Aus der Abteilung Humangenetik (Prof. Dr. med. Dr. h.c W. Engel) im Zentrum Hygiene und Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zur molekulargenetischen Charakterisierung der Mutationen in den *Endoglin*- und *ACVRL1*- Genen bei den Morbus -Osler-Patienten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Irakli Panchulidze

aus Tiflis, Georgien

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Engel

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Geschichte	1
1.2 Das klinische Bild des Morbus Osler	2
1.3 Zur Molekularbiologie des Morbus Osler	3
1.4 Ziele der Arbeit	5
2 Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Geräte	7
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	8
2.1.3 Chemikalien	9
2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und Enzymsets	11
2.1.5 Benötigte Puffer	12
2.1.6 Sterilisierung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien	12
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	12
2.1.8 Patientenkollektive	14
2.1.8.1 Patientenkollektiv 1	14
2.1.8.2 Patientenkollektiv 2	15
2.2 Methoden	15
2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus peripherem Blut	15
2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus peripherem Blut	16
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	16
2.2.4 Polymerasekettenreaktion	17
2.2.4.1 PCR an genomischer DNA	18
2.2.4.2 PCR nach reverser Transkription (RT-PCR)	19
2.2.5 Restriktionsanalyse von DNA mittels Endonukleasen	20
2.2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	20
2.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte	21

I

2.2.8 Klonierung aufgereinigter PCR-Produkte	22
2.2.8.1 Ligation von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten	22
2.2.8.2 Transformationen von Plasmiden in kompotente E. Coli-Zellen	23
2.2.9 Sequenzierung von PCR-Produkten	23
2.2.9.1 Sequenzreaktion	23
2.2.9.2 Aufreinigung von Sequenzierprodukten für den Megabace	
Sequencer	24
2.2.9.3 Automatische Sequenzierung	24
2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.2.11 Transfer von DNA-Fragmenten: Southern Blotting	26
2.2.12. Radioaktive Markierung von DNA, Hybridisierung membrangebundener RNA Random-Prime-Markierung	und 27
2.2.13 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten DNA- Sonden	28
2.2.14 Computeranalysen	28

rgebnisse	30
3.1 Patientenkollektiv	30
3.2 Mutationsanalysen im Gen für Endoglin und im Gen für die Aktivin-A-Rezeptor-Typ-II-ä	ähnliche
Kinase 1	31
3.2.1 Mutationen im Endoglin-Gen	35
3.2.2 Mutationen im ACVRL1-Gen	45
3.3 Untersuchung der Promotorregion des Endoglin-Gens	56
3.3.1 Etablierung der PCR-Bedingungen und der Sequenzanalyse für die Promotorregi	on 59
3.4 Diagnostik auf cDNA Ebene	60
3.4.1 Etablierung der RT-PCR-Bedingungen und Sequenzanalyse	61

4 Diskussion	66
4.1 Mutationen in den Genen für ACVRL1 und Endoglin als Ursache für Morbus Osler	66
4.2 Klinische Aspekte und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	69
4.3 M.Osler ohne Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1	72
4.4 Perspektiven der Arbeit	75
5 Zusammenfassung	76
6 Literaturverzeichnis	77

Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACVRL1	Aktivin-Rezeptor-ähnliche Kinase 1
ALK-1	Aktivin-Rezeptor-ähnliche Kinase 1
AVM	arteriovenöse Malformation
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre Desoxvribonukleinsäure
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
d h	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtrinhosphat
DPR	Deletion Prone Region
dsDNA	doppelsträngige Desovyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
	Desoyyuridintrinhosnhat
E coli	Escharichia coli
	Ethylandiamintatraessigsäure
EDIA	Endoglin
ot al	ot alii
	Ethanol
EION avtl	eventuell
EVII.	Eibrohlast Crowth Easter Desenter 2
rurks a	Gromm: Erdbasehlaunigung
g CADDH	Clyaning, Eludeschieungung
UAPDII aab	asharan
geo.	Stunda
	Stunde
ППІ	We see We see whether the second seco
$H_2 U$	Wasser
IUVEC	Kilahagan
KD 1	Kilobasen
l M	Liter
IVI.	Morbus
μ	$M_{1} \text{ kro} (10^{-5})$
MECP2	Methyl-CpG-binding Protein 2
min	Minute
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure
n NR (F)	Nano (10 ⁻)
NMD	Nonsense Mediated Decay
0.g.	oben genannt
p.a.	posterior-anterior
Pa	Pascal
pAVM	pulmonale arteriovenöse Malformation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PEG-10	Paternally Expressed Gene 10
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde
SMAD-4	Mothers Against Decapentaplegic Drosophila Homolog 4
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
V.	Vena
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Code der Aminosäuren

А	Ala	Alanin	Μ	Met	Methionin
С	Cys	Cystein	Ν	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	Р	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
Η	His	Histidin	Т	Thr	Threonin
Ι	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
Κ	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Code der Nukleinsäuren

	A 1 ·
A	Adenin
	1 Ideilill

- Thymin Guanin Т
- G
- Cytosin Uracil
- C U

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Geschichte

Der Morbus Osler-Rendu-Weber, auch als hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT) bekannt, ist eine autosomal dominant vererbte Multiorganpathologie mit einer Prävalenz von 1:10000 bis 1:5000 (Cottin et al. 2007) und ist charakterisiert durch spontan auftretendes und rezidivierendes Nasenbluten, mukokutane Teleangiektasien sowie durch viszerale Läsionen, wie z.B. pulmonale, hepatische, gastrointestinale oder cerebrale arteriovenöse Malformationen (AVM) (Plauchu et al. 1989; Haitjema et al. 1995 und 1996), (Abb. 1).



Abb. 1: Klinische Bilder der HHT. (A) Teleangiektasie an der Fingerspitze (Pfeil) und (B) gastrointestinale Teleangiektasien.(C) Orale Teleangiektasien (Pfeil) bei 40-facher Vergrösserung. (D) pAVM vor -(i) und nach(ii) der Embolisierung (Govani, Shovlin : 2009, S. 861).

Noch im 19. Jahrhundert wurden das Nasenbluten mit konsekutiver Eisenmangelanämie, die gastrointestinalen Blutungen und die Teleangiektasien als separate medizinische Entitäten gesehen. In den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden im Zusammenhang mit Morbus Osler Gefäßanomalien beschrieben, v.a. arteriovenöse Malformationen (AVM) des pulmonalen (Rundles 1945), hepatischen (Smith und Lineback 1954) und cerebralen (Roman et al. 1978) Kreislaufs. Heute ist aufgrund von Screeningprogrammen bekannt, dass arteriovenöse Malformationen bei Patienten mit Morbus Osler wesentlich häufiger sind als früher angenommen.

1.2 Das klinische Bild des Morbus Osler

Die Erkrankung ist charakterisiert durch die klassische Trias bestehend aus (muko-) kutanen Teleangiektasien, arteriovenösen Malformationen mit rezidivierender Epistaxis und Hämorrhagien, sowie der Heredität. In mehr als 90% der Fälle stellt die Epistaxis das klinische Erstsymptom dar (Plauchu et al. 1989; Guttmacher et al. 1995; Haitjema et al. 1996). Bei 50-80% der Patienten sind mukokutane Teleangiektasien als ein weiteres augenscheinliches Merkmal zu finden (Plauchu et al. 1989; Guttmacher et al. 1995; Haitjema et al. 1996). Ein drittes Kriterium sind viszerale Läsionen, wie z.B. pulmonale (Cooley und McNamara 1954; Hales 1956; Anabtawi et al. 1965), hepatische (Reilly und Nostrant 1984, Haitjema et al. 1996;) oder cerebrale (Plauchu et al. 1989; Haitjema et al. 1995, Haitjema et al. 1995, oder cerebrale (Plauchu et al. 1989; Haitjema et al. 1995, und 1996) arteriovenöse Malformationen (AVM). Das vierte Kennzeichen des Morbus Osler ist die positive Familienanamnese dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung (Shovlin und Letarte 1999; Fuchizaki et al. 2003)

Diese vier Diagnosekriterien wurden im Auftrag der Internationalen HHT-Gesellschaft als Konsensus-Kriterien erarbeitet und veröffentlicht und haben als sog. Curaçao-Kriterien allgemeine Akzeptanz, (Tab 1.1). Die klinische Diagnose gilt als gestellt, wenn 3, als möglich oder verdächtig, wenn 2, und als unwahrscheinlich, wenn weniger als 2 der o.g. Kriterien erfüllt sind (Shovlin et al. 2000).

Curaçao-Kriterien	Erklärung
Epistaxis	spontan und rezidiverend
Teleangiektasien	Lokalisierung: Lippen, Mundhöhle, Finger, Nase
viszerale Manifestation	GI-Blutung, pAVMs, hAVMs, CVMs
positive Familienanamnese	≥ Verwandter I. Grades mit M. Osler nach o.g. Kriterien

Tab. 1.1:Curaçao-Kriterien (nach "HHT Foundation Int. Inc."). GI: gastrointestinal, AVMs: arteriovenöse Malformationen, p: pulmonal, h: hepatisch, CVMs: zerebrovaskuläre Malformationen. Beim Erfüllen von ≥ 3 Kriterien gilt die Diagnose als "sicher", beim Erfüllen von 2 als "wahrscheinlich" und von 0-1 als "unwahrscheinlich".

