifisch auftrennen.



### 3.3.6.1. Aufreinigung der PCR-Produkte

Vor einer Sequenzierung ist es notwendig die überschüssigen Primer und Nukleotide aus dem PCR-Ansatz zu entfernen, um Störungen der Sequenzierreaktion zu vermeiden.

#### a) Shrimp Alkaline Phosphatase- (SAP) und Exonuklease I-Verdau:

Zu 2 µl PCR-Produkt wurden 0,5 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 2 U/µl) und 0,5 µl Exonuklease I (10 U/µl) pipettiert. Der Ansatz wurde auf 10 µl Gesamtvolumen mit aqua dest. aufgefüllt, bei 37 °C für 30 min inkubiert und 15 min lang auf 80°C erhitzt. Die Inkubation bei 37 °C bewirkt einen Verdau der Primerreste, während die Erhitzung auf 80°C zu einer Inaktivierung der Enzyme führt. Im Anschluss an den Verdau wurde der Ansatz in zwei Reaktionsgefäße geteilt und zur Sequenzierung in beide Richtungen eingesetzt.

#### b) DNA-Elution aus Agarosegelen:

Das Vorhandensein weiterer, unspezifischer Banden in einem Agarosegel nach erfolgter Elektrophorese erfordert eine Extraktion der gewünschten Bande, falls das PCR-Produkt für eine empfindliche Methode, wie z. B. eine Sequenzierung verwendet werden soll.

Hierzu wurde im Anschluss an die Gel-Elektrophorese die gewünschte Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Elution erfolgte mit einem speziellen Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen nach folgendem Protokoll:

<b>Zugabe folgender Reagenzien:</b>	<b>Durchführung:</b>
300 µl QX1-Puffer 10 µl QIAEX II (Glasmilch)	30 s vortexen, 10 min bei 50°C inkubieren und alle 2 min vortexen, 30 s bei 15000 U/min zentrifugieren
	Überstand verwerfen
500 µl QX1-Puffer	30 s vortexen, 30 s bei 15000 U/min zentrifugieren
	Überstand verwerfen
500 µl PE-Puffer	30 s vortexen, 30 s bei 15000 U/min zentrifugieren
	Überstand verwerfen
500 µl PE-Puffer	30 s vortexen, 30 s bei 15000 U/min zentrifugieren

	Überstand verwerfen, Pallet 10 min lufttrocknen lassen
20 µl aqua dest.	Pallet resuspendieren, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
	30 s bei 15000 U/min zentrifugieren, Überstand in steriles Cap überführen

Tab. 3: Elutionsprotokoll des QIAEX II Gel-Extraction-Kits von Qiagen

### 3.3.6.2. Reaktionsansatz

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen mit Hilfe von  $^{33}\text{P}$ -markierten ddNTPs wurde das Sequenzierkit der Firma Amersham mit folgenden Komponenten des Reaktionsansatzes verwendet:

5 µl	gereinigtes PCR-Produkt
1 µl	f- oder r-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	Reactionbuffer
2 µl	Thermo-Sequenase
10 µl	ddH <sub>2</sub> O

Tab. 4: Komponenten des Reaktionsansatzes einer  $^{33}\text{P}$ -Sequenzierung

Der in Tab. 4 dargestellte Ansatz wurde gründlich gemischt und auf vier mit A, C, G, T beschriftete Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden 2 µl Nukleotid-Mastermix und 0.5 µl eines der  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]$  ddNTPs in jedes der vier Reaktionsgefäße pipettiert und erneut gemischt. Um das Reaktionsprodukt auch bei einem nicht beheizbaren Deckel des Thermocyclers im unteren Bereich des Reaktionsgefäßes zu halten, sowie eine Kontamination beim späteren Öffnen der Reaktionsgefäße zu vermeiden, wurden die Ansätze mit einem Tropfen Paraffin überschichtet.

### 3.3.6.3. Reaktionsbedingungen

Die für die Cycle-Sequenzierung gewählten Reaktionsbedingungen entsprechen denen in der Tab. 2 unter Gliederungspunkt 3.3.2.2. dargestellten Bedingungen der zuvor

durchgeführten PCR mit Ausnahme der primerspezifischen Annealing-Temperaturen, die um 1°C gesenkt wurden.

#### **3.3.6.4. Denaturierende PAA-Gelelektrophorese der sequenzierten Produkte**

Zur hochauflösenden Auftrennung der in der Cycle-Sequenzierung entstandenen, radioaktiv markierten Fragmente wurde ein 6%iges, denaturierendes Polyacrylamid-(PAA-)Gel verwendet, das eine Erfassung von Größenunterschieden zwischen zwei Fragmenten von nur einer Base ermöglichte.

Zunächst wurden zwei Glasplatten mit 70%igem Ethanol entfettet und unter dem Abzug silikonisiert, um eine spätere vollständige Ablösung des Gels von den Glasplatten zu gewährleisten. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Glasplatten in der Weise aufeinandergelegt und mit Klammern fixiert, dass sie durch zwei 1 mm dicke Abstandshalter auseinandergehalten wurden. Anschließend wurden 60 ml SequaGel™-6-Fertiglösung mit 150 µl APS-Lösung gemischt und luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen. Zum Abschluss wurde ein auf einer Seite speziell gezackter Kamm mit seiner glatten Seite zwischen den Platten platziert und zur Polymerisation das Gel für 60 min unter dem Abzug belassen. Nach Entfernung des Kamms und Einspannung der Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur wurden deren Kammern mit 1 x TBE-Puffer befüllt und der Kamm mit der gezackten Seite vorsichtig in das Gel gedrückt. Zu den aufzutragenden Proben wurde das gleiche Volumen an PAA-Auftragspuffer pipettiert und diese nach einer fünfminütigen Denaturierung auf dem Heizblock auf Eis gestellt. Die Beladung der durch die Zähne des Kamms vorgegebenen Taschen erfolgte unter Einhaltung der korrekten Reihenfolge mit 6 µl jeder Probe. Die Dauer der Elektrophorese bei 2000 V, 75 W, 250 mA betrug je nach Länge der Fragmente zwischen 60 und 100 min. Anschließend wurden die Glasplatten getrennt, das Gel auf ein Whatman-Filterpapier überführt und zur Trocknung im Vakuum-Geltrockner bei 80°C für 60 min belassen. Der in einer Expositionskassette zusammen mit dem Gel über 1 bis 3 Tage (abhängig von der Strahlungsintensität) inkubierte Röntgenfilm wurde abschließend in einer speziellen Entwicklermaschine entwickelt, so dass die typischen Bandenmuster sichtbar wurden.

### 3.3.7. DNA-Sequenzierung unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Großteil der Sequenzierungen mit Hilfe des Quick Start Sequencing Kits und des automatischen Sequenzierungsgerätes CEQ der Firma Beckman Coulter durchgeführt.

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten hat durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter ddNTPs und spezieller Sequenziergeräte eine Automatisierung erfahren, in der alle vier Reaktionen in einem einzigen Ansatz stattfinden können. Das Prinzip dieser Methode unterscheidet sich nicht von dem im Gliederungspunkt 3.3.6. dargestellten. Lediglich die verwendeten ddNTPs waren durch den Einsatz von vier verschiedenen Fluorophoren markiert, so dass das von ihnen ausgehende Fluoreszenzmuster mit dem Sequenziergerät in einer einzigen Spur detektiert werden konnte.

#### 3.3.7.1. Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Fluoreszenz-Sequenzierung wurde die Aufreinigung der PCR-Produkte in gleicher Weise wie unter 3.3.6.1. beschrieben durchgeführt.

#### 3.3.7.2. Reaktionsansatz

5 µl	gereinigtes PCR-Produkt
2 µl	f- oder r-Primer (1,6 pmol/µl)
4 µl	DTCS Quick Start Mastermix
9 µl	ddH <sub>2</sub> O

Tab. 5: Komponenten der Sequenzierreaktion

Der in Tab. 5 dargestellte Ansatz wurde gründlich gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde das Cycle-Sequencing im Thermocycler mit den unter 3.3.7.3. aufgeführten Bedingungen gestartet.

### 3.3.7.3. Reaktionsbedingungen

first delay	96°C	1 min	30 Zyklen
Denaturierung	96°C	20 s	
Annealing	primerspezifisch	20 s	
Elongation	60°C	4 min	

Tab. 6: Bedingungen für die Cycle-Sequenzierung

### 3.3.7.4. Fällung der PCR-Produkte

Die folgende Tabelle beschreibt die Fällung der PCR-Produkte nach erfolgter Cycle-Sequenzierung:

Zugabe folgender Reagenzien:	Durchführung:
4 µl Stopplösung (1,5 mM NaOAc+50 mM EDTA), 1 µl Glykogen (20 mg/ml), 60 µl 100% iger Ethanol	kurz vortexen, 15 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugieren
	Überstand abnehmen
180 µl 70% iger Ethanol	5 min bei 15000 U/min zentrifugieren
	Überstand abnehmen, Pallet 10 min lufttrocknen lassen
40 µl Sample Loading Solution (SLS)	Pallet resuspendieren

Tab. 7: Protokoll der Ethanol-Präzipitation

### 3.3.7.5. Verarbeitung und EDV-unterstützte Auswertung der DNA-Fragmente

Die gefällten Proben wurden auf eine spezielle Mikrotiterplatte (CEQ-sample plate) übertragen und mit einem Tropfen Paraffin überschichtet. Vor der Beladung des Sequenziergerätes mit der Mikrotiterplatte wurden die Bezeichnungen der Proben in eine entsprechende Tabelle des CEQ-Programms eingegeben. Die Laufzeit wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße der aufzutrennenden Proben zwischen 60 und 100 min bei 4.2 V gewählt. Das Prinzip des Sequenziergerätes basierte hierbei darauf, daß während des Laufes die in die DNA eingebauten Fluorophore durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt wurden. Da die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Farbstoffe

sich in ihren Wellenlängen unterschieden, war eine Messung der von ihnen ausgehenden Signale möglich. Die während des Laufes ermittelten Sequenzdaten wurden in einer dem Sequenziergerät angeschlossenen EDV-Anlage verarbeitet und in einer Datenbank gespeichert, wobei die Sequenzen in Form fluorophorspezifischer und somit basenspezifischer Intensitätsprofile dargestellt wurden. Ein ebenfalls von der Firma Beckman Coulter zur Verfügung gestelltes Computerprogramm ermöglichte die abschließende Analyse der Rohdaten und Auswertung der DNA-Sequenzen.

## **4. Ergebnisse**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die DGGE als Screeningverfahren zur Mutationssuche beim vererbten C1-Inhibitor Mangel zu etablieren und die lokalisierten Mutationen durch Sequenzierung genau zu charakterisieren. Hierzu wurden insgesamt 58 Familien untersucht, innerhalb derer mindestens ein Mitglied entweder ein vorab diagnostisch gesichertes HAE (siehe Abschnitt 2.3.2.) aufwies, seine klinische Symptomatik auf ein mögliches Vorliegen dieser Erkrankung schließen lassen konnte oder ein Verdacht auf ein HAE aufgrund einer positiven Familienanamnese bestand. Auf die nach einer PCR, DGGE und abschließender Sequenzierung identifizierte Mutation wurden anschließend die übrigen Familienmitglieder durch Sequenzierung des entsprechenden Genabschnitts untersucht. Mit Hilfe der C1-Inhibitor-Gen-Analyse sollten die Voraussetzungen für weitergehende wissenschaftliche Untersuchungen im Hinblick auf die Kausalität der identifizierten Mutationen geschaffen werden. Hierdurch könnten Vorhersagen zur Korrelation von Mutationstyp und Lokalisation zum klinischen Verlauf des HAE bei Trägern des entsprechenden Gendefekts getroffen werden. Die Erstellung und ständige Erweiterung einer Datenbank, in der alle bisher identifizierten Mutationen mit den resultierenden Folgen erfasst sind, würde die Behandlungssicherheit und Möglichkeit der genetischen Beratung betroffener Familien steigern.