1.3 Zur Molekularbiologie des Morbus Osler

Die Entstehung der HHT wird im wesentlichen Mutationen in zwei Genen zugeschrieben. Zum einen handelt es sich hierbei um das Gen für Endoglin (ENG) auf Chromosom 9q33-q34 (McAllister et al., 1994) und zum anderen um das Gen für die Activin-Receptor Like Kinase (ALK-1) auf Chromosom 12q13 (Vincent et al. 1995; Johnson et al. 1996). Das Gen für Endoglin besteht aus 15 Exonen und kodiert für ein 673 Aminosäuren umfassendes Protein (McAllister et al. 1994). Das ACVRL1-Gen besteht aus 10 Exonen und kodiert für ein 503 Aminosäuren großes Protein (Vincent et al. 1995; Johnson et al. 1996). Mutationen im Endoglin werden dem HHT Typ 1 zugeschrieben mit einer Inzidenz von bis zu 40% für pulmonale arteriovenöse Malformationen (Berg et al. 1996,Sadick et al. 2006,). Mutationen im ACVRL1 entsprechen dem HHT Typ 2 mit einer Inzidenz von bis zu 14% für pulmonale AVMs (Berg et al.1996, Sadick et al. 2006). Die große Mehrheit (~80%) der ENG-Mutationen führt zum vorzeitigen Stopcodon und zu verkürzten Peptiden, anderseits

Einleitung

sind mehr als die Hälfte (~53%) der Mutationen im ACVRL1 "missense" Substitutionen, lokalisiert überwiegend in den Exonen 8,7 und 3 (Lee et al. 2009). Großen Deletionen und Insertionen sowie "splice-site"-Mutationen in den beiden Genen wurden auch beschrieben (Abdalla, Letarte . 2006, Bayrak-Toydemir et al. 2006). Kürzlich wurden ein dritter und ein vierter Locus für die HHT auf den Chromosomen 5 bzw. 7 nachgewiesen, die Gene sind jedoch noch nicht identifiziert worden (Cole et al.2005, Bayrak-Toydemir et al. 2006). Außerdem gibt es Krankheiten, die durch überlappende Eigenschaften mit HHT ausgezeichnet sind, Juvenile-Polyposis-hereditäre-hämorrhagische-Teleangiektasie-Syndrom wie das (JPHT), verursacht durch Mutationen im SMAD4-Tumorsupressor-Gen (Gallione et al. 2004, 2006). SMAD4 ist in die TGF- β Signalkaskade involviert. Ein gemeinsames Merkmal für die HHT und JPHT ist die gastrointestinale Blutung.

Die Gene für Endoglin und die Activin-Receptor-Like Kinase kodieren für Transmembranproteine, die vor allem in Endothelzellen exprimiert werden und die als Komponenten des Rezeptorkomplexes für Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie identifiziert wurden (Lebrin et al.2004, Feng , Derynck , 2005, Blanco et al.2005). TGF- β beeinflusst verschiedene Prozesse in den Endothelzellen (Migration, Proliferation, Adhäsion und Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix). Generell kann man sagen, dass TGF- β -Typ-II-Rezeptoren ihre Liganden direkt binden und Typ-I-Rezeptoren rekrutieren und aktivieren, die wiederum nachgeordnete zytoplasmatische Signalmoleküle (SMADs; "mothers against decapentaplegic") aktivieren. SMADs binden an Komplexe, translozieren in den Kern und modulieren die Expression von Zielgenen durch direkte Bindung an die DNA (Abb: 2).



Abb. 2: Schematische Darstellung des TGF-β-Signalwegs (nach Abdalla et al., 2005, S.106). TGF-β bindet an den Rezeptor Typ II (Tβ-RII). Der Rezeptor Typ III (Tβ-RIII) ermöglicht diese Bindung. Der Rezeptor Typ II bindet an den Rezeptor Typ I (Tβ-RI) und phosphoryliert ihn. Endoglin ist ein Typ-III-Rezeptor dieses Signalwegs, ACVRL1 ist ein Typ-I-Rezeptor. Es folgt die Phosphorylierung der Smad-Proteine. Dadurch werden im Nukleus bestimmte Gene aktiviert bzw. inaktiviert.

Durch Untersuchungen von Endothelzellen umbilikaler Venen Neugeborener konnte gezeigt werden, dass die Menge an Protein von Endoglin und ACVRL1 bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation um die Hälfte reduziert ist. Es konnten aber keine veränderten Proteine identifiziert werden (Cymerman et al. 2000; Abdalla et al. 2000).

1.4 Ziele dieser Arbeit

1) Im Rahmen dieser Arbeit sollten bei zunächst 33 Indexpatienten die Gene für Endoglin und ACVRL1 durch Sequenzierung analysiert werden. Bei den Patienten, bei denen Mutationen gefunden werden, sollte der Schweregrad der Erkrankung, soweit möglich, abgeklärt werden. Außerdem sollte bei Mutationen an RNA-Spleiß-Stellen der Effekt dieser Veränderungen auf mRNA-Ebene untersucht werden. Einleitung

2) Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin bei Patienten mit klinisch sicherem oder wahrscheinlichem Morbus Osler, die keine Mutationen in den Genen für Endoglin und für ACVRL1 aufweisen, nach Mutationen in der Promotorregion des Endoglin-Gens gesucht werden. In bisherigen Studien (Rius et al, 1998, Pimanda et al, 2006,) wurde gezeigt, dass die konservierte E3-Region des Endoglin-Gens(-507 bis -24 bp in 5' Richtung) (Abb. 3.23) der Promotorregion des Endoglin-Gens entspricht. Es sollte nach Mutationen in diesem Abschnitt gesucht werden.

3) Des Weiteren sollte versucht werden, die HHT-Diagnostik auf RNA-Ebene durchzuführen. Dafür wurden RNA-Proben von 15 Patienten mit gesichertem M.Osler, bei denen verschiedene Mutationsarten festgestellt worden sind, ausgesucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

8-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg		
ABI PRISM 7900HT Sequence Detection	Applied Biosystems, Darmstadt		
System			
Abzug Captair [®] 4000 NU	Erlab, Pont de L'Arche, Frankreich		
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg		
Dampfdruckautoklav	Webeco, Bad Schwartau		
Foto-Gerät E.A.S.Y. RH 3	Herolab, Wiesloch		
Horizontale Mini-Gel-Kammer	Medizintechnik, Universtität Göttingen		
Horizontales Gel-Elektrophorese-System	BRL Life Technologies, Inc.,		
Horizon™ 11.14	Gaithersburg, USA		
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg		
Magnetrührer	Schütt Labortechnik, Göttingen		
Mikrozentrifuge 1-15	Sigma, Deisenhofen		
Mikrozentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg		
Multipipette Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg		
PCR-UV-Kabinett	Harnischmacher, Kassel		
Pipetman-Pipetten (10, 20, 100, 200,	Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel,		
1000 μl)	Frankreich		
Primus 25 advanced [®] Thermal Cycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen		
PTC-100™ Thermal Cycler	MJ Research Incorporated, Alameda,		
	USA		
Rüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen		
Sequenzierer MegaBace1000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg		
Spannungsgerät Gene Power Supply	Pharmacia, Schweden		
GPS 200/400			
Thermomagnetrührer RCT basic	Schütt Labortechnik, Göttingen		
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg		

Eppendorf, Hamburg
Herolab, Wiesloch
Bachofer, Reutlingen
Bender & Hobein AG, Zürich
Sartorius, Göttingen
Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
Heraeus, Hamburg
Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Kendro Laboratory Products GmbH,
Langenselbold
Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchswaren wurden von den Firmen Omnilab-Krannich GmbH, Göttingen, und Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, bezogen.

0,2-ml-96-well PCR plate	ABgene₀, Surrey, UK
0,2-ml-Schraubcups	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
1,5-ml-Mikroschraubröhre	Sarstedt, Nümbrecht
1,5-ml-Reaktionsgefäße	Brand GmbH, Wertheim
13-ml-Röhre (Falcons)	Sarstedt, Nümbrecht
50-ml-Röhre (Falcons)	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch-Platte für Sephadex	Medizintechnik, Göttingen
Aufreinigungsplatte Nucleofast [®] 96 PCR	Macherey-Nagel, Düren
Filterpipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200	G. Kisker GbR, Steinfurt; Heinemann
μl)	Labortechnik GmbH
Mikrotiterplatten NUNCLON™	Greiner Nunc., Nürtingen
Millipore Multiscreen Filterplatte	Millipore, Schwalbach

Millipore PCR-Aufreinigungssäulen	Millipore, Schwalbach
Millipore-MAHV N45-Platte	Millipore, Schwalbach
Petrischalen	Greiner Nunc., Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzküvette	Omnilab-Krannich GmbH, Göttingen

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den

Firmen Carl Roth, Karlsruhe, und Biomol, Hamburg, bezogen.

Agarose	Fluka, Neu-Ulm
• Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
• Antibiotika	GibcoBRL, Paisley (UK)
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DNA-Ligase	MBI, Sankt Leon-Rot
• dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Erythrozyten-Lysispuffer	Puregene, Minneapolis (USA)
Ethidiumbromid	Eurobio, Les Ulis Cedex (Frankreich)
• EtOH abs p.A.	Roth, Karlsruhe
Formaldeyd	Roth, Karlsruhe
• IPTG	Biomol, Hamburg
• Kb-Leiter	GibcoBRL, Paisley (UK)
Orange G	Sigma, St. Louis (USA)
Phenol	Biomol, Hamburg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Biolabs, Beverly (USA)
	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Select Peptone	GibcoBRL, Paisley (UK)
Select Yeast Extract	GibcoBRL, Paisley (UK)
Sephadex G50	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
TRI Reagent	Sigma, St. Louis (USA)
Synthetische Oligonukleotide	Operon Biotechnologies, Köln
(100pmol/µl) (Sequenzen sind in der	
Tabelle 2.1 aufgeführt)	
• Tris	GibcoBRL, Paisley (UK)
• X-Gal	Biomol, Hamburg

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und Enzymsets

100 mM dNTP Set, PCR Grade	Invitrogen, Karlsruhe
ABI PRISM [®] Big Dye™ Terminator Cycle	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequencing Ready Ready Reaction Kit	
Deoxyribonuclease I (RNase free)	Fermentas, St. Leon-Rot
DYEnamic™ ET terminator cycle	Amersham Biosciences, Freiburg
sequencing Ready Reaction Kit	
HotStarTaq [®] PCR Master Mix	Qiagen, Hilden
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Karlsruhe
PURESCRIPT [®] -RNA-Purification-Kit	Gentra, Minneapolis, USA
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen

2.1.5 Benötigte Puffer

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCI. pH 8.0
	10 MM EDTA
	100 μg/ml RNase
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH
	1,0% SDS
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer)	3,1 M Kaliumacetat pH 5,5
SE-Puffer	7,5 mM NaCl
	1 mM EDTA
	mit NaOH auf pH 8.0 einstellen
Stoppmix	95% (v/v) Formamid
	50 mM EDTA
	0,05% (w/v) Bromphenolblau
	0,05% (w/v) Xylenxyanol
• TBE (5 X)	445 mM Tris-HCl, pH 8.2
	445 mM Borsäure
	10 mM EDTA, ph 8
• TE-Puffer (10X)	0,1 M Tris-HCl, pH 8
	10 mM EDTA

2.1.6 Sterilisierung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Die Lösungen und Pipettenspitzen wurden in einem Autoklaven (Webeco, Bad Schwartau) bei 121°C und 100 kPa für 20 min sterilisiert.

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) dienen als Startpunkte für die Polymerase-Ketten-Reaktion.

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma Qiagen/Operon synthetisiert. Die Stocks wurden mit 1 x TE (pH 8.0) auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt und bei –20 °C gelagert.

Amplikonname	Sequenz (5'-3') (Forward)	Sequenz (5'-3') (Reverse)
ENG 1	ACT GGA CAC AGG ATA AGG CCC AG	AAT ACT TGG GGC CTG GTC CGT G
ENG 2	CAC CTT ATT CTC ACC TGG CCT CTT	CTG CCT TGG AGC TTC CTC TGA G
ENG 3	GGG TGG CAC AAC CTA TAC AAA T	CAG AGA TGG ACA GTA GGG ACC T
ENG 4	ATT ACT TCC TGA CCT CCT ACA TGG	CAG ATT CCT CCT GAG CAG TAT CAT
ENG 5	CGA ACC TAG GTC CTC TGA CG	TAG GGG GCG TAG CCT AGA GT
ENG 6	GGC CTG TCC GCT TCA GTG TT	GTT TTG TGT CCC GGG AGC TG
ENG 7	CCC CCT GTT CTG CCT CTC TC	CTG ATC CAA GGG AGG GGA AG
ENG 8	ACA CAT ATC ACA CAG TGA CCA GC	CTA GGG GAG GAA CCA GAT GTC
ENG 9a-b	CTC CTG ATG GTG CCC CTC TCT T	TTG TCT TGT GTT CTG AGC CCC TG
ENG 10	ATT GAC CAA GTC TCC CTC CC	GAA AGG CGG AGA GGA AGT TC
ENG 11	GGT GGG GTG AAG AGC AGC TG	GAC CTG GAA GCT CCC ACT TGA A
ENG 12	GCT ACG AAG CGG TGG AGA T	CTA GGC TGC TAT GGC TCT GG
ENG 13-14	GTC CAT GGC TCA GCA GAG CTG	GCT CCA TTC TGG GTC GAG TGG
ALK1 2	TGT CAC ACT TCA TGG CTC TTA CTC	ACT CTC CAG TCA AGC TCC TAC ATT
ALK1 3	TCA GAC GAG AGG GAC AGT AGG	TCT GCC AGT TAG ATC CCA GAG T
ALK1 4	AGC TGA CCT AGT GGA AGC TGA	CTG ATT CTG CAG TTC CTA TCT G
ALK1 5	CCC AGG TCG AGG ATA GAG AA	ACC GCC TGT GAT TCC AGT AG
ALK1 6	AGG CAG CGC AGC ATC AAG AT	AAA CTT GAG CCC TGA GTG CAG
ALK1 7	ACG ACT CCA GCC TCC CTT AG	AGA GGA GAG CGC ACA AGC TC
ALK1 8	TTCC TCT CAG TCC CCA CCT TG	ACT GGC CAT GGC TGG AAG
ALK1 9	CCT CTC AGG GGT AGC GTG T	CCT AGA GAG GTG CCC TAA CCA
ALK1 10	CAC CAC TTG TCT TTC CTC TCG	AGA TAG GGC ACC ATC CAC TG
H. Prom.	TTC AGT TTT CCT GCC TGT TAG G	GGG TCC CTG GAC ACC TAC TT

H. Prom.Nest.	CCC CAT GTC AAC TGC ACT TAG TA	ACC TAC TTG TGG GGC TGA GG
cDNA Endo.1	ACG CTC CCT CTG GCT GTT	GAT GGC AGC TCT GTG GTG TT
cDNA Endo.2	CTG CAC TTG GCC TAC AAT TCC	CAC GAA GGA TGC CAC AAT G
cDNA Endo.3	AGC TCC CAG ACA CAC CTA AAG	GGA CAC TCT GAC CTG CAC AAA
cDNA Endo.4	CTT TCC AGC TGG GCC TCT AC	TGT ACC AGA GTG CAG CAG TGA
cDNA Endo.5	CTG ACC TGT CTG GTT GCA CA	CAG AGT GCA GCA GTG AGC AG
cDNAalk.1	GCA GGA AGA CGC TGG AAT AA	AAC TTG CAC AGG GAG CTC TG
cDNAalk.2	TGG TGC ACA GTA GTG CTG GT	GTT GCC TTG GTG GAG TGT G

cDNAalk.3	ACC ACA GGG AGT GGC TCA	GTC AAG AGC AAC CTG CAG TG
cDNAalk.4	CTT CGG TAC ACA GGG CAA AC	AGT GGA TGG TGC CCT ATC TG

2.1.8 Patientenkollektive

Die Blutproben der in dieser Arbeit untersuchten Patienten und Angehörigen wurden von verschiedenen klinisch-genetischen Zentren wegen Verdachts auf Morbus Osler eingesandt. Alle Betroffenen waren zuvor klinisch untersucht worden. Die klinischen Angaben wurden uns mit Hilfe eines Fragebogens mitgeteilt.

2.1.8.1 Patientenkollektiv 1

Es wurden daher 33 Patienten mit klinisch gesichertem (3 Curaçao-Kriterien) oder klinisch wahrscheinlichem (2 Curaçao-Kriterien) Morbus Osler auf Mutationen in ENG und ACVRL1 untersucht. Dabei handelte es sich um 7 familiäre Fälle.

Patienten mit Morbus Osler können sich in der Symptomatik sehr stark voneinander unterscheiden. Da Mutationen in zwei Genen (ENG und ACVRL1) für die Entstehung des Morbus Osler verantwortlich sein können, haben wir die Hypothese formuliert, dass die Unterschiede zwischen den Patienten eventuell auf unterschiedliche Mutationen und insbesondere auch darauf zurückzuführen sein könnten, dass manche Patienten Mutationen in beiden Genen, andere Patienten Mutationen nur in einem Gen haben.