### **4.1. Etablierung der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) als Screeningverfahren zur Mutationssuche in einzelnen Abschnitten des C1-Inhibitor-Gens**

Für die zu untersuchenden Fragmente aus dem C1-INH Gen konnte nur zum Teil auf die im Labor bereits etablierten Bedingungen für die DGGE zurückgegriffen werden. Um eine zufriedenstellende Signalqualität zu erreichen, mussten zunächst verschiedene DGGE-Bedingungen ausgetestet werden, wobei die Parameter Temperatur, Laufzeit und Art des Gelgradienten für die einzelnen Fragmente variiert wurden. Einen wichtigen Einfluß auf die Qualität des Bandenmusters hatte die jeweils zuvor durchgeführte PCR, die für jedes Fragment einer Optimierung der PCR-Reaktions-

bedingungen bedurfte, um unspezifische Banden auszuschließen, welche die Darstellung und Auswertung der DGGE-Banden negativ beeinflusst hätten. Durch Variation der Anlagerungstemperatur der Primer während der PCR sowie der verwendeten Magnesiumchloridkonzentration im PCR-Puffer des Reaktionsansatzes wurden Bedingungen für jedes einzelne Exon identifiziert, welche eine optimale Bandendarstellung ermöglichten. In der Abb. 5 ist stellvertretend für alle den einzelnen DGGEs vorausgegangenen PCRs bzw. Sequenzierungen am Beispiel des Exon 7 eine invertierte Photographie eines Agarose-PCR-Gels als Resultat dieser Optimierungsarbeiten dargestellt:

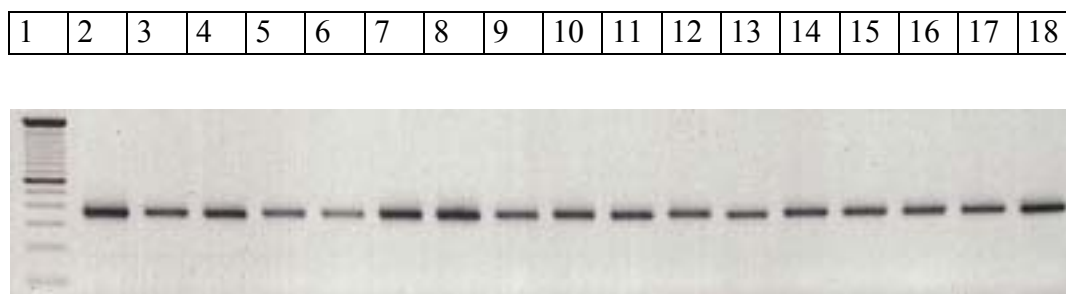


Abb. 5 : invertierte Photographie eines Agarose-PCR-Gels aus dem Exon 7-Bereich  
 Spur 1: 100 bp ladder, Spur 2-18: Proben nicht verwandter Patienten

Während in der auf die PCRs folgenden DGGEs für die zu untersuchenden Bereiche aus den Exons 1, 3.1, 3.2, 4, 5, 6, 7, 8 ein Gelgradient von 0%-80% verwendet werden konnte, musste für den Exon 2-Bereich ein Gradient von 0%-100% eingesetzt werden, um eine zufriedenstellende Bandendarstellung zu ermöglichen. Bei einer angelegten Spannung von 150 V betrug die Laufzeit 4 h. Zur Untersuchung der Schmelzeigenschaften der Fragmente im Gradientengel wurde mit Hilfe einer speziellen Software [MELT94-Software, L.S.Lerman, P.Sauer and C. Dresselhaus, 1993] für jedes Exon ein Schmelzdiagramm erstellt, das eine Vorhersagbarkeit der Signalqualität der Banden ermöglichte. In jedem Schmelzdiagramm konnte in Abhängigkeit von der Temperatur das Schmelzverhalten anhand des Kurvenverlaufs abgelesen werden. Die drei farblich markierten Kurven beschreiben jeweils den Anteil der aufgeschmolzenen DNA bei bestimmten Temperaturen (grau: 80%, blau: 20% und rot: Mittelwert aus beiden). Hierbei zeigte sich, dass Fragmente mit einem konstanten Temperaturprofil



einen günstigen Einfluss auf die Signalqualität und Sicherheit der optischen Erkennung aufwiesen, während mehrere Temperaturmaxima im Kurvenverlauf eines Fragments als Ausdruck mehrerer Schmelzdomänen zu einer Unschärfe der Banden im Gradientengel führten, so dass mögliche charakteristische Mutationsbandenmuster nur schwer oder nicht erkannt werden konnten. In den Exon 3.1- und Exon 8-Bereichen war aufgrund der ungünstigen Schmelzprofile dieser DNA-Fragmente trotz zahlreicher Optimierungsversuche eine Entfernung der aufgetretenen Bandenunschärfe nicht möglich. Beispielhaft für den Einfluß eines günstigen Schmelzprofils auf die Signalqualität in der DGGE ist in der folgenden Abbildung das Schmelzdiagramm des Exon 4 – Fragments dargestellt:

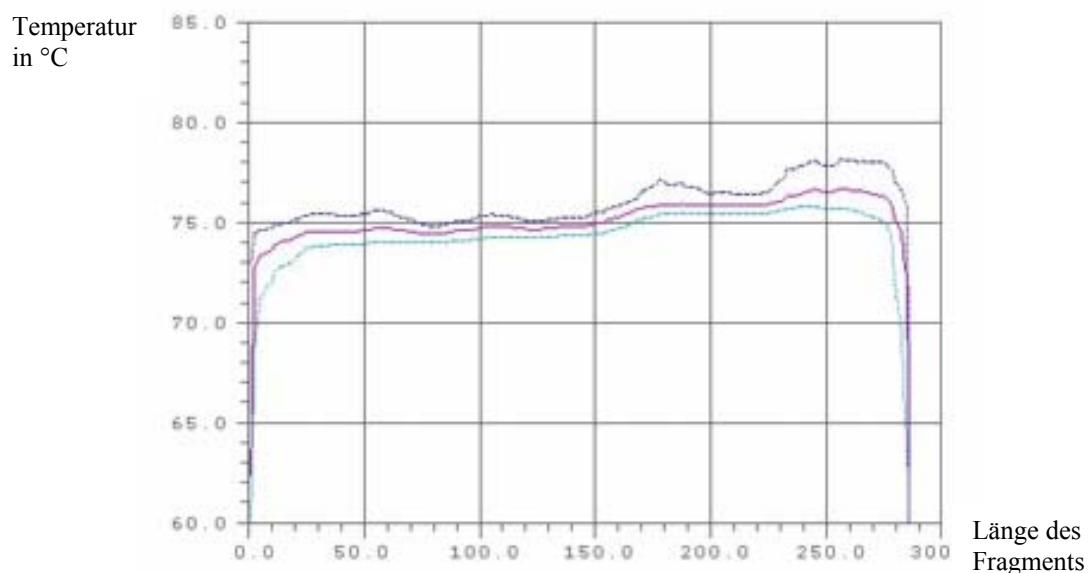


Abb.6: Schmelzdiagramm des Exon 4 – Fragmentes mit einer weitgehend einheitlichen Schmelzdomäne

Die Abb. 13 zeigt das Resultat in einer invertierten Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 4-Bereich des C1-INH Gens, wobei eine ausreichende Schärfe der Banden und klare Identifikation eines mutationsspezifischen Signalmusters in Spur 10 erkennbar ist.

Die Erklärung dafür, dass eine gewisse Unschärfe der Banden in den Exon 3.1- und Exon 8-Bereichen auch nach Optimierung verblieb, zeigt die folgende Darstellung der

unterschiedlichen, in mehrere Domänen aufgeteilten Schmelzeigenschaften dieser Fragmente:

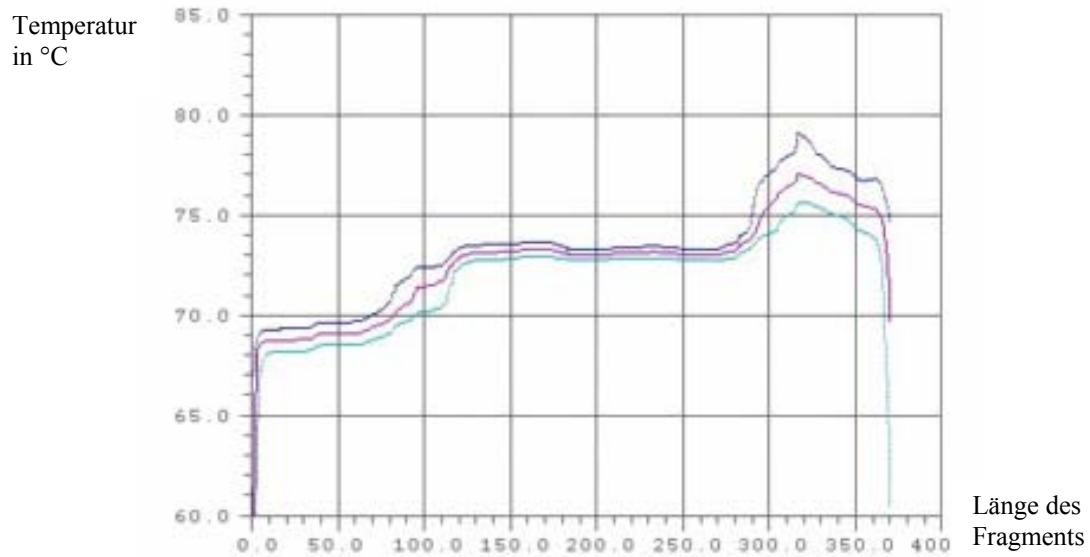


Abb. 7: Schmelzdiagramm des Exon 3.1 – Fragmentes mit mehreren Schmelzdomänen

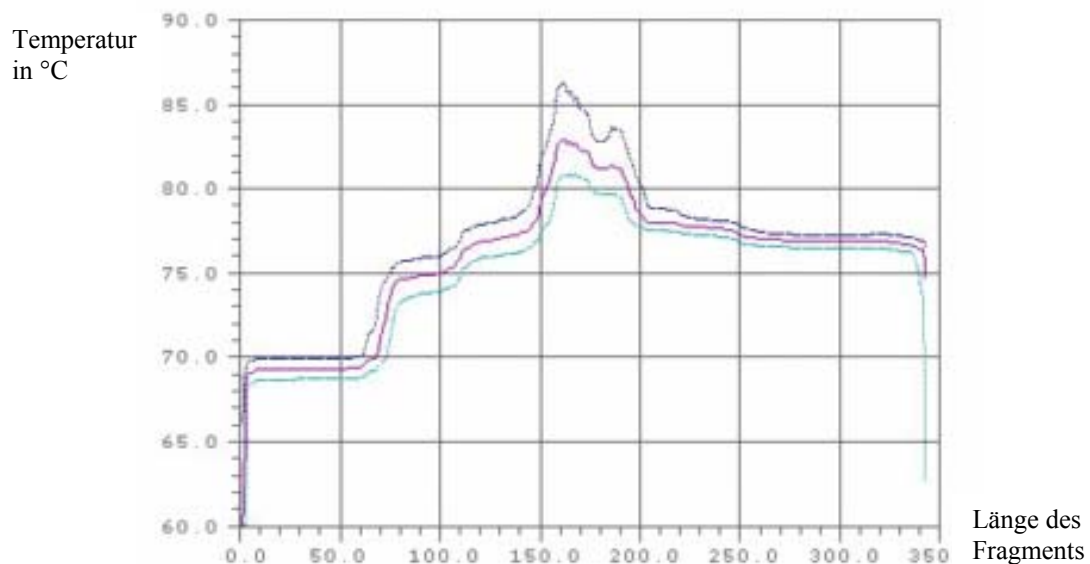


Abb. 8: Schmelzdiagramm des Exon 8 – Fragmentes mit zahlreichen voneinander sehr verschiedenen Schmelzdomänen

In beiden Diagrammen ist das Vorliegen mehrerer Schmelzdomänen, die ein konstantes Temperaturprofil dieser Fragmente verhindern, deutlich erkennbar. Dies führt während der DGGE zum Aufschmelzen der DNA an mehreren Stellen innerhalb einer Spur des Gradientengels. Die Auswirkung ist in Form einer Unschärfe der Banden in den Abb. 11 und 17 dargestellt, die eine sichere Erkennung charakteristischer Banden verhindert.

Die folgenden Abbildungen stellen alle untersuchten Exonbereiche des C1-INH-Gens dar, wobei die entdeckten charakteristischen Bandenmuster, die eine Mutation repräsentieren, als Kontrolle für weitere DGGE benutzt werden konnten:

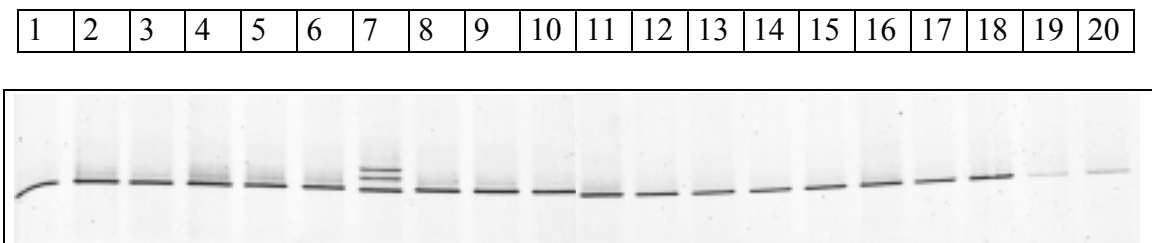


Abb. 9: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 1-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 7: Bandenmuster einer Mutation

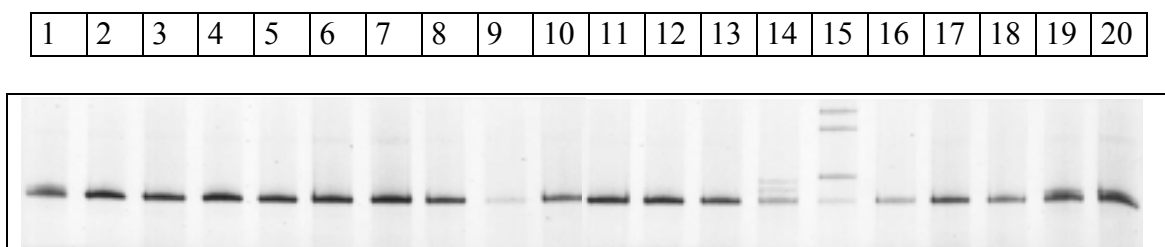


Abb. 10: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 2-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 14 und 15: Bandenmuster verschiedener Mutationen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

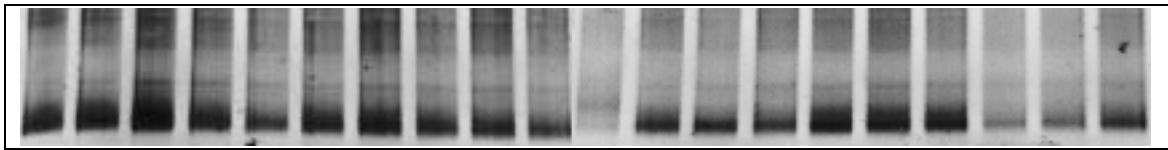


Abb. 11: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 3.1-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 11: Bandenmuster einer Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

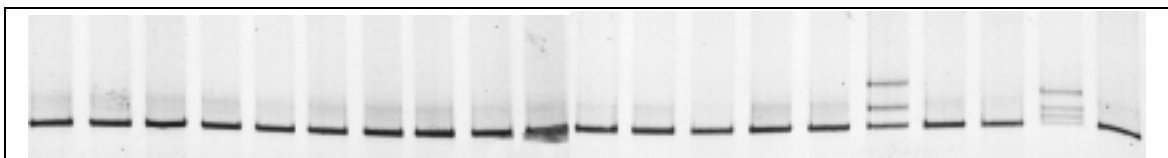


Abb. 12: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 3.2-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 16 und 19: Bandenmuster verschiedener Mutationen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