2.1.8.2 Patientenkollektiv 2

Die Detektionsrate von Mutationen (inklusive große Deletionen mittels RealTime PCR) in den Genen für ENG und ACVRL1 bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Morbus Osler beträgt im Institut für Humangenetik Göttingen nach Wehner et al. (2006) 62,7% und ist hiermit konkordant mit der Detektionsrate weltweit (Lesca et al., 2004). Es wurden auch 15 Patienten mit klinisch gesichertem oder wahrscheinlichem Morbus Osler auf Mutationen in der Promotorregion des Endoglingenes untersucht. Bei diesen Patienten waren durch Seguenzierung weder Punktmutationen noch kleine Deletionen. kleine Insertionen oder kleine Duplikationen in den Genen für ENG und ACVRL1 gefunden worden. Durch RealTime PCR waren auch keine großen Deletionen (größer als ein Exon) gefunden worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus peripherem Blut

Zur Lyse der Erythrozyten wurden 5-10 ml EDTA-Blut mit 30 ml 4°C kaltem Lysepuffer in einem Polypropylenröhrchen gemischt und für 30 min auf Eis gelegt. Danach wurde für 15 min bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 30 ml Lysepuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Leukozytenpellet keine rötliche Färbung mehr aufwies. Anschließend wurde das Leukozytenpellet in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, 250 µl Proteinase K (10mg/ml)

und 500 µl SDS 10% zugegeben und bei 55°C im Wasserbad über Nacht verdaut. Durch das SDS werden die Zellmembranen zerstört, während die Proteinase K die zellulären Proteine abbaut. Nach der Proteolyse wurden 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben. Es wurde für 15 sec gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur bei 3000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Tube gegeben, 1,3 ml Glykogen zugegeben, und die DNA wurde mittels 2 Volumina 100% Ethanol 3 h bei -20°C ausgefällt. Die DNA-Knäuel wurden mit 500 µl 70%-Ethanol gewaschen und, nachdem das Ethanol abgedampft war, in 500 µl 1 X TE-Puffer gelöst.

2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus peripherem Blut

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus peripherem Blut wurden ca. 5 ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen, mit ca. 45 ml RNA-Stabilisierungslösung von Roche (Mannheim) gemischt und bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 10 ml des Ansatzes mit 6 ml TRI Reagent gemischt, gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Chloroform und Zentrifugation für 30 min bei 4000 x g wurde der Überstand in ein neues 50-ml-Falcon-Röhrchen übertragen, mit 7,5 ml Isopropanol gemischt und erneut 30 min bei 4000 x g zentrifugiert. Nach Entsorgung des Überstands wurde das Pellet in 1 ml Ethanol gelöst und in ein neues RNA-Cup gegeben. Nach abschließender Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g wurde das Pellet in 30 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration der DNA/RNA wurde durch die Messung der Absorption photometrisch bestimmt. Dazu wurden 4 μ l der Probe in 396 μ l H₂O verdünnt und bei 260 und 320 nm (Kontrolle) in einer Quarzküvette gegen 400 μ l H₂O gemessen. Die Konzentration wurde nach der Formel C = (E260 – E320) x f x c berechnet:

C = Konzentration der Probe (µg/µl) E260 = Absorption bei 260 nm E320 = Absorption bei 320 nm f = Verdünnungsfaktor c = Konzentration/Absorption.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die PCR-Technik ist eine enzymatische Methode für die in vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Spezifität dieser Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die den zu vermehrenden DNA-Abschnitt flankieren und nach einer Hitzedenaturierung an den komplementären Strängen binden. Die hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) des Archaebakteriums *Thermus aquaticus* (Chien et al. 1976) synthetisiert bei ihrer optimalen Temperatur von 72 °C die DNA entlang der Region zwischen den Primern. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer ("Annealing") und DNA-Synthese ("Elongation") wird eine exponentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Fragments erreicht. Durch den Einsatz der hitzestabilen Taq-Polymerase wird die Automatisierung der PCR in Thermocyclern ermöglicht.

2.2.4.1 PCR an genomischer DNA

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen genomischer DNA wurde diese wie unter 2.2.1 beschrieben extrahiert und wie folgt in einem Reaktionsansatz zusammengegeben:

x µl DNA (300-500 ng) 10 µl HotStarTaq Master Mix Kit 1 µl Primer F (10 pmol/µl) 1 µl Primer R (10 pmol/µl) ad 20 µl H₂O.

Die Zyklustemperaturen und Zeitintervalle für die PCR-Reaktion sind von verschiedenen Parametern abhängig. Sie richten sich unter anderem nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments sowie nach der spezifischen Anlagerungstemperatur der eingesetzten PCR-Primer. Folgender Reaktionszyklus wurde standardmäßig angewendet:

Denaturierung:	95°C	15 min
30-35 Zyklen von:		
Denaturierung:	95°C	30-60 sec
Anlagerung:	50-65°C	15-60 sec
Elongation:	72°C	30-90 sec
Endelongation (optional):	72°C	5-10 min

Nach Abschluss der PCR wurden zur Kontrolle 2 µl des Ansatzes mit 2 µl Stoppmix gemischt, wie in 2.2.6 beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.2 PCR nach reverser Transkription (RT-PCR)

Bei der Methode der RT-PCR, die RNA als Vorlage nutzt, erfolgt zunächst eine reverse Transkription, bei der die RNA in eine cDNA umgeschrieben wird. Dann wird das cDNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, auch niedrig konzentrierte Transkripte eines Gens in verschiedenen Geweben nachzuweisen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Analysen wurde das Superscript[™] II Kit der Firma Invitrogen verwendet. Bei diesem Verfahren werden reverse Transkription und anschließende PCR in zwei voneinander getrennten Reaktionen durchgeführt. Um spezifisch Poly-A⁺-RNA zu binden und in cDNA zu synthetisieren, wurde 1µl Oligo(dT) Primer (10pmol/µl) benutzt. Es wurden 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Danach wurde noch 1 µl dNTPs hinzugegeben und der Ansatz mit Ampuwa auf 20 µl verdünnt. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 5 min bei 65°C wurde dieser für 1 min auf Eis gelegt. Danach wurde er mit 4 µl 5 X First Strand Puffer (vom Superscript II-Kit) und 2 µl 0,1 M DTT gemischt. Nach der Zugabe von 1 µl Superscript-II-Reverse-Transkriptase wurde 50 min bei 42°C und abschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA konnte dann bei -20°C gelagert werden. Die Bedingungen der darauffolgenden PCR (mittels exonischer Primer) waren von den unter 2.2.4.1 beschriebenen Parametern abhängig.

2.2.5 Restriktionsanalyse von DNA mittels Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die kurze definierte Nukleotidsequenzen, in der Regel Palindrome, in der DNA erkennen, binden und schneiden. Die Restriktion der DNA findet in enzymspezifischen Puffersystemen statt. Der Ansatz wurde 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Analyse in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die folgenden Komponenten wurden zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammengegeben:

x μl DNA (~1 μg) 2 μl 10 x Reaktionspuffer 2 μl Restriktionsenzym (10 U/μl) ad 20 μl H₂O.

2.2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von PCR-Produkten wurde eine ein- bis zweiprozentige Agarosekonzentration benutzt. 30 ml wurden nach Abkühlen auf 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml), in eine Gelkammer gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Gelkammer wurde mit 0,5 x TBE-Puffer befüllt, so dass das ganze Gel bedeckt war. 2 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl 10 % Ladepuffer versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde im Spannungsbereich von 80-100 V durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 254 nm als Banden sichtbar, und das Gel konnte auf dem UV- Transilluminator analysiert werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte über den Vergleich mit der 100-bp-Leiter als Längenstandard. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

Probenpuffer 15% Ficoll 400 (w/v)

200 mM EDTA

0,1% Orange G (w/v)

2.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Näpfe einer Millipore-MAHV N45-Platte wurden mit 4 g Sephadex-G-50-Pulver gefüllt. Nach Zugabe von 3 x 100 μ l dH₂O wurde das Pulver entweder 3 h bei RT oder über Nacht im Kühlschrank quellen gelassen. Nach Zentrifugation der Platte bei 910 x g für 5 min sowie Zugabe von weiteren 100 μ l dH₂O wurde erneut 5 min bei 910 x g zentrifugiert.

Nachdem die Sequenzreaktionen auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt waren, wurden diese verdünnten Sequenzierprodukte nun auf die Mitte der gequollenen Sephadex-Säulen überführt. Es wurde ein letztes Mal 5 min bei 910 x g zentrifugiert, wobei das Filtrat in einer 0,2-ml-96-well PCR-Platte aufgefangen und entweder direkt in den Megabace Sequenzierer überführt oder bei -20 °C gelagert wurde

2.2.8 Klonierung aufgereinigter PCR-Produkte

2.2.8.1 Ligation von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten

Die Ligation von PCR-Produkten erfolgte in den pGEM-T-Easy-Vektor der Firma Promega. Dies wurde ermöglicht durch die in den PCR-Ansätzen verwendete Taq-Polymerase, die während der Elongationszyklen ein einzelnes Desoxyadenosin am 3'-Ende der amplifizierten Fragmente anfügt. Die Vektoren hingegen weisen an den geöffneten Insertionstellen ein 3'-überhängendes Thymin auf, welches dann eine Thymin-Adenin-Ligation ermöglicht. Für die Ligation wurde ein 10-µl-Ansatz zusammenpipettiert, der das zu klonierende DNA-Insert in einem 4-5fach molaren Überschuss, bezogen auf die Vektormenge, enthielt. Der Ligationsansatz wurde nach Angaben des Herstellers 16 h bei 4°C inkubiert. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

0,05-0,5 μg Vektor-DNA 1-3 μl Insert-DNA 1 μl 10x Ligationspuffer 1 μl T4-DNA-Ligase ad 10 μl H₂O.

2.2.8.2 Transformationen von Plasmiden in kompotente E. Coli Zellen

DNA-Insert enthaltende Vektoren wurden in E.coli-DH5α-Bakterienstämme transformiert, um ausreichend vermehrt werden zu können. Hierfür wurden 50 µl Aliquots kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und dem Ligationsansatz zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde dann für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte eine Schockerwärmung für 30 sec in einem Thermoblock. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte dann eine Zugabe von 400 µl SOC-Medium. Der Transformationsansatz wurde dann für 90 min bei 37°C inkubiert und bei 2000 x g und Raumtemperatur 3 min zentrifugiert. Nach Verwerfung von 300 µl des Überstandes wurde das Sediment im Rest des Ansatzes resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Nach ca. 16 h wurden dann die transfektierten (weiß) Kolonien gepickt und diese für das Animpfen von Minipräparationsansätzen benutzt.

2.2.9 Sequenzierung von PCR-Produkten

2.2.9.1 Sequenzreaktion

Die Sequenzierung erfolgte im automatischen Megabace-Sequenzierer (Amersham Pharmacia Biotech,Freiburg). Für die Sequenzreaktion wurden 500 ng aufgereinigtes PCR-Produkt und 10 pmol Primer mit 3 µl DYEnamic[™] ET terminator cycle sequencing Mix versetzt und auf ein Volumen von 10 µl mit H₂O aufgefüllt. Dieser Mix enthält dNTPs, fluoreszenzmarkierte dNTPs, Ampli-Taq-Polymerase und

Reaktionspuffer. Nach 15 min Vordenaturierung bei 95°C durchliefen die Proben für 25 Zyklen folgendes Programm im Primus-96-Thermocycler:

Denaturierung	30 sec 95°C
Annealing	30 sec 55°C
Elongation	2 min 60°C
Aufbewahrung	~ 4°C.

2.2.9.2 Aufreinigung von Sequenzierprodukten für den Megabace Sequencer

Die Kammern einer Millipore-MAHV N45-Platte wurden mit Sephadex-G50-Pulver gefüllt. Das Sephadex wurde nach Zugabe von 300 μ l H₂O für 3 h bei Raumtemperatur oder für 24-48 h im Kühlschrank quellen gelassen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation der Platte bei 910 x g und Zugabe von jeweils 100 μ l H₂O wurde erneut für 5 min bei 910 x g zentrifugiert.

Nachdem die Sequenzreaktionen mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt worden waren, wurden diese verdünnten Sequenzierprodukte nun in die Mitte der gequollenen Sephadex-Säulen überführt. Es wurde erneut bei 910 x g zentrifugiert und das Filtrat wurde in der MICROSEAL Mikrotiterplatte aufgefangen und direkt in den Sequenzer überführt oder bei -20°C gelagert.

2.2.9.3 Automatische Sequenzierung

Die nichtradioaktive Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) und wurde mit Systemen von Amershan Pharmacia Biotech durchgeführt. Dabei werden die doppelsträngigen DNA-Fragmente denaturiert und ein Sequenzprimer lagert sich an. Neben den dNTPs, Reaktionspuffer und Ampli-Taq-DNA Polymerase enthält das Sequenzkit auch ddNTPs. Diese sind mit verschiedenfarbig fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Der Einbau von diesen fluoreszenzmarkierten dNTPs in den DNA-Strang führt zum Kettenabbruch, so dass anhand unterschiedlicher Fluoreszenz nach Anregung mit einem Argonlaser die Base bestimmt und anhand unterschiedlicher Lauflängen im Sequenzgel die Position der Basen zugeordnet werden kann. Nach der Sequenzanalyse wurden alle gefundenen Sequenzvariationen nach den Dunnen und Antonarakis (2000) charakterisiert.

2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Zur Minipräparation wurden 5 ml LB-Medium, dem ein entsprechendes Selektivantibiotikum (Ampicillin) zugesetzt war, in ein 10-ml-Falcon-Cup gegeben und mit einer einzelnen Bakterienkultur angeimpft. Dieser Prozess wurde für 10 gepickte Kolonien wiederholt. Anschließend wurden die 10 Ansätze bei 37°C für 16 h in einem Wärmebrutschrank inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 4°C für 20 min in einer Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden die Bakterienzellen durch Zugabe von 200 µl des Puffers P2 lysiert. Daraufhin erfolgte durch Zugabe von 150 µl des Puffers P3 eine Neutralisation des Ansatzes. Die durch diesen Schritt präzipitierten Zellproteine und Zellmembranbestandteile sowie die gebundene genomische Bakterien-DNA wurden durch eine sich anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 x g für 30 min sedimentiert, während die Plasmid-DNA

im Überstand gelöst blieb. Dieser Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe des dreifachen Volumens kalten Ethanols erneut für 15 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und jeweils für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde daraufhin bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl Ampuwa aufgenommen.

Der pGEM-T-Easy-Vektor enthält eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI. Da durch den Einbau des DNA-Inserts in den Vector eine zweite Schnittstelle für dasselbe Enzym entsteht, konnten durch einen Restriktionsverdau (s. 2.2.5) eventuelle Vektoren ohne DNA-Insert von der Sequenzreaktion ausgeschlossen werden. Die präparierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.11 Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting

Mit Hilfe des Southern-Transfers werden DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Um die DNA unter dem UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Elektrophorese zuerst für 10 min in 500 ml Laufpuffer mit 50 µl Ethidiumbromid gefärbt. Danach wurde es in 500 ml 0.25 M HCl depuriniert, für 30 min in Denaturierungslösung überführt und dann für 45 min in Neutralisierungslösung behandelt. Die so behandelte einzelsträngige DNA wurde durch ein modifiziertes Kapillarblotting-Verfahren mit einem Turbo Blotter™ der Firma Schleicher & Schüll Hybond C-Nitrozellulose auf eine Membran mit nukleinsäurebindenden Eigenschaften übertragen und durch zweistündige Inkubation bei 80°C oder durch "Crosslinken" mit UV-Licht (UV Stratalinker™1800, 254 nm, 120 mJ) auf dem Filter fixiert. Der Southern-Blot wurde den Herstellerangaben folgend mit 20x SSC als Transferpuffer durchgeführt und erfolgte standardmäßig bei Raumtemperatur über Nacht. Nach dem Transfer wurde der Filter kurz in 2x SSC-Puffer gespült, getrocknet und durch "Crosslinken" oder Inkubation für 2 h bei 80°C kovalent auf dem Filter fixiert.

2.2.12 Radioaktive Markierung von DNA, Hybridisierung membrangebundener RNA und Random-Prime-Markierung

Der RediPrime Kit II (GE Healthcare, München) wurde für die Markierung von DNA-Fragmenten mit α - [32P]-Isotopen verwendet. Die Methode basiert auf dem Prinzip des random priming, welches von Feinberg and Vogelstein entwickelt wurde. Der Reaktionsmix enthält dATP, dGTP, dTTP, Klenow Fragment (4-8 U) und zufällige Oligodeoxyribonukleotide, hauptsächlich 9-mere. 25-50 ng der Sonden-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 46 µl bei 95°C für 3-5 min denaturiert. Die Probe wurde dann in das RediPrimeTM- Reaktionsgefäß überführt, gut gemischt, und zum Schluss wurden 4 µl von α -[32P]-dCTP (40µCi) zum Reaktionsmix zugegeben. Die Markierungsreaktion wurde bei 37°C 30-60 min durchgeführt. Die markierte DNA wurde anschließend mit Hilfe von MicroSpin-S-200HR-Säulen (Amersham) aufgereinigt. Die spezifische Aktivität der DNA-Probe wurde im Szintillationszähler (Tri-Carb 4530, Packard Instruments, Warrenville, USA) gemessen. Sie lag in der Regel zwischen 4 x 108 und 5 x 109 cpm/µg DNA.

2.2.13 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die fixierten Nitrocellulosefilter mit darauf gebundener DNA wurden für mindestens 1 h bei 65°C in Rapid Hyb Puffer (Amersham) im Rollofen (Bachofer, Reutlingen) prähybridisiert. Anschließend wurden die denaturierte Sonde sowie 300 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter denselben Bedingungen wie die Prähybridisierung. Die Filter wurden danach 15 min in Waschlösung I bei Raumtemperatur, 15 min in Waschlösung II bei 65°C und 2-5 min in Waschlösung III bei 65°C gewaschen. Die noch feuchten Membranen wurden zur Auswertung mit einem Röntgenfilm in einer Autoradiographie-Kassette bei –70°C oder mit einer Phosphor-Imagermembran (Bio-Rad, Hercules, USA) bei RT exponiert. Die Phosphor-Imagermembran wurde anschließend in einem Phosphor-Imager (Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad, Hercules, USA) mit Hilfe der Quantity One-Software analysiert.