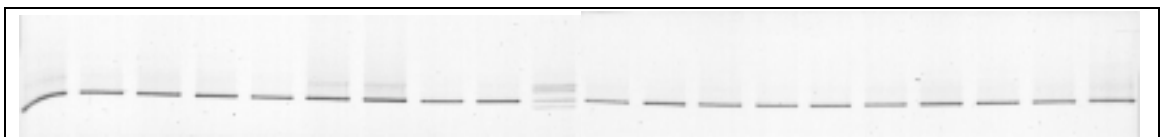


Abb. 13: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 4-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 10: Bandenmuster einer Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

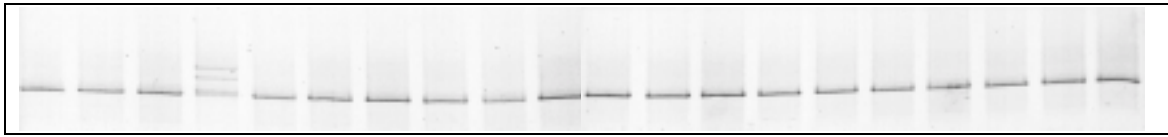


Abb. 14: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 5-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 4: Bandenmuster einer Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

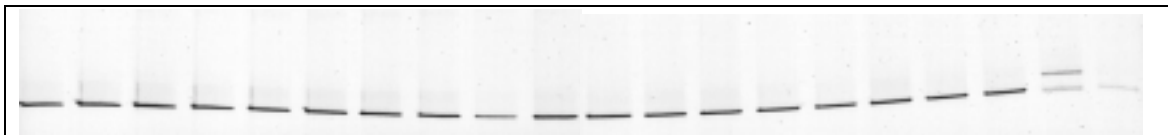


Abb. 15: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 6-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 19: Bandenmuster einer Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

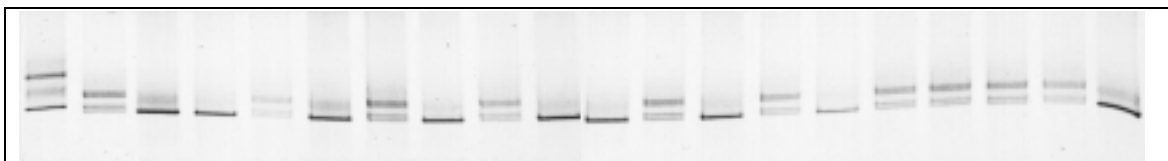


Abb. 16: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 7-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16-19: Bandenmuster eines bekannten Polymorphismus des C1-INH-Gens, Spur 1 : Bandenmuster einer Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

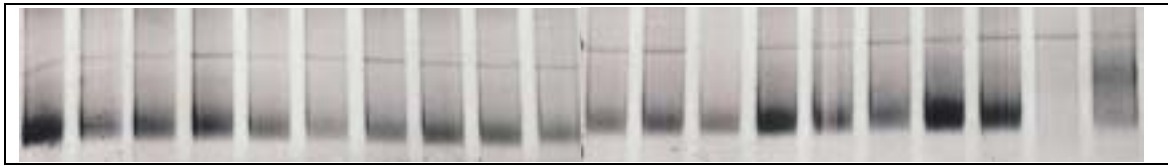


Abb. 17: Invertierte Photographie des DGGE-Gels mit Banden aus dem Exon 8-Bereich des C1-INH Gens: Spur 1-20: Proben nicht verwandter Patienten  
Spur 19 und 20: Bandenmuster verschiedener Mutationen

#### 4.2. Endgültige Charakterisierung der Mutationen durch Sequenzierung

Beispielhaft für eine Sequenzierung mit radioaktiv markierten ddNTPs zeigt die folgende Abb. 17 das Sequenzierradiogramm von zwei Mutationen aus dem Intron 3/Exon 4-Bereich:

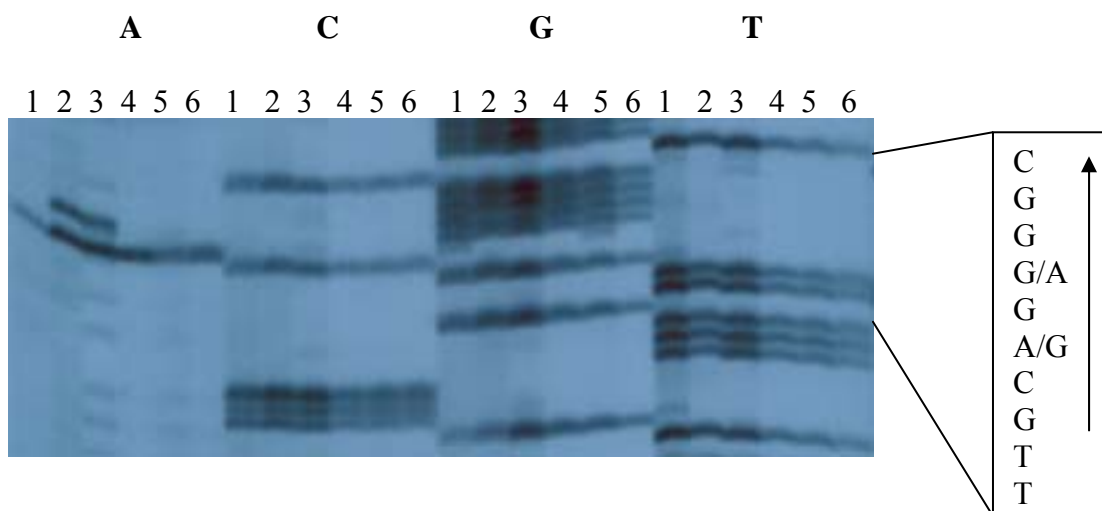


Abb. 18: Darstellung von zwei Mutationen im Intron 3/Exon 4 Bereich des C1-INH Gens:

1 u. 5: Position 4349 : A → G Spleiss-Defekt

2 u. 3: Position 4351 : G → A Missense-Mutation ( AS G152E )

4 u. 6: Gesunde Kontrollpatienten

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte der größte Teil der Sequenzierungen unter Verwendung fluoreszenzmarkierter ddNTPs und eines automatischen Sequenziergerätes der Firma Beckman Coulter durchgeführt werden. Abb. 19 und Abb. 20 zeigen stellvertretend für alle mit Hilfe dieser Methode identifizierten Mutationen Auswertungsdiagramme einer Missene-Mutation in Exon 8, die mit der CEQ Beckman Software erstellt wurden.

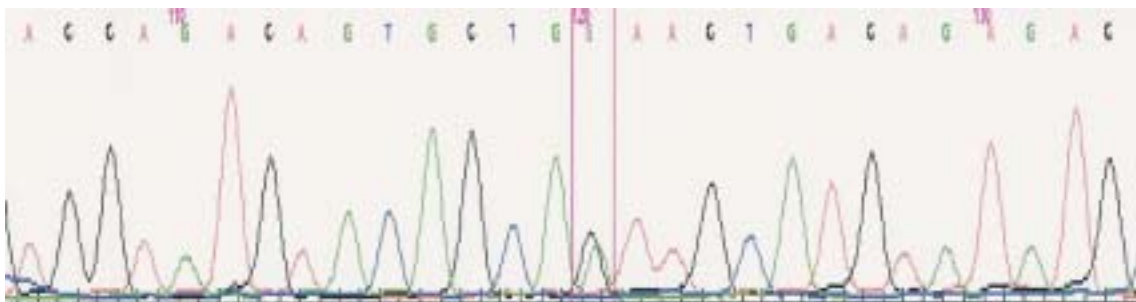


Abb. 19: Ausschnitt aus dem Exon 8 -Bereich (forward):  
Position 16734 G→C Missense-Mutation ( AS E426Q )

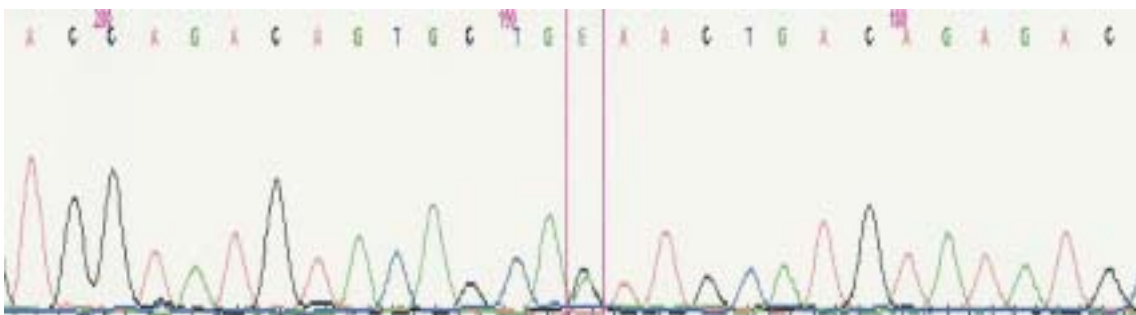


Abb. 20: Ausschnitt aus dem Exon 8-Bereich (reverse):  
Position 16734 G→C Missense-Mutation ( AS E426Q )

### 4.3. Darstellung der identifizierten Mutationen

Insgesamt 23 Mutationen bei Patienten mit HAE-Typ I wurden im untersuchten Patientenkollektiv identifiziert, von denen 19 bisher nicht publiziert waren:

<b>REGION</b>	<b>POSITION und MUTATION</b>	<b>EFFEKT</b>	<b>HAE TYP</b>	<b>Veröffentlichung</b>
<b>Promoter</b>	-40 C → G	Kausalität unbekannt	I	Verpy et al, 1996
<b>Intron 1</b>	564 G → A	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
<b>Exon 2</b>	587 A → G	M-22V Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 2</b>	591 C → T	A-21V Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 3</b>	2209 C → G	S -1 Stop Nonsense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 3</b>	2527-2528 Del CT	Frameshift → Stop (kl. Del)	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 3</b>	2544 G → T	E112Stop Nonsense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 3</b>	2646 G → C	A146P Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 3</b>	2677 T → C	L156P Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Intron 3</b>	2694 G → A	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
<b>Intron 3</b>	4349 A → G	Spleiss-Defekt	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 4</b>	4351 G → A	G162E Missense	I	Zuraw et al, 2000
<b>Intron 4</b>	4485 G → A	Spleiss-Defekt	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 5</b>	8522 C → G	L273V Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 7</b>	14034 G → A	G323R Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 7</b>	14098 Del G	Frameshift → Stop	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 7</b>	14188 T → C	L374P Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 7</b>	14217 Del A	Frameshift → Stop	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 7</b>	14221 Del A	Frameshift → Stop	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 7</b>	14251 G → A	Spleiss-Defekt	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 8</b>	16758-16760 Del GCG	Frameshift → Stop (kl. Del)	V.a. I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 8</b>	16674 T → C	C406R Missense	I	nicht veröffentlicht
<b>Exon 8</b>	16734 G → C	E426Q Missense	I	nicht veröffentlicht

Tab. 8: Identifizierte Mutationen im untersuchten Patientenkollektiv

Bei den bisher unbekanntem Mutationen handelt es sich um 9 Missense- und 2 Nonsense-Mutationen, 5 kleine Deletionen (1-3 bp) sowie 3 die Spleissstellen betreffenden Mutationen, aus denen z. T. mit hoher Wahrscheinlichkeit ihre Bedeutung für die Ausbildung eines HAE erklärbar ist. Die Lokalisationen der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Mutationen sind in der Abb. 21 dargestellt.



## Lokalisationen der identifizierten Mutationen im C1-Inhibitor Gen

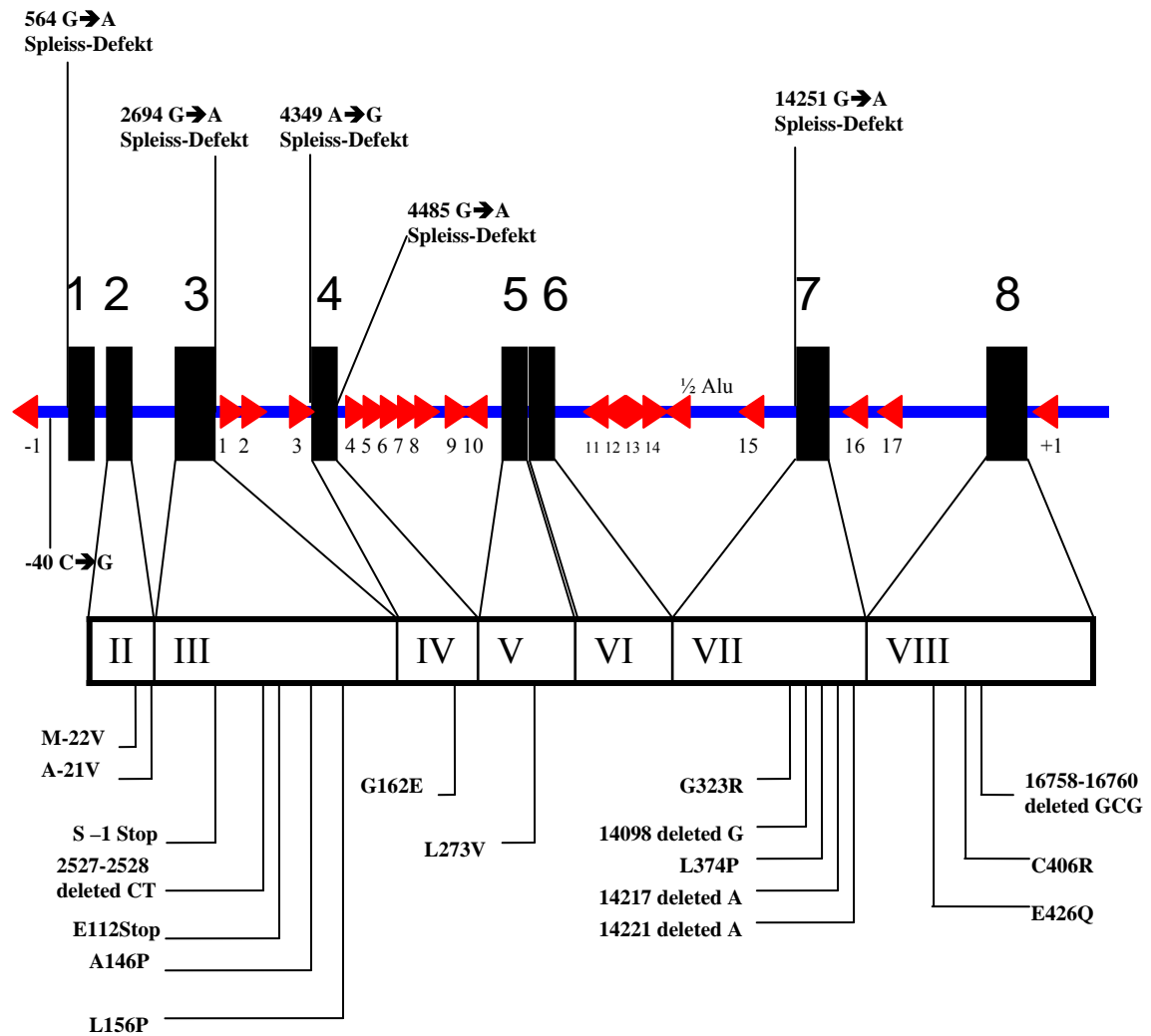


Abb. 21: Lokalisationen der identifizierten Mutationen im C1-Inhibitor Gen. Die codierenden Genabschnitte sind mit römischen Zahlensymbolen bezeichnet.

#### 4.4. Polymorphismen im C1-Inhibitor-Gen

Vier Polymorphismen, die im C1-INH-Gen beschrieben wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

<u>REGION</u>	<u>POSITION und MUTATION</u>	<u>EFFEKT</u>	<u>Veröffentlichung</u>
<b>Exon 2</b>	566 T→C	Polymorphismus	Pappalardo et al, 2000
<b>Intron 4</b>	4573 G→A	Polymorphismus	Verpy et al, 1996
<b>Intron 6</b>	14011 A→G	Polymorphismus	Verpy et al, 1996
<b>Exon 8</b>	16830 G→A	V458M Polymorphismus	Verpy et al, 1996

Tab. 9: bekannte Polymorphismen im C1-INH-Gen

Ihre Kenntnis ist wichtig, da sie ein charakteristisches Bandenmuster in der DGGE hervorrufen, das weitere Mutationen in diesem Bereich maskieren könnte. Die Häufigkeiten dieser Allele sowie die zur Untersuchung verwendeten Restriktionsenzyme werden in der Literatur folgendermaßen angegeben: 0.96/0.04 für 566 T/C Ava II<sup>+/-</sup>, 0.41/0.59 für 14011 A/G AvaIII<sup>+/-</sup>, 0.745/0.255 für 16830 G/A N1aIII<sup>+/-</sup> [Freiberger et al, 2002] und 0.69/0.31 für 4573 A/G Mnl1<sup>+/-</sup> [Verpy et al, 1996]. In der vorliegenden Arbeit wurde bei einem Individuum der Polymorphismus in Exon 2 und bei zwei Patienten der Polymorphismus in Exon 8 identifiziert. Beim Exon 2 Pos. 566 T→C –Austausch wird angenommen, dass dieser keinen Effekt auf das Transkript oder das Protein ausübt, solange dieser Defekt in heterozygoter Form vorliegt. Jedoch kann bisher nicht ausgeschlossen werden, dass bei Vorliegen einer homozygoten Form diese dennoch für die Ausbildung eines HAE von entscheidender Bedeutung sein kann [Freiberger et al., 2002].

#### 4.5. Beschreibung der diagnostischen Vorgehensweise bei einer Familie mit hereditärem Angioödem

Der in Abb. 26 dargestellte Stammbaum zeigt eine Familie, in deren Anamnese ein HAE-Typ I bei mehreren Mitgliedern diagnostiziert worden war. Die mit 1-6

bezeichneten Individuen, von denen Nr.1 bis Nr. 5 eine HAE-Symptomatik aufwiesen, wurden mittels DGGE und Sequenzierung untersucht, wobei eine Stopmutation in Codon 112 Glu(GAG)→Stop(TAG) (Position: 2544 G→T) festgestellt wurde (Indexpatienten). Dieser Kettenabbruch verhindert mit hoher Wahrscheinlichkeit eine vollständige Synthese des C1-INH-Proteins und passt zu dem klinischen Befund eines HAE Typ I. Von diagnostischer Bedeutung war hierbei der Ausschluss dieser Mutation bei Individuum Nr. 6, das bisher bezüglich einer HAE-Symptomatik unauffällig gewesen ist.

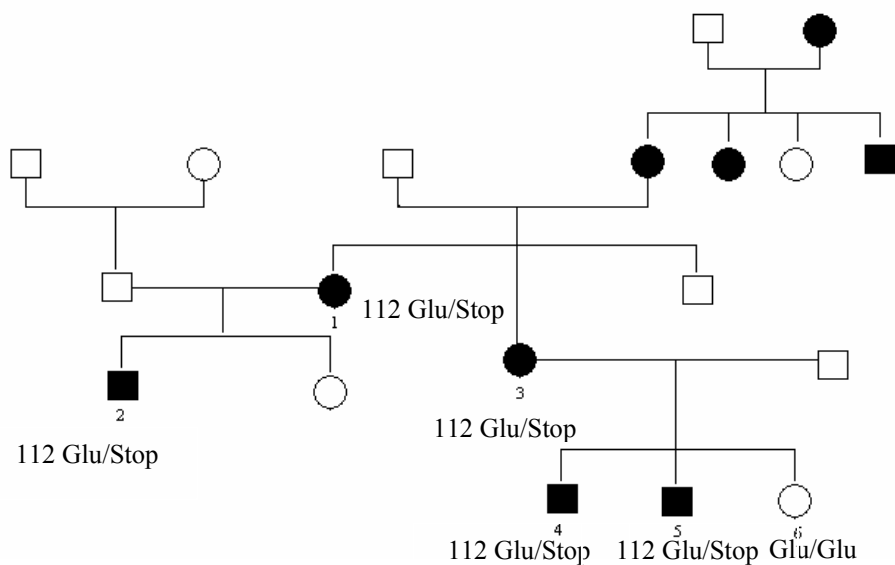


Abb. 22: Beispielstammbaum einer untersuchten Familie

Für Familienuntersuchungen ist die Angabe des Indexpatienten sowie die Bestimmung des HAE-Typs anhand laborchemischer Parameter und die Kenntnis der Familienanamnese mit der Zuordnung der Familienmitglieder zueinander von großer Bedeutung. Ausgehend vom Indexpatienten können anschließend auch potentielle, bisher noch nicht identifizierte Träger der HAE-Erkrankung mit Hilfe von Genanalysen detektiert werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Stellenwert der Mutationsdiagnostik beim hereditären Angioödem**

Mutationen im C1-INH-Gen manifestieren sich in Form autosomal dominant vererbter Angioödeme, wobei zwei Typen unterschieden werden. Während der HAE-Typ I mit einer Häufigkeit von 85% auftritt und durch erniedrigte C1-INH-Plasmaspiegel mit daraus resultierender niedriger Aktivität gekennzeichnet ist, liegt beim HAE-Typ II ein in seiner inhibitorischen Funktion eingeschränktes neben dem intakten Protein vor. Hierbei liegt eine im Normbereich liegende Plasmakonzentration des C1-Inhibitors bei stark eingeschränkter Aktivität vor. Beide Typen unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer klinischen Symptomatik und können zur Ausbildung eines lebensbedrohlichen Larynxödems führen [Bork et al., 1997]. Typischerweise handelt es sich bei den Mutationen, die den HAE-Typ II verursachen, um Missense-Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums oder innerhalb der sogenannten proximalen „hinge“-Region des C1-INH-Proteins. Diese sind an der korrekten Faltung des Proteins und Präsentation des aktiven Zentrums beteiligt. Auf diese Weise können die in dieser Region liegenden Mutationen zur Beeinflussung der strukturellen Integrität des Proteins oder zu einer Störung der Erkennung der zu inhibierenden Proteasen führen. In der Literatur finden sich Berichte über Spleissstellen-, Missense- und Nonsense-Mutationen sowie über kleine Deletionen und Insertionen, welche in der Ausbildung des HAE-Phänotyps I resultieren, sofern die Lokalisation von Missense-Mutationen nicht im Bereich der reaktiven Zentrums und der angrenzenden proximalen „hinge“-Region des Proteins liegen. Große Deletionen und Duplikationen, deren Häufigkeit bei etwa 15% aller Mutationen liegt, wurden ebenfalls beschrieben. Ihr Auftreten ist häufig an die im Gen über die Intronabschnitte verteilten repetitiven Sequenzen aus der Alu-Familie geknüpft. [Bowen et al. 2001]. Die molekulargenetische Diagnostik einer Mutation bei einem Individuum, das am HAE erkrankt ist, könnte durch eine Untersuchung der übrigen Familienmitglieder weitere Betroffene identifizieren, bei denen noch keine Manifestation der Erkrankung stattgefunden hat. Auf diese Weise würden Komplikationen durch rechtzeitige Aufklärung und Prophylaxe in vielen Fällen vermieden.

## **5.2. Beurteilung der DGGE als Screeningverfahren zur Mutationssuche im C1-Inhibitor-Gen**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 58 Familien untersucht, innerhalb derer mindestens ein Mitglied entweder ein vorab diagnostisch gesichertes HAE (siehe Abschnitt 2.3.2.) aufwies oder seine klinische Symptomatik auf ein mögliches Vorliegen dieser Erkrankung schließen lassen konnte. Mit Hilfe der DGGE wurden für jeden Patienten alle Exons des C1-INH-Gens unter Verwendung der entsprechenden Primer (siehe Abschnitt 3.2.7.) untersucht. Zunächst lieferte das Screening der 58 miteinander nicht verwandten Individuen insgesamt 57 über alle Exons verteilte, auffällige Bandenmuster, wobei einige Patienten in mehr als nur einem Exon dieses Bandenmuster aufwiesen. Bei 15 Patienten wurde in keinem Exon eine Auffälligkeit beobachtet. Die 57 verdächtigen Signalmuster verteilten sich auf 43 Patienten. Durch die anschließende Sequenzierung stellte sich jedoch heraus, dass 31 dieser Signale einen bereits bekannten Polymorphismus im Intron 6/Exon7-Bereich darstellten. Des Weiteren wurde bei einem Individuum ein Polymorphismus in Exon 2 und bei zwei Patienten ein Polymorphismus in Exon 8 identifiziert, so dass insgesamt noch 23 Bandenmuster einer Mutation zugeordnet werden konnten. Durch die Tatsache, dass der Exon 3.1- und der Exon 8-Bereich, wie bereits oben erwähnt, aufgrund ihres Schmelzverhaltens nicht vollständig von einer gewissen Unschärfe der Banden im Gradientengel befreit werden konnten, muß berücksichtigt werden, dass einige auffällige Bandenmuster einer Erkennung entgehen könnten. Hier kann eine Sequenzierung dieser Abschnitte Aufschlüsse über das Vorliegen einer Mutation liefern. Zudem ist die DGGE nicht zur Detektion großer Deletionen oder Duplikationen im C1-INH-Gen geeignet, da in der ihr vorausgehenden PCR nur das gesunde Allel amplifiziert wird, so dass das deletierte Allel einer weiteren Untersuchung entgeht [Myers et al, 1987]. Folglich wird die Sensitivität der DGGE einerseits durch die beschriebenen technischen Probleme, andererseits bei Annahme einer durchschnittlichen 15-20%igen Vorkommenshäufigkeit großer Deletionen [Bowen et al., 2001] deutlich gemindert. Dies beeinträchtigt die Diagnose- und Behandlungssicherheit betroffener Individuen und erfordert den Einsatz weiterer genetischer Untersuchungsmethoden. Einer Arbeitsgruppe um Freiburger [Freiburger et al., 2002] ist es in der Zwischenzeit

gelingen, durch eine andere Primerwahl für die Exon 3.1- und Exon 8-Bereiche des C1-INH-Gens sowie durch Optimierung der Reaktionsbedingungen eine signifikante Verbesserung der Signalqualität für diese Abschnitte in der DGGE zu erreichen. Folglich stellt die DGGE eine effiziente Methode zum Mutationsscreening von Punktmutationen, kleinen Deletionen und Insertionen im C1-INH-Gen sowie eine Alternative zu den bisher in diesem Zusammenhang verwendeten Methoden wie SSCP (single strand conformational polymorphism) oder FAMA (fluorescence assisted mismatch analysis) dar [Freiberger et al, 2002]. Um jedoch große Deletionen oder Duplikationen, die mehrere hundert bis einige tausend Basenpaare betragen können, im C1-INH-Gen detektieren zu können, bedarf es anderer Methoden wie z.B. Southernblot-Analysen, fluorescent multiplex PCR, quantitativer PCR-Methoden oder mRNA-Analysen, deren erfolgreicher Einsatz in der Literatur bereits ausführlich beschrieben wurde [Verpy et al, 1996, Duponchel et al, 2001]. Wie oben angeführt, können sich charakteristische Bandenmuster in der DGGE, hinter denen eine kausale Mutation vermutet wird, in der nachfolgenden Sequenzierung als Polymorphismen herausstellen. Durch Variation der Primerauswahl ist es jedoch möglich diese Bereiche auszuschließen, um auf diesem Weg mögliche Maskierungsphänomene tatsächlicher, exonisch liegender Mutationen zu vermeiden. Dies erscheint wichtig, da ansonsten ein zusätzlicher Aufwand im Sinne einer in jedem Fall durchzuführenden Sequenzierung betrieben werden muss, um eine mögliche Mutationsmaskierung zu erkennen. Zugleich birgt diese Vorgehensweise jedoch die Gefahr, dass polymorphismusnah gelegene Mutationen einer Detektion entgehen können, weil diese gar nicht erst im zu untersuchenden PCR-Amplifikat erscheinen.