2.2.14 Computeranalysen

Zum Entwerfen der Oligonukleotidsequenzen wurde das Program "Primer 3", verfügbar bei http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi verwendet. Zur Überprüfung der Spezifizität der Primer wurde der "Genome Browser", verfügbar über http://gamesfiles.giga.de/redirect/green_relatedlink.php?rellink=http%3A%2F%2Fgen ome.ucsc.edu verwendet. Die theoretische Auswirkung der "splice-site"-Mutationen auf mRNA Ebene wurde mittels des "splice-site predictors NNSPLICE, Version 0,9" (Januar 1997) kontrolliert (http://www.fruitfly.org/seq tools/splice.html). Zum

Vergleich von Nukleotidsequenzen wurde das Programm "BLAST search" von NCBI, verfügbar über http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html, benutzt.
3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 33 Indexpatienten mit der klinischen Morbus (Hereditäre Verdachtsdiagnose eines Osler Hämorrhagische Teleangiektasie, HHT) molekulargenetisch untersucht. Bei den untersuchten Patienten handelt es sich sowohl um familiäre als auch um nicht-familiäre Fälle. Als klinische Diagnosekriterien wurden die sog. Curaçao-Kriterien herangezogen (Shovlin et al. 2000). Zu diesen Kriterien gehören erstens spontan einsetzendes und wiederholtes Nasenbluten, zweitens Teleangiektasien an charakteristischen Stellen (Lippen, Finger, Nase, Mundhöhle) und drittens interne Läsionen wie gastrointestinale Teleangiektasien, pulmonale, hepatische, cerebrale oder spinale Malformationen. arteriovenöse Das vierte Kriterium ist die positive Familienanamnese, d.h. ein erstgradig Verwandter mit Morbus Osler nach den o.g. Kriterien.

Die Proben der in dieser Arbeit untersuchten Patienten stammen vor allem von Ärzten der Primärversorgung, wurden aber auch von auswärtigen Kliniken und Fachärzten für Humangenetik eingesandt. Als Untersuchungsmaterial wurde DNA verwendet, die entweder direkt an uns geschickt wurde oder aus Lymphozyten einer EDTA-Blutprobe isoliert wurde.

Die klinischen Daten der Patienten wurden entweder aus Arztbriefen entnommen oder aus Fragebögen, die an die überweisenden Ärzte geschickt wurden. Darin wurde auch nach dem Stammbaum der Patienten gefragt. Ergebnisse

3.2 Mutationsanalysen im Gen für Endoglin und im Gen für die Activin-A-Rezeptor-Typ-II-ähnliche Kinase 1

Die zwei wichtigen Gene, die im mutierten Zustand zu Morbus Osler führen können, sind: ACVRL1 kodiert einen TGF-β-Typ-I-Rezeptor, ist auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisiert (12g13) und besteht aus 10 Exons, wovon 9 das Protein kodieren (Vincent et al. 1995; Johnson et al. 1996). Endoglin, das zweite Gen, ist auf dem langen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert (9g33-34) und besteht aus 14 Exons (McAllister et al. 1994). Das Gen kodiert einen TGF-β-Typ-III-Rezeptor. In beiden Genen sind verschiedene Arten Mutationen beschrieben. von wie Leserasterverschiebungen ("frameshifts"), Basenaustausche ("missense"-, "nonsense"-Mutationen) und auch Veränderungen der Spleiß-Akzeptoren oder -Donatoren, die die hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie auslösen können. Mutationen im Endoglin-Gen sind verantwortlich für HHT Typ I, dem eine schwerere Verlaufsform sowie eine ausgeprägtere Lungenbeteiligung zugeordnet wird als dem HHT Typ II, der durch Mutationen in ACVRL1 ausgelöst wird (Shovlin und Letarte 1999).

Bei 75% der Patienten mit M.Osler werden Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 gefunden. Bei etwa 10 % der Fälle, bei denen durch die Sequenzierung keine Mutation gefunden werden kann, lassen sich größere Deletionen feststellen, die durch die quantitative Real-time PCR detektiert werden können (Cymerman et al. 2003; Bourdeau et al. 2000). Es wird vermutet, daß bei den restlichen Patienten eine Mutation in einem anderen Gen für die Erkrankung verantwortlich ist (Wallace und Shovlin 2000), und zwar auf Chromosom 5 und Chromosom 7 (Cole et al.2005, Bayrak-Toydemir et al. 2006). Bei den Patienten wurden alle Exons beider Gene und deren angrenzende Intronbereiche mittels PCR und direkter Sequenzierung, wie in 2.2.4.1 und 2.2.10 beschrieben, "forward" und "reverse" untersucht. Bei "frameshift"-Mutationen wurden die entsprechenden PCR-Produkte kloniert. Jede Sequenzvariation wurde entweder durch eine erneute Sequenzierung oder durch eine Restriktionsanalyse (2.2.5) bestätigt. Es wurden 10 neue Mutationen gefunden: 3 Deletionen, 5 "missense" Mutationen, 2 "splice-site"-Mutationen .

Zur Beschreibung der Mutationen wurde die empfohlene Nomenklatur von den Dunnen und Antonarakis (2000) verwendet.

Indexpatient	Familienangehörige	Symptome	Mutationen
24956 (61)	keine	E,T	keine
24958 (37)	+	E, T, M-AVM	ALK1, c.1208 T>C
24963 (43)		E,T	keine
24964 (41)		E,T	keine
24967 (1)		E,T,	ALK1, c.526-7 C>G
24969 (48)		E,T	ALK1 c.1221 G>T
24970 (53)	+	E,T, GI-AVMs	ENG,c.392
			C>T,Del.Ex.1
24972 (24)	+	E,F	keine
24982 (52)		T, GI-Blutung, E	keine
24988 (51)	+	E, T, F, pAVMs	ALK1,c.1031 G>A
24991 (13)		E,T	keine
24992 (1)		n.B	ENG,c.572 G>A
24995 (32)	+	E,pAVMs, F	ALK1,c.793 A>C
26500 (40)		E,N-AVMs	keine
26501 (10)		E,T	keine
26502 (55)		E,T,F	ALK1,c.773-2A>C
26505 (65)	+	E,GI-Blutung	keine
26507 (64)		E,T, F	ALK1,c.197 A>C
26508 (64)	+	E, T, pAVMs,	ALK1,c.698 C>T
26515 (58)	+	E, T, h-AVMs	ALK1,c.199 C>T
26516 (20)		Mehrere Totgeburten	keine
26517 (24)		h-AVMs	keine
26522 (37)		E,T	ENG,c.277 C>T
26523 (25)	+	T,F	ENG,c.572 G>A
26524 (39)	+	E, T, AVMs, F	ENG,c.1428 G>A
26526 (34)		E,T, F	ALK1,c.1048+5G>A
26530 (64)		E, h-AVMs	ENG,c.207 G>A
26531 (64)	+	E, T, F	ALK1,c.1178delA
26539 (36)		E,T	ENG,c.1712delG
26540 (14)		E	ENG,c.572 G>A
27917 (63)			ALK1,c.946-48del
			GAG
27926 (44)		E, T, h-AVMs	ALK1,c.1202 T>C
27910 (56)			ENG,c.1646 G>C

 Tab. 3.1: Liste der Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Mutationslokalisation

 auf der genomischen Ebene und die Symptomatik der betroffenen Patienten

E: Epistaxis, T: Teleangiektasien, AVM: Arteriovenöse Malformation, P: pulmonal, AB: intraabdominal, M: Milz, GI: gastrointestinal, H: hepatisch, F: familiär. Die Zahlen in den Klammern bezeichnen das Alter der Patienten

3.2.1 Mutationen im Endoglin-Gen



Abb. 3: Mutationen im ENG-Gen: bei 9 Indexpatienten mit Symptomen eines M.Osler wurden
Mutationen im ENG-Gen gefunden. Es wurden 4 "Missense"-, 2 "Frameshift"-, 1 "Nonsense"-,
1 "Splice-site"-Mutationen und 1 Polymorphismus gefunden.

Patientin 24970

<u>Zur Klinik :</u>

Die Patientin 24970 (II/2) klagt über zeitweise tägliches Nasenbluten und ausgeprägte Teleangiektasien im Gesichtsbereich. Außerdem sind gastrointestinale AVMs festgestellt worden. Ihre Tochter (III/3), 25 Jahre alt bei der Geburt der Tochter (IV/2), zeigte zu dem Zeitpunkt keine Symptomatik. Bei ihr traten jedoch ein Jahr später spontane Epistaxen auf. Bei darauffolgenden dermatologischen Untersuchungen waren keine Schleimhautteleangiektasien zu erkennen. Die schwerstbetroffene Enkelin (IV/2) der Index-Patientin zeigte erstmals Nasenbluten im

Alter von 3 Wochen. Nach einer weiteren Episode von Epistaxis im Alter von 14 Wochen wurde das Kind beim Kinderarzt vorgestellt. Bei der Vorstellung war das Kind zyanotisch und die O₂–Sättigung betrug 75%. Die radiologische Untersuchung zeigte eine Herzhypertrophie (Abb. 3.3). Ein zyanotischer Herzfehler wurde mittels Ultraschall ausgeschlossen. Sonographische Untersuchungen des Abdomens zeigten eine erhöhte Blutstromgeschwindigkeit in der Vena portae, was auf eine AV-Fistel zwischen A. lienalis und V.portae zurückzuführen war. Bei Herzkatheteruntersuchungen wurden multiple pAVMs festgestellt. Die zum Blocken der AV-Fisteln implantierten 21-Gauge-Coils verbesserten die Sauerstoffsättigung im arteriellen System auf 90%. Im Alter von 7 Monaten wurde eine Verödung nasaler Schleimhautgefäße durchgeführt. Wegen der gastrointestinalen Blutungen im Alter von 10 Monaten wurde eine endoskopische Untersuchung veranlasst, dabei stellten sich als Blutungsquelle AVMs im Colon ascendens heraus. Zerebrale Blutungen aufgrund von cAVMs waren die Ursache für Krampfanfälle im Alter von 21 Monaten. Vor dem 21. Lebensmonat haben sich die cAVMs klinisch nicht manifestiert, der Grund, weshalb bis dahin keine CTs oder angiographische Untersuchungen durchgeführt wurden. Nach der Feststellung der zerebralen AVMs wurde ein MRT der Wirbelsäule durchgeführt. Es wurde eine große AVM auf der 6. BWK-Ebene festgestellt (Abb. 4). Interessanterweise blieb die neurologische Symptomatik jedoch bland.