### **5.3. Ergebnisse bisheriger Studien**

Eine von Bowen [Bowen et al, 2001] durchgeführte Literaturrecherche unter Einbeziehung von vier neuen in der gleichen Studie identifizierten Mutationen ergab insgesamt 97 Mutationen im C1-INH-Gen, die zur Ausbildung eines HAE führen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zusammenstellung unter Verwendung aktueller oder bisher nicht berücksichtigter Literatur nochmals erweitert, so dass in den folgenden Tabellen eine nahezu vollständige Mutationsdatenbank für das C1-INH-Gen geordnet

nach Mutationstypen präsentiert werden kann, welche insgesamt 110 Mutationen umfasst.

Die Nummerierung der einzelnen Nukleotidpositionen entspricht der von Carter [Carter et al, 1990] bereits verwendeten, während die Aminosäuren und die ihnen entsprechenden Codons nach dem Vorschlag von Bock [Bock et al, 1986] nummeriert sind. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurden die allgemein gültigen Buchstabensymbole verwendet [Stryer, 1996].

<b>Mutations-typ</b>	<b>Lokalisation und Mutation</b>	<b>Effekt</b>	<b>HAE TYP</b>	<b>Publikation</b>
Missense	<b>Exon 3</b> 2589 T → G	F127V	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 3</b> 2608 A → G	H133R	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 3</b> 2650 T → C	F147S	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 3</b> 2652 T → C	S148P	I	Pappalardo et al, 2000
Missense	<b>Exon 3</b> 2656 C → T	P149L	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 3</b> 2674 T → C	L155P	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 3</b> 2694 G → A	Splice oder G162R	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 4</b> 4351 G → A	G162E	I	Zuraw et al, 2000
Missense	<b>Exon 4</b> 4371 A → G	T169P	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 4</b> 4414 G → A	C183Y	I	Zuraw et al, 2000
Missense	<b>Exon 4</b> 4453 T → A	V196D	I	Zuraw et al, 2000
Missense	<b>Exon 5</b> 8346 T → C	F214S	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 5</b> 8377 C → A	S224R	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 5</b> 8459 A → G	I252V	I	Zuraw et al, 2000
Missense	<b>Exon 5</b> 8517 T → C	I271T	I	Pappalardo et al, 2000
Missense	<b>Exon 6</b> 8735 C → A	T279K	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 6</b> 8735 C → T	T279I	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 6</b> 8741 T → G	F281C	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 6</b> 8770 T → C	F291L	I	Siddique et al, 1995
Missense	<b>Exon 6</b> 8807 T → C	M303T	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 7</b> 14181 A → T	T372P	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 7</b> 14196 C → T	P377S	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 7</b> 14196 C → G	P377A	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 7</b> 14206 A → T	K380I	II	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 8</b> 16720 A → G	H421R	I	Zuraw et al, 2000
Missense	<b>Exon 8</b> 16753 T → A	V432E	II	Frangi et al, 1993
Missense	<b>Exon 8</b> 16759 C → A	A434E	II	Frangi et al, 1991,
Missense	<b>Exon 8</b> 16764 G → A	A436T	II	Aulak et al, 1990
Missense	<b>Exon 8</b> 16765 C → T	A436V	II	Siddique et al, 1995
Missense	<b>Exon 8</b> 16774 C → T	A439V	I	Bissler et al, 1997
Missense	<b>Exon 8</b> 16788 C → T	R444C	II	Ariga et al, 1989
Missense	<b>Exon 8</b> 16788 C → A	R444S	II	McPhaden et al, 1991
Missense	<b>Exon 8</b> 16789 G → A	R444H	II	Ariga et al, 1989
Missense	<b>Exon 8</b> 16789 G → T	R444L	II	Siddique et al, 1992
Missense	<b>Exon 8</b> 16791 A → C	T445P	II	Ocejo-Vinyals et al,
Missense	<b>Exon 8</b> 16809 G → A	V451M	I	Verpy et al, 1996

Missense	<b>Exon 8</b> 16812 C → G	Q452E	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 8</b> 16822 T → C	F455S	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 8</b> 16827 T → C	F457L	I	Bowen et al, 2001
Missense	<b>Exon 8</b> 16834 T → C	L459P	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 8</b> 16834 T → G	L459R	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 8</b> 16858 C → T	P467R	I	Verpy et al, 1996
Missense	<b>Exon 8</b> 16867 T → A	M470K	I	Bowen et al, 2001
Missense	<b>Exon 8</b> 16884 C → T	P476S	I	Verpy et al, 1996

Tab.10: Missense-Mutationen im C1-Inhibitor Gen

Mutations -typ	Lokalisation und Mutation	Effekt	HAE TYP	Publikation
Nonsense	<b>Exon 3</b> 2490 C → T	Q94STOP	I	Pappalardo et al, 2000
Nonsense	<b>Exon 6</b> 8823 C → G	Y308 STOP	I	Verpy et al, 1996
Nonsense	<b>Exon 7</b> 14037 C → T	Q324STOP	I	Verpy et al, 1996
Nonsense	<b>Exon 7</b> 14082 C → T	Q339STOP	I	Ono et al, 1996
Nonsense	<b>Exon 7</b> 14103 G → T	E346STOP	I	Bissler et al, 1997
Nonsense	<b>Exon 7</b> 14233 C → A	S389STOP	I	Pappalardo et al, 2000
Nonsense	<b>Exon 8</b> 16842 C → T	Q462STOP	I	Ariga et al, 1993
Nonsense	<b>Exon 8</b> 16872 C → T	R472STOP	I	Verpy et al, 1996

Tab.11: Nonsense-Mutationen im C1-Inhibitor Gen

Mutations -typ	Lokalisation und Mutation	Effekt	HAE TYP	Publikation
Splice-Site	<b>Intron 1</b> 564 G → A	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
Splice-Site	<b>Intron 2</b> 642 G → A	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
Splice-Site	<b>Exon 3</b> 2694 G → A	Spleiss-Defekt oder G162R	I	Verpy et al, 1996
Splice-Site	<b>Intron 5</b> 8721 A → G	Spleiss-Defekt	I	Bowen et al, 2001
Splice-Site	<b>Intron 6</b> 8863 G → T	Spleiss-Defekt	I	Frangi et al, 1991
Splice-Site	<b>Intron 6</b> 14030 G → C	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
Splice-Site	<b>Intron 6</b> 14019-14047 29 bp deleted	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
Splice-Site	<b>Intron 6</b> 14029 AGGT → GCA	Spleiss-Defekt	I	Verpy et al, 1996
Splice-Site	<b>Intron 7</b> 14252 T → A	Spleiss-Defekt	I	Kawachi et al, 1998

Tab.12: Mutationen der Spleissstellen im C1-Inhibitor Gen

Mutations -typ	Lokalisation	Effekt	HAE TYP	Publikation
Kl. Del/Ins	<b>Exon 2</b> 589-596 8 bp duplicated	Frameshift → STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 2</b> 602-603 inserted GA	Frameshift → STOP	I	Zuraw et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 3</b> 2250-2251 deleted AG	Frameshift → STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 3</b> 2264-2265 deleted AG	Frameshift → STOP	I	Freiberger et al, 2002
Kl. Del/Ins	<b>Exon 3</b> 2304 deleted C	Frameshift → STOP	I	Freiberger et al, 2002



Kl. Del/Ins	<b>Exon 3</b> 2467 inserted A	Frameshift → STOP	I	Bowen et al, 2001
Kl. Del/Ins	<b>Exon 3</b> 2679-2680 inserted TT	Frameshift → STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 4</b> 4371 deleted A	Frameshift → STOP	I	Zuraw et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 4</b> 4372-4373 inserted A	Frameshift →STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 4</b> 4395 deleted T	Frameshift → STOP	I	Bissler et al, 1997
Kl. Del/Ins	<b>Exon 4</b> 4400 deleted C	Frameshift → STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 4</b> 4428 deleted C	Frameshift → STOP	I	Zuraw et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 4</b> 4460-4461 inserted A	Frameshift → STOP	I	Zuraw et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8370 deleted AC→T	L221 STOP	I	Pappalardo et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8383 deleted C	Frameshift →STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8390 deleted C	Frameshift →STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8448-8449 inserted AACAC	Frameshift →STOP	I	Bissler et al, 1997
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8453-8455 deleted CAA	N250 deleted	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8456-8458 deleted AAG	K251 deleted	II	Skriver et al, 1989
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8457-8459 deleted AGA	K251 deleted	II	Bissler et al, 1994
Kl. Del/Ins	<b>Exon 5</b> 8493 →8494 deleted CC	Frameshift →STOP	I	Freiberger et al, 2002
Kl. Del/Ins	<b>Exon 6</b> 8737 deleted ACA	T280 deleted	I	Pappalardo et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 6</b> 8779-8784 6 bp deleted	K294, N295 deleted	I	Bissler et al, 1997
Kl. Del/Ins	<b>Exon 6</b> 8814-8815 deleted CA	Frameshift →STOP	I	Verpy et al, 1996
Kl. Del/Ins	<b>Exon 7</b> 14070 deleted A	V334STOP	I	Pappalardo et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16655 deleted T	Frameshift → STOP	I	Levy et al, 1990
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16661-16662 inserted A	Y401STOP	I	Levy et al, 1990
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16676-16677 deleted CC	Frameshift → STOP	I	Freiberger et al, 2002
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16698 deleted C	Frameshift → STOP	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16708 deleted C	V416 STOP	I	Pappalardo et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16735 deleted AAC→T	L425STOP	I	Pappalardo et al, 2000
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16749-16750 inserted TGT	G431V & inserted W432	II	Siddique et al, 1993
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16752-16785 34 bp deleted	Frameshift → STOP	I	Bissler et al, 1994
Kl. Del/Ins	<b>Exon 8</b> 16771-16790 20bp duplicated	Frameshift → STOP	I	Bissler et al, 1994

Tab.13: Kleine Deletionen und Insertionen im C1-Inhibitor Gen

<b>Mutations-typ</b>	<b>Lokalisation und Mutation</b>	<b>Effekt</b>	<b>HAE TYP</b>	<b>Publikation</b>
<b>Promotor</b>	-103 C → T	Kausalität unbekannt	I	Verpy et al, 1996
<b>Promotor</b>	-40 C → G	Kausalität unbekannt	I	Verpy et al, 1996

Tab.14: Bekannte Mutationen im Promotor-Bereich des C1-Inhibitor Gens

<u><b>REGION</b></u>	<u><b>Mutation</b></u>	<u><b>HAE-TYP</b></u>	<u><b>Veröffentlichung</b></u>
<b>Exons 1-3</b>	4 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991
<b>Exons 1-3</b>	9 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991
<b>Exon 4</b>	2.6 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1990
<b>Exon 4</b>	3.2 kb duplicated	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1990
<b>Exon 4</b>	3.2 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1990
<b>Exon 4</b>	2.6 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991
<b>Exon 4</b>	2.6 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991
<b>Exon 4</b>	2.75 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991
<b>Exons 4-6</b>	8.5 kb deleted	I	Ariga et al, 1990
<b>Exons 5-8</b>	17 kb deleted	I	Ariga et al, 1993
<b>Exon 7</b>	1.7 kb deleted	I	Ariga et al, 1989
<b>Exon 7</b>	1.7 kb deleted	I	McPhaden et al, 1991
<b>Exon 8</b>	3.5 kb deleted	I	Stoppa-Lyonnet et al, 1991

Tab. 15: Große Deletionen im C1-INH-Gen

Im dargestellten Mutationsregister fällt auf, dass Punktmutationen vom Missense-Typ die häufigste Mutationsform im C1-INH-Gen repräsentieren. Hierbei scheint Exon 8 einen „hot spot“ für diese Missense-Mutationen darzustellen. Die Erklärung dafür liegt in der hohen Mutabilität des Basentriplets CGC, welches für das aktive Zentrum (Arginin Nr. 444) des C1-INH-Proteins kodiert, sowie der angrenzenden proximalen „hinge“-Region, die von großer Bedeutung für die korrekte Faltung des Proteins ist. Missense-Mutationen in diesem Bereich führen zu einer Störung der Faltungsvorgänge und Präsentation des aktiven Zentrums des Proteins. Typischerweise resultiert daraus

der HAE-Phänotyp II mit niedriger C1-INH-Aktivität bei normaler Proteinkonzentration. Liegen die Missense-Mutationen hingegen in der distalen „hinge“-Region stromabwärts des reaktiven Zentrums, führt dies häufig zur Ausbildung eines HAE-Typs I, da dieser Bereich eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen des Gens und bei der Sekretion des Proteins spielt. Ebenfalls häufige Mutationstypen im C1-INH-Gen sind kleine Deletionen und Insertionen, die aufgrund der Verschiebung des Leserasters fast immer zur Ausbildung vorzeitiger Stop-Codons führen. Sie resultieren in der Ausbildung eines HAE-Typs I in der gleichen Weise wie Punktmutationen vom Nonsense-Typ, die direkt ein Stopcodon generieren und einen Abbruch der Proteinsynthese zur Folge haben [Bowen et al. 2001]. Ausnahmen stellen nur Deletionen oder Insertionen dar, die im korrekten Leseraster zum Verlust oder zu einer Zunahme eines kodierenden Basentriplets führen. Hierdurch wird das Protein um eine Aminosäure verkürzt oder verlängert, was jedoch weitreichende Folgen für die Funktion und Sekretion haben kann. Durch Deletion des für Lysin an Position 251 kodierenden Basentriplets beispielsweise wird eine neue Glykosylierungsstelle generiert, durch die die Sekundärstruktur des Proteins in diesem Bereich zerstört wird. Funktionelle Untersuchungen dieses mutierten Proteins haben ergeben, dass es weder Komplexe mit dem Substrat C1s bilden noch von diesem gespalten werden kann. Die Funktionseinschränkung bei gleichzeitiger Sekretion dieses Proteins führt zur Ausbildung eines HAE-Typs II. Hierdurch wird deutlich, dass auch Mutationen, die weit von den für das reaktive Zentrum codierenden Regionen entfernt vorliegen, in einem HAE-Phänotyp II resultieren können [Davis et al., 1993].

Mutationen, die direkt die Spleissstellen des C1-INH-Gens betreffen oder durch die neue Spleissstellen generiert werden, machen ca. 10% aller Mutationen im C1-INH-Gen aus. Dabei werden meist durch Punktmutationen in diesen Abschnitten die Spleissstellen inaktiviert, so dass es zu einer fehlerhaften Prozessierung der m-RNA und in der Folge zu einer Störung der Translation kommt. Dieser Mutationstyp ist mit dem HAE-Phänotyp I assoziiert. Zwei bisher identifizierte Mutationen liegen im Promotorbereich des C1-INH-Gens. Die Träger dieses Defekts weisen eine klinische Symptomatik sowie eine Konstellation der laborchemischen Parameter auf, die dem HAE Typ I entspricht. Die genaue Kausalität dieser Mutationen konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, obwohl diese Mutationen im Bereich vermuteter sog.

CAAT-Boxes in der 5'-Region des Gens liegen. Auffällig bei der Promotor-Mutation – 103 C→T ist jedoch die Tatsache, dass heterozygote Träger keine klinische Symptomatik und im Normbereich liegende Laborparameter aufweisen, während ein bisher identifizierter Patient aus der gleichen Familie homozygot bezüglich dieses Defekts ist, keine weitere Mutation in anderen C1-INH-Gen Abschnitten besitzt, klinisch und laborchemisch jedoch einen HAE-Typ I aufweist [Verpy et al., 1996]. Weitere Untersuchungen der Genabschnitte, die an der Regulation der Expression des Gens beteiligt sind, könnten Aufschlüsse über die Kausalität dieser Mutationen liefern. Die mit einer ca. 15-20%-igen Häufigkeit auftretenden grossen Deletionen sind an repetitive Sequenzen vom „Alu“-Typ geknüpft, die besonders zahlreich in den Intronbereichen um das Exon 4 gruppiert vorliegen. Das Exon 4 scheint hierbei ein „hot spot“ für diesen Mutationstyp zu sein, da von den bisher bekannten 13 großen Deletionen 7 dieses Exon mit den angrenzenden Intronabschnitten betreffen. Alle bisher identifizierten großen Deletionen führen zu einem HAE-Typ I [Bowen et al., 2001]. In Abb. 23 sind schematisch die Lokalisationen dieser Deletionen im C1-INH Gen dargestellt.

Bei der Beurteilung der Kausalität der bisher bekannten Mutationen muss berücksichtigt werden, dass die betroffenen Individuen gleichzeitig mehrere Mutationen aufweisen können, die erst im gemeinsamen Zusammenwirken eine HAE-Manifestation bedingen können oder jede Mutation für sich allein bereits pathogen sein kann. Dies erschwert die Kausalitätsfindung der Einzelmutation und kann unter Umständen trotz Ausschöpfung aller bisher zur Verfügung stehender Methoden misslingen. Denkbar wäre ebenfalls eine bisher nicht bekannte Rolle der bisher identifizierten oder noch nicht identifizierten Polymorphismen bei Modifikationsvorgängen des Phänotyps beispielsweise hinsichtlich der Triggerung von akuten Schüben der HAE-Erkrankung.

## Verteilung der großen Deletionen im C1-Inhibitor Gen

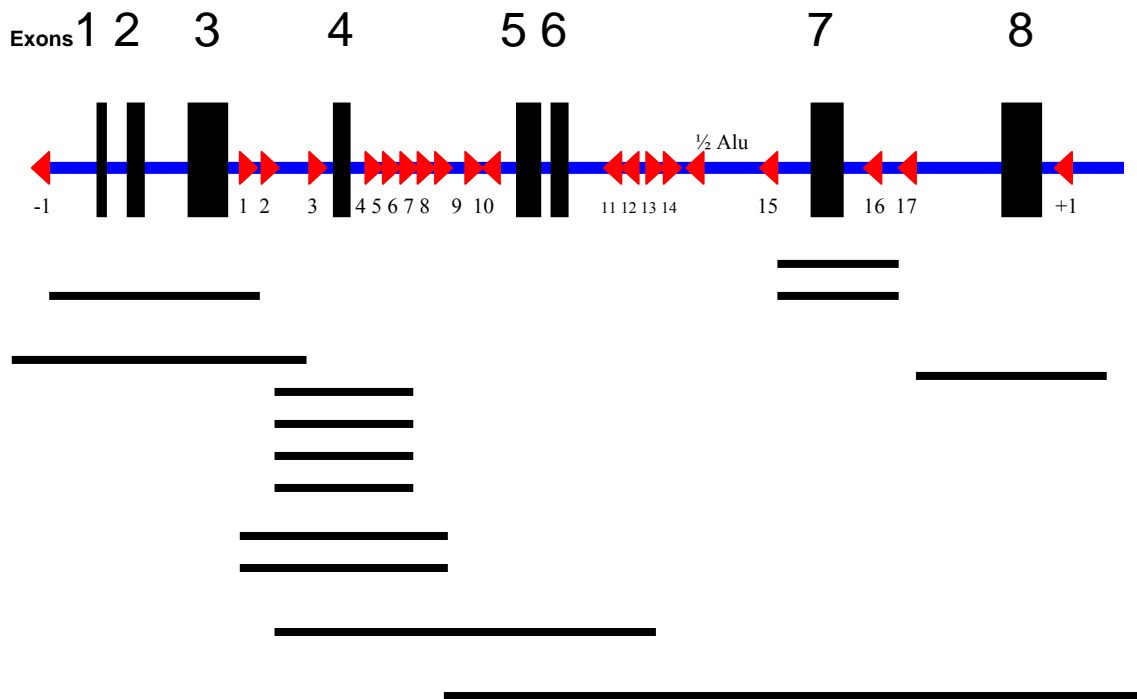


Abb. 23: Darstellung der Verteilung großer Deletionen im C1-Inhibitor-Gen.

(Schwarze Balken repräsentieren die Lokalisation und Ausdehnung der großen Deletionen. „Alu“-Repeats sind entsprechend der Leserichtung als rote Dreiecke dargestellt.)

### 5.4. Vergleich des durchgeführten Mutationsscreenings mit bereits publizierten Daten

Beim Vergleich der Häufigkeiten der einzelnen Mutationstypen des untersuchten Patientenkollektivs mit den in der Literatur bisher publizierten ist eine weitgehende Übereinstimmung erkennbar. Jedoch muß hierbei berücksichtigt werden, dass mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden eine Identifikation großer Deletionen nicht möglich ist, da in den vorausgehenden PCR lediglich das gesunde Allel amplifiziert wird. Die Ursache für die Überrepräsentation an Spleissmutationen im eigenen Mutationsprofil mit 22% vs. 8% bei gleichzeitig geringerem Anteil an kleinen

Deletionen bzw. Insertionen mit 22% vs. 31% liegt wahrscheinlich in der geringeren Fallzahl untersuchter Individuen. Gleichzeitig führen die nicht erfassten großen Deletionen zu einer weiteren Verschiebung der Häufigkeiten zugunsten der übrigen Mutationstypen.

Im folgenden ist der Vergleich des eigenen Mutationsscreenings mit bereits publizierten Daten dargestellt:

### Eigene Mutationen (n=23)

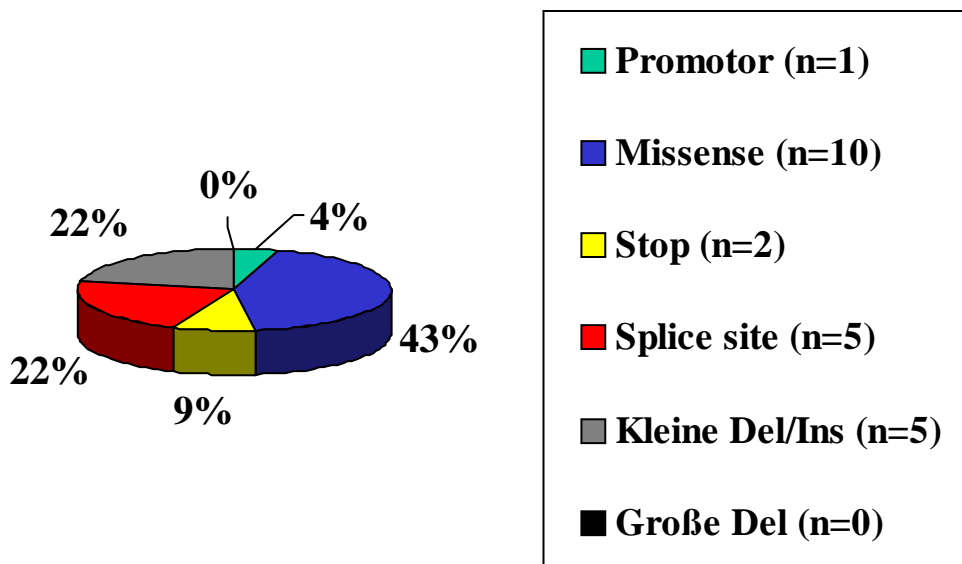


Abb.24: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der in dieser Arbeit identifizierten Mutationstypen im C1-Inhibitor-Gen.

## Daten aus der Literatur (n=110)

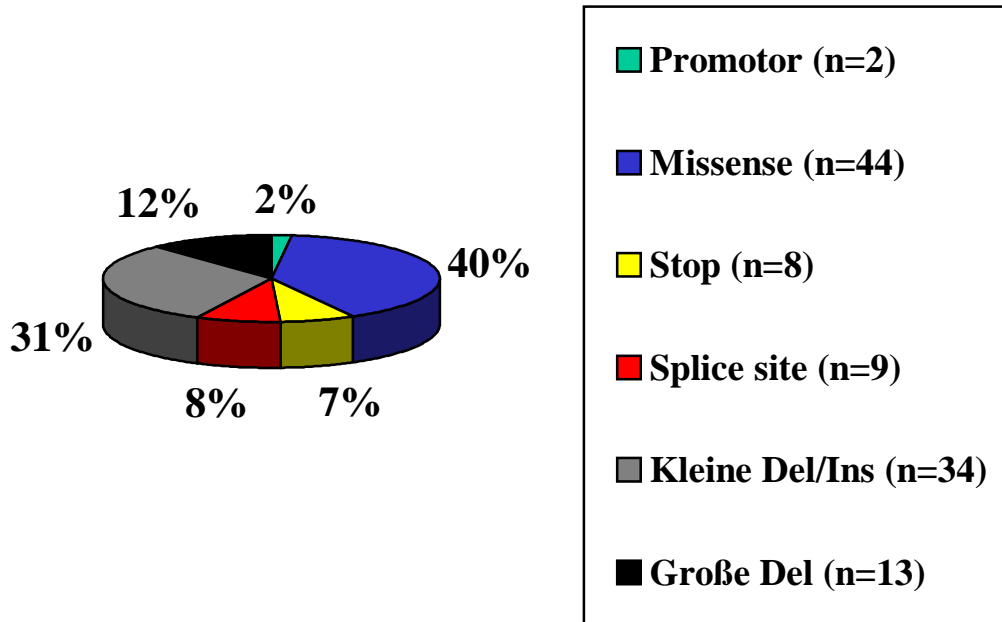


Abb.25: Darstellung der Häufigkeitsverteilung aller bisher in der Literatur publizierten Mutationstypen im C1-Inhibitor-Gen.

Bei insgesamt 58 untersuchten Index-Patienten erscheint der Anteil an identifizierten Mutationen mit 23 auf den ersten Blick recht gering. Hierbei müssen jedoch mehrere Faktoren berücksichtigt werden, welche diese relativ niedrige Quote bedingen. Die bereits geschilderte Erniedrigung der Signalqualität in den Exons 3.1 und 8 durch das für eine DGGE ungünstige Schmelzprofil dieser Fragmente sowie die prinzipiell nicht mögliche Detektion großer, heterozygoter Deletionen bei Verwendung PCR-basierender Methoden tragen zu diesem Umstand bei. Des weiteren kann angenommen werden, dass sich in einem zu untersuchenden Patientenkollektiv ein unzureichend kalkulierbarer Anteil an Patienten mit falscher klinischer Diagnose befindet. Auch das Vorliegen von Phänokopien, d.h. klinisch typischem HAE, dessen Ursache jedoch nicht im C1-INH-Gen liegt, sollte hierbei berücksichtigt werden. Die genannten Faktoren sind nur schwer kontrollierbar und können in einem Patientenkollektiv eine unterschiedliche Rolle spielen und sowohl einzeln als auch erst im Zusammenwirken das Endergebnis

signifikant beeinflussen. In dieser Hinsicht war das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv besonders inhomogen (siehe Abschnitt 3.1.), so dass ein nicht zu unterschätzender Einfluß der genannten Faktoren auf die Detektionsquote angenommen werden kann.

Die Beurteilung der Kausalität der identifizierten Mutationen richtet sich nach dem Mutationstyp und der Mutationslokalisierung im Gen. Punktmutationen führen entweder zu einem Aminosäureaustausch (Missense-Mutation) oder zu einem Kettenabbruch (Nonsense-Mutation), falls ein neues Stopcodon generiert wird. Kleine Deletionen oder Insertionen führen aufgrund der Verschiebung des Leserasters ebenfalls zur Ausbildung von Stopcodons und in der Folge zu einem Kettenabbruch. Durch Mutationen im Bereich der Splice-Stellen werden angrenzende Exons nicht in die reife m-RNA übernommen und entgehen auf diese Weise einer Translation. Bei Vorliegen großer Deletionen sind ganze Genabschnitte deletiert und entgehen somit bereits der Transkription [Strachan et al., 1996].