Ergebnisse

Abb. 4: <u>Links</u>: Die Röntgen-Thorax Aufnahme im Alter von 14 Wochen zeigt eine deutliche Herzhypertrophie. <u>In der Mitte</u>: Röntgen-Thorax Aufnahme im Alter von 20 Monaten: Z.n. multiplen Coil Implantationen. <u>Rechts</u>: T2 MRT-Aufnahme der Wirbelsäule im Alter von 2 Jahren zeigt eine große AVM auf der BWS6-Ebene.

Zur Molekulargenetik:



Abb. 5: Stammbaum der Familie der Index-Patientin 24970 (Pfeil). Zahlen in den Klammern bezeichnen das Alter der Patienten. E: Epistaxis, T: Teleangiektasien, AVM: Arteriovenöse Malformation, P: pulmonale, AB: intraabdominale, SP: spinale, GI: gastrointestinale

Bei der Indexpatientin II/2 konnten wir den Basenaustausch c.392C>T im Exon 4 des Endoglin-Gens feststellen. Diese Veränderung wurde in der Literatur als krankheitsverursachend beschrieben (Cymerman et al, 2003). Da diese Mutation in der genomischen DNA der anderen betroffenen Familienmitglieder nicht gefunden werden konnte, war davon auszugehen, dass der oben genannte Basenaustausch nicht für die Symptome des Morbus Osler bei der Indexpatientin verantwortlich ist. Da bei der Indexpatientin keine Mutation im ALK1-Gen nachweisbar war, wurden Southern-Blot-Analysen mit der DNA der Indexpatientin durchgeführt. Durch die Southern-Blot-Analyse konnten wir bei der Indexpatientin (II/2) und bei den anderen betroffenen Familienmitgliedern (III/3 und IV/2) eine 10064-Basen-Deletion des Endoglin-Gens, (einschließlich Exon 1 und ATG-Kodon) feststellen (Abb. 6).



Abb. 3.5: A, Southern-Blot-Untersuchung der genomischen DNA. Nach dem Verdau mit dem Enzym Sac1 ergibt das Wild-Typ Allel (wt) ein 6.9kb langes Fragment, während die DNA der Patientin IV/2 ein 6.9kb langes und ein 5.4kb langes Fragment ergibt. B, C, Deletions-spezifische Sequenzierung des betroffenen Allels bei der Patientin IV/2 stellt die 5'- und 3'-Regionen der Deletion (10064bp einschließlich Exon-1 mit ATG codon sind deletiert) und die heterozygote Mutation c.392C> T

im Exon-4 des Endoglin-Gens dar.

Eine ähnliche Mutation wurde bereits von Bossler et al. (2006) beschrieben und gilt als krankheitsverursachend. Da es kein alternatives ATG-Kodon gibt, vermuten wir, dass von dem Allel mit 10-kb-Deletion kein Protein gebildet wird .Weiterhin, die Deletion segregiert mit der Erkrankung, während die zuerst ermittelte Veränderung nicht segregiert. Wir stellten fest, dass die zwei Mutationen bei der Patientin II-(2) biallelisch sind und die c.392C>T-Veränderung höchstwahrscheinlich nicht krankheits- verursachend ist. Diese Veränderung wird nach der "HHT database" als seltener Polymorphismus bezeichnet.

Patient 26522

Patient 26522 ist das einzige Mitglied der Familie, das zur Untersuchung zur Verfügung stand. Er berichtete, dass er unter häufigem (2-3/Woche) Nasenbluten und im Gesicht liegenden Teleangiektasien leidet. Andere Familienmitglieder sollen nicht betroffen sein.

In Exon 3 des ENG-Gens wurde ein Basenaustausch an Position 277 festgestellt (c.277C>T, p.R93X). Durch diese "Nonsense"-Mutation entsteht anstelle der Aminosäure Arginin ein Stop-Codon (Abb. 7), was in einem verkürzten Protein resultiert. Diese Veränderung wurde bereits von Cymerman et al. (2000) beschrieben.



Abb. 7: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 26522. Der Pfeil bezeichnet den Basenaustausch

Patienten 26523 und 26540



Die Patientin 26523 (III/1) gab an, täglich unter Nasenbluten zu leiden. Außerdem seien sowohl ihr Vater (II/1) als auch ihr Großvater (I/1) betroffen gewesen und verstorben.

Abb. 8:Stammbaum der Familie der Index-Patientin 26523. Der Pfeil markiert die Indexpatientin. Zahlen in Klammern bezeichnen das Alter der Patienten

Die Patientin 26540 klagt über selten auftretende Epistaxis (5-6/Jahr). Die restlichen Familienmitglieder sind laut eigener Angaben völlig gesund.

Bei den beiden untersuchten Index- Patienten wurde eine Veränderung im Exon 5 des Endoglingens (c.572G>A, p.G191D) gefunden, die in der Literatur sowohl als Polymorphismus als auch krankheitsverursachend beschrieben ist. (Lesca et al.2004, Abdalla et al. 2005, Lenato et al. 2006). Durch diese Veränderung wird die Aminosäure Glycin an Position 191 durch Aspartat ersetzt. Diese Mutation ist in der "HHT Mutation Database" jedoch nur als Polymorphismus angegeben.

Patientin 26524

Die Patientin 26524 (II/1) klagt über schwer verlaufende Epistaxen alle 4 Wochen. Weiterhin wurden Teleangiektasien an den Lippen sowie gastrointestinale AVMs festgestellt. Ihre Tochter (III/1) hat ebenfalls Epistaxien sowie Teleangiektasien auf der Nase. Der Vater (I/1) der Patientin ist ebenfalls betroffen, genauere Angaben über die Symptome wurden jedoch nicht gemacht.



Abb. 9:Stammbaum der Familie der Indexpatientin 26524. Der Pfeil markiert die Indexpatientin. Die Zahlen in Klammern bezeichnen das Alter der Patienten



Abb. 10: Mutation ENG c.1428G>C bei der Patientin 26524 links: Sequenzanalyse, der Pfeil bezeichnet den Basenaustausch. rechts: Restriktionsverdau mit dem Enzym ApaLI. Durch die Mutation entsteht eine neue Schnittstelle für ApaLI.

Bei der Indexpatientin 26524 ergab die molekulargenetische Untersuchung eine c.1428G>C Veränderung im Exon 10 des Endoglingens (Abb.10). Durch diese Mutation kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Histidin an der Position 476 in der extrazellulären Domäne des Endoglins. Die Mutation ist in der "HHT Mutation Database" als krankheitsverursachend beschrieben.

Patientin 26539

Die Patientin weist vereinzelte Teleangiektasien an den Fingern, den Lippen, der Zunge sowie der Nase auf, selten habe sie Epistaxis. Sie sei nach eigenen Angaben die einzige Betroffene in ihrer Familie.

Die molekulargenetische Untersuchung ergab eine c.1712delG Veränderung im Exon 12 des Endoglingens. (Abb. 11)



Abb. 11 Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von der Patientin 26539.Der Pfeil bezeichnet die Deletionsstelle.

Durch die Mutation kommt es entweder zu einer mRNA, die aufgrund des vorzeitigen Stopcodons instabil ist (nonsense mediated decay of mRNA) oder zu einem Protein, in dem die intrazelluläre Domäne, die Transmembrandomäne und der größte Teil der extrazellulären Domäne fehlen. Da entweder kein Protein gebildet wird oder ein Protein entsteht, welches sich in die Zellmembran nicht integrieren kann, wird die Mutation als krankheitsrelevant angesehen.

Patient 27910

Der Patient 27910 ist sehr stark betroffen. Zum einen leidet er unter fast täglichem Nasenbluten und unter vereinzelten Teleangiektasien an der Mundschleimhaut, zum anderen sind bei ihm multiple pulmonäre und gastrointestinale arteriovenöse Malformationen beschrieben. Es seien keine weiteren Betroffenen in der Familie vorhanden.

Bei dem Patient konnte eine Mutation c.1646 G>C in Exon 11 des Endoglingens identifiziert werden. Dadurch wird an Position 549 die Aminosäure Cystein durch Serin ersetzt (p.C549S). Diese Mutation wird in dieser Arbeit erstmalig beschrieben und war in 50 Kontrollen nicht nachweisbar.