### **5.5. Mechanismen der Mutationsentstehung im C1-INH Gen**

Innerhalb des C1-INH-Gens sind zwei mittlerweile gut erforschte Mechanismen der Mutationsentstehung bekannt. Das Auftreten großer Deletionen und Duplikationen ist dabei häufig an das ungleiche Crossing-Over repetitiver Sequenzen der Alu-Familie geknüpft, von denen insgesamt 17 über die Introns des C1-INH-Gens verteilt liegen. Bei Verwendung PCR-basierender Screeningmethoden zur Detektion von Mutationen im C1-INH Gen entgeht jedoch dieser mit einer Häufigkeit von ca. 15 % vorkommender Mutationstyp einer Identifizierung, da in der PCR aufgrund der grossen Ausdehnung dieser Mutationen durch die verwendeten Primer lediglich das gesunde Allel amplifiziert wird. Dies senkt, wie bereits oben beschrieben, die Sensitivität der meisten PCR-basierten Mutationsscreeningverfahren. Ein weiterer Mechanismus betrifft das Codon Nr. 444 (CGC) des C1-INH, welches das aktive Zentrum des Proteins repräsentiert. Das in diesem Codon liegende CpG-Dinukleotid (eine Abkürzung für: C ist über eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung an G gekoppelt [Strachan et al, 1996]) kann durch eine spontane Desaminierung des methylierten Cytosins in ein Thymin überführt werden, was einen Austausch von Arginin zu Cystein in der Aminosäuresequenz des



Proteins zu Folge hat. Des Weiteren scheint dieses CpG-Dinukleotid jedoch auch zu anderen Punktmutationen zu führen, die nicht an eine Methylierung und Desaminierung des Cytosins geknüpft sind, sondern aus einer nicht dem Watson-Crick-Modell folgenden Basenpaarung resultieren. Ein dritter Mechanismus der Mutationsgenese wird diskutiert. Hierbei nimmt man an, dass während der DNA-Replikation die DNA-Polymerase, die normalerweise nahezu fehlerfrei eine Elongation entlang der DNA-Matrize bewerkstelligt, durch bestimmte Nukleotidsequenzen und DNA-Sekundärstrukturen in ihrer Aktivität gestört wird. Obwohl die eukaryontische DNA am häufigsten in der plectonemischen, rechtsgängigen Doppelhelixstruktur vorliegt, können auch unter physiologischen Bedingungen bestimmte DNA-Abschnitte in unterschiedlichen Konformationen auftreten. Diese beispielsweise kreuzförmigen Strukturen führen zu einer Unterbrechung der Basenpaarung zwischen den einzelnen DNA-Strängen und ermöglichen eine Basenpaarung innerhalb eines DNA-Stranges. Daraus resultiert für die DNA-Polymerase ein Hindernis, welches Fehler in der korrekten DNA-Replikation zur Folge haben kann. Das Exon 8 des C1-INH-Gens weist eine Region auf, in der es zur Ausbildung derartiger kreuzförmiger Strukturen kommen kann. In der Literatur wurde über Mutationen berichtet, die um diese Region gruppiert vorliegen und eine direkte Folge der dargestellten Behinderung der DNA-Polymerase sein könnten [Bissler et al, 1994].

## **5.6. Identifizierung neuer Mutationen**

Die Untersuchung von insgesamt 58 Familien in der vorliegenden Arbeit ergab 19 (siehe Tabelle 8) bisher unveröffentlichte Mutationen im C1-INH-Gen. Dabei handelt es sich um 9 Missense- und 2 Nonsense-Mutationen, 5 kleine Deletionen (1-3 bp) sowie 3 die Spleissstellen betreffenden Mutationen, aus denen z. T. mit hoher Wahrscheinlichkeit ihre Bedeutung für die Ausbildung eines HAE erklärbar ist. Die beiden Nonsense-Mutationen in Exon 3 führen zu einem Kettenabbruch während der Translation, was den Phänotyp des HAE-Typ I mit erniedrigten Plasmakonzentrationen an C1-INH erklären kann. Alle identifizierten Deletionen generieren aufgrund einer Verschiebung des Leserasters vorzeitig ein Stopcodon (TAA, TGA oder TAG), was ebenfalls eine Unterbrechung der Proteinsynthese zur Folge hat und einem HAE Typ I

zugeordnet werden kann. Von den drei verschiedenen die Spleissstellen betreffenden Mutationen kann vermutet werden, dass sie eine Störung des posttranskriptionellen Processings der C1-INH m-RNA verursachen. Die korrekte Zusammenführung der Exons zur reifen m-RNA durch präzises Ausschneiden der Intronabschnitte ist durch die mutierten Donor- bzw. Akzeptorstellen wahrscheinlich nicht mehr gewährleistet, was eine Veränderung der m-RNA und somit des C1-INH-Proteins zur Folge hätte. Derartige Mutationen haben insgesamt betrachtet weitreichende Konsequenzen für die m-RNA. In quantitativer Hinsicht ist eine Erniedrigung der normalen m-RNA Konzentration durch das Vorliegen der mutierten Form denkbar, womit auch eine erniedrigte Proteinkonzentration und Aktivität erklärbar wären. Zu qualitativen Veränderungen der m-RNA führen diese Mutationsarten in der Weise, dass es zum Verlust codierender Exonabschnitte, der Aktivierung kryptischer oder Generierung neuer Spleissstellen kommen kann. Mit jeder dieser Auswirkungen wäre die Ausbildung eines HAE-Phänotyps I vereinbar. Zur Sicherung und genauen Verständnis der Kausalität müssten jedoch weitere Untersuchungen beispielsweise durch Messung von m-RNA Konzentrationen in peripheren Blutmonozyten sowie gezielte m-RNA Analysen durchgeführt werden [Verpy et al., 1996]. Eine Interpretation von Missense-Mutationen, die zum Austausch einer einzigen Aminosäure führen, ist möglich, wenn die Bedeutung der veränderten Aminosäure für die Funktionsweise des Proteins bereits bekannt ist. Der in der vorliegenden Arbeit identifizierte Austausch des Cysteins an Position 406 durch Arginin führt zur Zerstörung einer von zwei Disulfidbrücken im C1-INH-Protein zwischen dem Cystein an Position 101 und 406. Wie bereits im Abschnitt 2.5.3. beschrieben sind diese für die Ausbildung der Tertiärstruktur und die Stabilität des Proteins unerlässlich, so dass aus ihrer Auflösung eine verminderte inhibitorische Aktivität des C1-INH resultiert [Simonovic et al, 2000]. Da der durch dieses Allel betroffene Patient zusätzlich eine Missense-Mutation in Aminosäure an Position 426 (E→Q) aufweist, kann über eine Zuordnung des Cysteins an Position 406-Arginin-Austausches für sich allein zu einem HAE-Phänotyp nur gemutmaßt werden. Eine Erklärung für die Kausalität der beiden bisher unbekanntem Missense-Mutationen in Exon 2 (Pos. 587 A→G M-22V und Pos. 591 C→T A-21V) liegt in der besonderen Lokalisation dieser Mutationen. Sie betreffen den ersten (M-22V) und zweiten (A-21V) Aminosäurerest des aus 22 Aminosäuren bestehenden Signalpeptids, welches eine

wichtige Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen und der Sekretion des Proteins spielt, bevor es abgespalten wird [Bock et al., 1986]. Möglicherweise behindern diese Mutationen durch den Aminosäureaustausch die Transport- und Sekretionsvorgänge, in deren Folge das C1-INH-Protein in erniedrigten oder fehlenden Plasmaspiegeln vorliegt. Beide Träger dieser Defekte weisen einen HAE-Typ I auf. Die übrigen Missense-Mutationen führen zum Austausch von Aminosäuren, deren Bedeutung für die Funktionsweise des Proteins noch nicht geklärt ist. Künftige Untersuchungen dieser veränderten C1-INH-Proteine in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität könnten Aufschlüsse über die Auswirkungen dieser Mutationen auf Proteinebene liefern. Hierzu müssten geeignete Zellsysteme verwendet werden, in denen mutierte Proteine exprimiert werden, um sie anschließend bezüglich ihrer Funktionsänderung zu charakterisieren [Zahedi et al., 2001].

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die molekulargenetischen Ursachen des hereditären Angioödems untersucht. Dieses seltene, autosomal dominant vererbte Leiden aus dem Formenkreis angioödematöser Erkrankungen kann unbehandelt zu schweren, teils lebensbedrohlichen Symptomen beispielsweise in Form eines Larynxödems führen. Erst durch die Charakterisierung des zugrundeliegenden Gendefekts wird eine Sicherung der Diagnose HAE und der Ausschluss anderer Differentialdiagnosen ermöglicht und führt damit zu einer Steigerung der Behandlungssicherheit betroffener Patienten [Bork et al, 1997]. Zur molekulargenetischen Diagnostik standen die Blutproben von insgesamt 58 HAE-Familien und ihren Mitgliedern zur Verfügung. Bei einem Teil der Patienten bestand lediglich nur ein Verdacht auf eine HAE-Erkrankung, da diese bisher keine klinische Symptomatik aufwiesen oder andere Differentialdiagnosen nicht sicher ausgeschlossen waren. Mit Hilfe der DGGE als Screeningverfahren zur Mutationssuche im C1-Inhibitor-Gen wurde nach eingehender Optimierung der Reaktionsbedingungen eine effiziente Methode etabliert, die eine Detektion von Punktmutationen, kleinen Deletionen und Insertionen ermöglichte. In deren Anschluss konnte durch Sequenzierung eine genaue Charakterisierung der Mutationen erfolgen. Eine Einschränkung der Sensitivität der DGGE wurde dadurch bedingt, dass bei den Exons 3.1 und 8 des C1-Inhibitor-Gens aufgrund ihres sehr komplexen Schmelzverhaltens eine gewisse Unschärfe der Banden im Gradientengel bestehen blieb, so dass einige auffällige Bandenmuster einer Erkennung möglicherweise entgangen sind. Hierbei konnte nur eine Sequenzierung dieser Abschnitte Aufschlüsse über das Vorliegen einer Mutation liefern. Durch die im Anschluss an die DGGE durchgeführten Sequenzierungen der betreffenden Fragmente wurden innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs 23 Mutationen bei Patienten mit HAE-Typ I charakterisiert, von denen 19 bisher nicht bekannt waren. Dabei handelt es sich um 9 Missense- und 2 Nonsense-Mutationen, 5 kleine Deletionen (1-3 bp) sowie 3 die Spleissstellen betreffenden Mutationen, aus denen z. T. mit hoher Wahrscheinlichkeit ihre Bedeutung für die Ausbildung eines HAE erklärbar ist. Die Beurteilung der Kausalität der identifizierten Mutationen richtet sich nach dem Mutationstyp und der Mutationslokalisation im Gen. Während kleine Deletionen,

Nonsense-Mutationen und Spleissstellenmutationen die Ausbildung eines HAE erklären konnten, war die Kausalität von Missense-Mutationen nur dann beurteilbar, wenn die Funktion der durch die Mutation ausgetauschten Aminosäure im Protein bekannt war. Eine von Bowen [Bowen et al, 2001] durchgeführte Metaanalyse ergab insgesamt 97 Mutationen im C1-INH-Gen, die zur Ausbildung eines HAE führen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zusammenstellung unter Verwendung aktueller oder bisher nicht berücksichtigter Literatur nochmals erweitert, so dass eine nahezu vollständige insgesamt 110 Mutationen umfassende Mutationsdatenbank für das C1-INH-Gen erstellt werden konnte (Stand:12/2002). Mit den 19 in dieser Arbeit neu charakterisierten Mutationen sind somit insgesamt 129 verschiedene Mutationen im C1-INH-Gen bekannt. Beim Vergleich der eigenen mit den publizierten Daten hinsichtlich der Häufigkeit der einzelnen Mutationstypen war eine weitgehende Übereinstimmung feststellbar. Jedoch muß hierbei berücksichtigt werden, dass mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten PCR-basierten Mutationsscreenings eine Identifikation großer Deletionen nicht möglich war. Eine Überrepräsentation an Spleissmutationen im eigenen Mutationsprofil mit 22% vs. 8% bei gleichzeitig geringerem Anteil an kleinen Deletionen bzw. Insertionen mit 22% vs. 31% wurde wahrscheinlich durch die geringere Fallzahl untersuchter Individuen bedingt. Zugleich führten die nicht erfassten großen Deletionen zu einer weiteren Verschiebung der Häufigkeiten zugunsten der übrigen Mutationstypen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Fortführung und Intensivierung der molekulargenetischen Untersuchungen des HAE, eine genetische Beratung von Individuen mit positiver Familienanamnese sowie die Einrichtung einer zentralen und ständig aktualisierten Mutationsdatenbank zu einer rechtzeitigen und sicheren Diagnosestellung beitragen können, um auf diese Weise eine Verbesserung der medizinischen Versorgung betroffener Patienten zu gewährleisten. Das stetige Forschungsinteresse, welches sich in steigender Zahl der Arbeitsgruppen und Publikationen um die HAE-Erkrankung widerspiegelt, lässt diesbezüglich mit Zuversicht in die Zukunft blicken.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 **Agostini** A, Cicardi M. hereditary and aquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine* 1992;71: 206-15
- 2 **Ariga** T., Igarashi T., Ramesh N., Parad R., Cicardi M. and Davis A. E. III.: Type I C1 Inhibitor deficiency with a small mRNA resulting from deletion of one exon. *J. Clin. Invest.* 83, 1888-1893, 1989.
- 3 **Ariga** T., Carter P. E., and Davis A. E. III.: Recombinations between Alu repeat sequences that result in partial deletions within the C1-inhibitor gene. *Genomics* 8, 607-613, 1990.
- 4 **Ariga** T., Hoshioka A., Kohno Y., Sakamaki T., and Matsumoto S.: A de novo eletion in the C1 inhibitor gene in a case of sporadic hereditary angioneurotic edema. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 69, 103-105, 1993.
- 5 **Aulak** KS, Pemberton PA, Rosen FS, Carrell RW, Lachmann PJ, Harrison RA: Dysfunctional C1-Inhibitor(At), isolated from a type II hereditary-angio-edema plasma, contains a P1 "rective centre" (Arg--His) mutation. *Biochem J.* 253, 615-618, 1988
- 6 **Aulak** K. S., Cicardi M., and Harrison R. A.: Identification of a new P1 residue mutation (444 Arg→Ser) in a dysfunctional C1 Inhibitor protein contained in a type II hereditary angioedema plasma. *FEBSLett.* 266, 13-16, 1990.
- 7 **Bissler** J. J., Cicardi, M., Donaldson V. H., Gatenby P. A., Rosen F. S., Sheffer A. C., and Davis A. E. III.: A cluster of mutations within a short triplet repeat in the C1 inhibitor gene. *Prac. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9622-9625, 1994.

- 8 **Bissler** J. J., Aulak K. S., Donaldson V. H., Rosen F. S., Cicardi M., Harrison R. A. and Davis A. E. III.: Molecular defects in Hereditary Angioneurotic Edema. Proc. Assoc. Am. Physicians 109,164-173,1997.
- 9 **Bock** SC, Skriver K, Nielson E, Thogersen HC, Wiman B, Donaldson V, Eddy R, Marrinan J, Radziejewska E, Huber R, Shows T, Magnusson S: Human C1-Inhibitor: primary structure, cDNA Cloning, and chromosomal localization. Biochemnistry 1986;25: 4292-4301
- 10 **Bork** K.: Rezidivierende Angioödeme durch C1-Inhibitor-Mangel: Erstickungsrisiko. Aktuelle Aspekte bei Diagnostik und Therapie der Angioödeme. (34) Deutsches Ärzteblatt 94, Heft 12, 21.März 1997
- 11 **Bowen** B., Hawk J.J.,Sibunka S., Hovick S, Weiler J.M.:A Review of the Reported Defects in the Human C1 esterase Inhibitor Gene Producing Hereditary Angioedema Including Fout New Mutations, Clin. Immunology Vol. 98, No 2, 157-163, 2001
- 12 **Cariello**, N.F.; Skopek, T.R. (1993) In: Mutat.Res. 288, S. 103-112
- 13 **Carter** P. E., Duponchel C., Tosi M., and Fothergill J. E.: Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. Eur. J. Biochem. 197, 301-308, 1991.
- 14 **Davis** A. E., Bissler J. J., Cicardi M.: Mutations in the C1 Inhibitor Gene that result in Hereditary Angioneurotic Edema. Behring Inst. Mitt., No. 93, 313-320 (1993).
- 15 **Donaldson** VH, Evans RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema-absence of serum inhibitor of C1-esterase. Am J Med 1963; 35: 37-44

- 16 **Frangi D.**, Cicardi, M., Sica, A., Colotta, F., Agostoni, A., and Davis, A. E. III.: Nonsense mutations affect C1 inhibitor messenger RNA levels in patients with type I hereditary angioneurotic edema. *J. Clin. Invest.* 88,755-759, 1991.
- 17 **Frangi D.**, Aulak K. S., Cicardi M., Harrison R. A., and Davis A. E. III.: A dysfunctional C1 inhibitor protein with a new reactive center mutation (Arg444-Leu). *Federation of European Biochemical Societies Letters* 301, 34-36, 1992.
- 18 **Freiberger T.**, Kolarova L, Mejstrik P, Vyskocilova M, Kuklinek P, Litzman J.: Five novel mutations in the C1 inhibitor gene (C1NH) leading to a premature stop codon in patients with type I hereditary angioedema. *Hum Mutat* 2002 Apr;19(4): 461
- 19 **Göring HD**, Bork K, Bauer R, Hintner H. Späth P, Wüthrich B: Das hereditäre Angioödem im deutschsprachigen Raum. *Der Hautarzt* 1998;49:114-22
- 20 **He S.**, Yang J.-S., Tsang S., Sim R.B., Whaley K.: Role of the distal hinge region of C1-inhibitor in the regulation of C1s activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 412, 506-510, 1997.
- 21 **Herold G.**: Innere Medizin, S. 468-469, Copyright 2000 Gerd Herold, Köln.
- 22 **Jung G. Ernst:** Dermatologie: 65 Synopsen, 96 Tabellen / hrsg von Ernst G. Jung. Unter Mitarb. Von F.A. Bahmer...-4., überarb. Aufl. – Stuttgart: Hippokrates-Verl., 1998 (Duale Reihe), S.49-54.
- 23 **Kawachi Y.**, Hibi T., Yamazaki S. and Otsuka F.: novel donor splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioneurotic edema. *J. Invest. Dermatol.* 110.837-839, 1998.



- 24 **Kreuz** W., Fischer D., Heller C., Martinez-Saguer I., Klarmann D.: Substitution des C1-Esterase-Inhibitors bei Hereditärem Angioödem. Die gelben Hefte 38: 109 (1998), S 109-119.
- 25 **Lerman** L.S, Sauer P. and Dresselhaus C.: MELT94-Software: Calculation of the Variation in thermal Stability of a DNA Molecule along ist Sequence. Massachusetts, Institute of Technology, Copyright, Academic Press, 1993.
- 26 **Levy** N. J., Ramesh N., Cicardi M., Harrison R. A., and Davis A. E. III.: Type II hereditary angioneurotic edema that may result from a single nucleotide change in the codon for alanine- 436 in the C1 inhibitor gene. *Prac. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 265-268, 1990.
- 27 **Lischer** A., Ziegler F., Jenny A., Wuillemin W.A.: Akutes Abdomen bei hereditärem Angioödem. *Schweiz Med Forum*, Nr.13, 28. März 2001
- 28 **McPhaden** A. R., Bimie G. D. and Whaley K.: Restriction fragment length polymorphism analysis of the C1-inhibitor gene in hereditary C1- inhibitor deficiency. *Clin. Genet.* 39, 161-171 , 1991.
- 29 **Meyers** J.A., Sanchez D., Elwell L.P., Falkow s., 1976: Simple agarose lectrophoretic method for the identification characterization of plasmid desoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529
- 30 **Myers** R.M., Maniatis T., Lerman L.S., 1987: Detection and localisation of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods. Enzymol.* 155: 510.
- 31 **Newton** C.R., Graham A., 1994: PCR. Spektrum Akademischer Verlag: 19-189

- 32 **Ocejo-Vinyals J. G.**, Leyva-Cobian F. and Fernandez-Luna J. L.: A mutation unique in serine protease inhibitors (serpins) identified in a family with type II hereditary angioedema. *Mal. Med.* 1, 700-705, 1995.
- 33 **Ono H.**, Kawaguchi H., Ishii N., and Nakajima H.: A point mutation in exon 7 of the C1-inhibitor gene causing type I hereditary angioedema. *Hum. Genet.* 98.452-453, 1996.
- 34 **Ossler W.** Hereditary angioneurotic edema. *Am J Med Sci* 1888; 95:362-367
- 35 **Pappalardo E.**, PhD, Cicardi M., MD, Duponchel C., Carugati A., MD, Choquet S., MD, Agostini A., MD, and Tosi M., PhD. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:1147-54
- 36 **Prada AE**, Zahedi K, Davis AE 3rd., 1998: Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology* 1998 Aug; 199(2): 377-88.
- 37 **Quinke H.** Über akutes umschriebenes Hautödem. *Monatshefte für praktische Dermatologie* 1882; 1: 129-131
- 38 **Saiki R.K.**, Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., 1988: Primer-directed enzymatic amplifikation of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- 39 **Sanger F.**, Nicklen S., Coulson A.R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- 40 **Siddique Z.**, McPhaden A. R., Lappin D. F. and Whaley K.: An RNA splice site mutation in the C1-inhibitor gene causes type I hereditary angioedema. *Hum. Genet.* 88, 231-232, 1991.

- 41 **Siddique Z.**, McPhaden A. R., and Whaley K., Type II hereditary angioedema associated with two mutations in one allele of the C1-inhibitor gene around the reactive-site coding region. *Hum. Hered.* 42, 298-301, 1992.
- 42 **Siddique Z.**, McPhaden A. R., Fothergill J. E., and Whaley K.: A point mutation in the C1-inhibitor gene causes type I hereditary angioedema. *Hum. Hered.* 43. 155-158, 1993.
- 43 **Siddique Z.**, McPhaden A. R., and Whaley K.: Characterisation of nucleotide sequence variants and disease-specific mutations involving the 3' end of the C1-inhibitor gene in hereditary angioedema. *Hum. Hered.* 45, 98-102, 1995.
- 44 **Simonovic I.**, Patson P.A.: The native metastable fold of C1-inhibitor is stabilized by disulfide bonds. *Biochimica et Biophysica Acta* 1481 (2000) 97-102.
- 45 **Skriver, K.**, Radziejewska, E., Silbermann, J. A., Donaldson, V. H., and Bock, S. C.: CpG mutations in the reactive site of human C1 inhibitor. *J. Biol. Chem.* 264, 3066-3071, 1989.
- 46 **Stoppa-Lyonnet D.**, Carter P. Ed., Meo T., and Tosi M.: Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87, 1551-1555, 1990.
- 47 **Stoppa-Lyonnet D.**, Duponchel C., Meo T., Laurent J., Carter P. E., Arala-Chaves M., Cohen J. H., Dewald G., Goetz J. and Hauptman G.: Recombinational biases in the rearranged C1-inhibitor genes of hereditary angioedema patients. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 1055-1062, 1991.
- 48 **Strachan T.**: *Molekulare Humangenetik*. Copyright 1996 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg \* Berlin \* Oxford, S.16-18, S.285-324.

- 49 **Stryer** L.: Biochemie/ Luber Stryer. Aus dem Engl. Übers. Von Günther Stoll ... - 4. Aufl. – Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1996, S.17-45, S.861-1055.
- 50 **Theriault**, A.; Whaley, K.; Bock, S. C.; Boyd, E.; Connor, J. M. : Regional chromosomal assignment of the human C1 inhibitor gene to 11q11-q13.1. (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 51: 1089 only, 1989.
- 51 **Theriault**, A.; Whaley, K.; McPhaden, A. R.; Boyd, E.; Connor, J. M. : Regional assignment of the human C1-inhibitor gene to 11q11-q13.1. Hum. Genet. 84: 477-479, 1990.
- 52 **Verpy** E., Couture-Tosi E., Eldering E., Lopez-Trascasa M., Spath P., Meo T., and Tosi M.: Crucial residues in the carboxy- terminal end of C1 inhibitor revealed by pathogenic mutants impaired in secretion or function. J. Clin. Invest. 95. 350-359, 1995.
- 53 **Verpy** E., Biasotto M., Brai M., Misiano G. Meo T. and Tosi M.: Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angiodema. Am. J Hum. Genet. 59. 308-319, 1996.
- 54 **Verpy** E., Couture-Tosi E., Tosi M.: C1 Inhibitor Mutations Which Affect Intracellular transport and secretion in Type I Hereditary Angioedema. Behring Inst. Mitt., No. 93, 120-124 (1993)
- 55 **Wüthrich** B., Devay P., Späth: hereditäres oder erworbenes Angioödem durch funktionellen Mangel von C1-Inhibitor- ein immer noch zu wenig gekanntes krankheitsbild. Schweiz Med Wochenschr 1999; 129: 285-91

- 56 **Zahedi** R., Macfarlane R.C., Wisnieski J.J., Davis 3rd A.E.: C1 Inhibitor: Analysis of the Role of Amino Acid Residues Within the Reactive Center Loop in Target Protease Recognition. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 1500-1506
- 57 **Zuraw**, B. L. and Herschbach, J.: Detection of C1 inhibitor mutations in patients with hereditary angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 541-546, 2000.

## Danksagungen

Herrn *Prof. Dr. C. R. Müller-Reible* danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien am Institut für Humangenetik und für seine Unterstützung bei Fragestellungen aller Art.

Bei Herrn *Priv.-Doz. Dr. J. Oldenburg* möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Themas, sein fachliches und persönliches Engagement bei der Betreuung, die stets geleisteten Hilfestellungen und die zügigen Korrekturen der ersten Entwürfe dieser Arbeit besonders bedanken.

Den Blutspendern und Blutspenderinnen sowie den Mitarbeitern der Frankfurter Kinderklinik, *Fr. Scharrer* und *Fr. Martinez* danke ich für die Überlassung der zahlreichen Blutproben.

Ebenfalls vielen Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit durch ein Ausbildungsstipendium der *Universität Würzburg*.

Vielen Dank an *Simone Rost* und *Vytas Ivescavescius* für das Beibringen der laborchemischen Methoden sowie für ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Problemen aller Art.

*Barbara Endres* danke ich für zahlreiche DNA-Extraktionen, ihre Unterstützung und Hilfe in vielen Bereichen des Laboralltags.

Bei den übrigen Mitgliedern aus dem Institut für Humangenetik bedanke ich mich ganz herzlich für stets geleistete Hilfestellungen aller Art: *Dr. Gerhard Meng, Dr. Wolfram Kress, Andreas Fregin, Birgit Halliger-Keller, Jörg Schröder und Nicole Mohr*.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen *Eltern* für die Ermöglichung des Studiums und für ihre stete Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Kocot Arkadius
Geburtsdatum	15.08.73
Geburtsort	Krenau (Chrzanow)/Polen
Konfession	katholisch
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1980-1983	Grundschule Nr. 3 in Krenau/Polen
01/1984-09/1984	Grundschule Bochum/Wattenscheid
10/1984-07/1985	Grundschule Lohr am Main
1985-1994	Franz-Ludwig-von-Erthal Gymnasium Lohr am Main, Abschluss: Abitur

## Zivildienst

07/1994-09/1995	Lebenshilfe Ev., Familienentlastender Dienst in Lohr am Main
-----------------	---

## Hochschulausbildung

11/1995-02/1998	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
04/1998	Physikum
05/1998-03/2001	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
03/1999	1. Staatsexamen
03/2001	2. Staatsexamen
05/2002	Abschluss des Studiums, 3. Staatsexamen

Seit 08/2002	Arzt im Praktikum an den Hassberg-Kliniken, Haus Hassfurt
--------------	--

Lohr am Main, 28.05.2003