Abb. 12: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 27910. Der Pfeil bezeichnet den Basenaustausch.

3.2.2 Mutationen im ACVRL1-Gen



Abb.13: Mutationen im ACVRL1-Gen: bei 13 Indexpatienten mit Symptomen eines M.Osler wurden Mutationen im ACVRL1-Gen gefunden. Es wurden 8 "Missense"-, 2 "Frameshift"- und 3 "Splice-site"- Mutationen gefunden

Patientin 24958

Patientin 24958 (II/2) zeigt rezidivierende, spontane Epistaxen. Darüber hinaus sind Teleangiektasien und spinale AVMs bei der Patientin bekannt. Außerdem sei ihr Vater (I/1) auch betroffen. Ihr Sohn (III/2) und eine Tochter (III/3) leiden unter Nasenbluten, die Tochter III/1 war bis zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei.



Abb. 14:

Stammbaum der Familie der Index-Patientin .Der Pfeil markiert die Indexpatientin. Zahlen in Klammern bezeichnen das Alter der Patienten

Bei der Patientin 24958 war wie auch bei der Tochter (III/3) und beim Sohn (III/2), die Mutation c.1208T>C in Exon 8 von ACVRL1 zu finden (Abb 14). Diese Mutation verursacht den Austausch der Aminosäure Leucin an Position 403 gegen Prolin (p.L403P). Diese Mutation wurde von Argyriou et al, (2006) Lenato et al. (2006) und Giordano et al. (2006) beschrieben und wurde bei 50 gesunden Kontrollen nicht gefunden.

Patientin 24967

Die Patientin klagt über zeitweise schwere Epistaxen. Teleangiektasien an Lippen, Fingern und auf der Zunge sind bekannt. Bei der Patientin konnten wir durch Sequenzierung der gelextrahierten Banden die Veränderung c.526-7C>G identifizieren. In der Gelelektrophorese sind 2 Banden zu sehen, sie entsprechen zum einen der Wildtypsequenz (s. Kontrolle), zum anderen sieht man eine kürzere Bande, die der Mutation zuzuordnen ist. Außerdem ist zu sehen, dass die kürzere Bande in dieser semiquantitativen Darstellung blasser ist als die für das Wildtypallel (Abb. 15). Das lässt darauf schließen, dass auch die Menge der aberrant gespleißten mRNA in vivo geringer ist. Wird die Sequenz des mutierten Allels transkribiert, so fehlt nach Prozessierung das Exon 4.



Abb. 15: RT-PCR mit ACVRL1-Primern der Patientin 24967 sowie bei Positiv- und Negativ-Kontrollen.



Abb. 16: oben: schematische Darstellung des relevanten Bereichs des ACVRL1-Gens, Mitte: das normalerweise erwartete Spleißprodukt, Lage der Primer sowie Länge des Amplikons, unten: das hier vorliegende Spleißprodukt, der senkrechte Pfeil bezeichnet die Lage der Mutation in Intron 4

Diese Veränderung wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben und konnte bei 50 gesunden Kontrollen nicht gefunden werden.

Patient 24969

Der Patient 24969 klagt über Epistaxen und an der Mundschleimhaut aufgetretene Teleangiektasien. Weitere Symptome eines M. Osler liegen nicht vor. Andere Familienmitglieder sind laut eigenen Angaben nicht betroffen.

Durch die molekulargenetische Untersuchung wurde bei dem Patienten eine Veränderung c.1221 G>T im Exon-8 des ACVRL1-Gens festgestellt. Diese Mutation verursacht den Austausch der Aminosäure Glutamat an Position 407 gegen Aspartat (p.E407D). Diese Mutation wurde bereits von Abdalla et al. (2000, 2003) und Kuehl et al. (2005) beschrieben und gilt als krankheitsverursachend.



Abb. 17: Mutation ACVRL1 c.1221G>T beim Patienten 24969. Der Pfeil bezeichnet den Basenaustausch.

Patient 24988

Bei dem Patienten 24988 (I/1) besteht eine Neigung zu Nasenbluten. Auch Teleangiektasien im Gesichstbereich und AVMs in der Lunge liegen vor. Die Tochter (II/1) des Patienten zeigt zwar keine Symptome des M.Osler, hat allerdings die Mutation von ihrem Vater geerbt (s. unten). Nach eigenen Angaben ist die restliche Familie nicht betroffen.



Abb. 18:Stammbaum der Familie des Index-Patienten 24988. Der Pfeil markiert den Indexpatient. Zahlen in Klammern bezeichnen das Alter der Patienten

Bei den beiden untersuchten Familienmitgliedern (I/1 und II/1) konnte die Mutation c.1031 G>A im Exon 7 des ACVRL1-Gens identifiziert werden. Sie führt zu dem Austausch der Aminosäure Cystein an Position 344 gegen Phenylalanin (p.C344Y). Diese Mutation wurde bereits von Abdalla et al. (2000) und Olivieri et al. (2002) beschrieben und gilt als krankheitsverursachend.

Patientin 24995

Die Patientin 24995 (II/2) in der Abb. 19 zeigt rezidivierende, spontane Epistaxen. Teleangiektasien sind nicht bekannt. Lungen-AVMs sind bei ihr festgestellt worden. Die Mutter (I/3) leidet auch unter Epistaxis, pulmonale AVMs sind bei ihr nicht bekannt. Die Zwillingsschwestern der Patientin (II/3, II/4) sowie der Cousin (II/1) und der Onkel (I/2) zeigen keine Symptome eines M.Osler.



Abb. 19:Stammbaum der Familie der Indexpatientin 24995. Der Pfeil markiert die Indexpatientin. Zahlen in Klammern bezeichnen das Alter der Patienten

Bei der Indexpatientin (II/2) und bei ihrer Mutter (I/3) konnten wir einen Basenaustausch an Position 793 in Exon 7 des ACVRL1-Gens feststellen (c.793 A>C, p.T265P). Die Veränderung führt zum Austausch der Aminosäure Threonin durch Prolin an Position 265. Diese Veränderung wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben, sie wurde bei 50 Kontrollen nicht gefunden.

Patientin 26502

Die Patientin 26502 ist das einzige Mitglied der Familie, das für die Untersuchung zur Verfügung stand. Sie berichtete, dass sie unter häufigem Nasenbluten leidet und bei ihr Teleangiektasien im Gesichtsbereich festgestellt wurden. Von den übrigen Familienmitgliedern ist lediglich bekannt, dass sie an M. Osler erkrankt sind, genauere Angaben über Symptome wurden nicht gemacht.

Durch die molekulargenetische Untersuchung konnten wir die Spleiß-Mutation c.773-2A>C vor dem Exon 7 des ACVRL1-Gens identifizieren (Abb. 20).Dadurch wird das siebte Exon des ACVRL1-Gens herausgespleißt und eine Leserasterverschiebung ausgelöst.

Diese Veränderung wurde bereits von Lesca et al. (2004) beschrieben.



Abb. 20: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von der Patientin 26502 (oben) und der Wildtypsequenz (unten), der Pfeil bezeichnet den Basenaustausch

Patient 26507

Der Patient 26507 klagt über Epistaxen und Teleangiektasien an der Mundschleimhaut. Weitere Symptome eines M. Osler liegen nicht vor. Über andere Familienmitglieder liegen keine Daten/Angaben vor.

Bei diesem Patienten wurde ein Basenaustausch in Exon 3 des ACVRL1-Gens festgestellt. Durch die Mutation c.197A>C (Abb. 21) kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Histidin durch Prolin an Position 66 (p.H66P). Diese Mutation wurde bereits von Lenato et al. (2006) beschrieben und gilt als krankheitsverursachend.



Abb. 21: Mutation ACVRL1 c.197A>C beim Patienten 26507. Der Pfeil bezeichnet den Basenaustausch.

Patient 26508

Der Patient 26508 (II/2) klagt über fast tägliches Nasenbluten und weist zahlreiche Teleangiektasien auf. In der Lunge wurden AVMs diagnostiziert. Die Schwester (II/1) des Patienten leidet lediglich unter gelegentlich auftretenden Epistaxen. Der Sohn (III/1) zeigt keine Symptome eines M.Osler. Vom Vater (I/1) des Indexpatienten ist lediglich bekannt, dass er auch betroffen war, genauere Angaben über Symptome wurden jedoch nicht gemacht.



Abb. 22:Stammbaum der Familie des Index-Patienten 26508. Der Pfeil markiert den Indexpatient. Zahlen in Klammern bezeichnen das Alter der Patienten

Bei dem Patienten 26508 konnten wir eine Veränderung im Exon 6 des ACVRL1-Gens feststellen. Es handelt sich dabei um einen Basenaustausch (c.698C>T), der zum Austausch der Aminosäure Serin durch Leucin führt (p.S233L). Die Mutation konnte bei der untersuchten Schwester und dem Sohn nicht gefunden werden. Diese Mutation wird in dieser Arbeit erstmalig erwähnt und war bei 50 Kontrollen nicht nachweisbar (Abb. 22).

Patientin 26515

Die Patientin 26515 (II/2) klagt über zeitweise tägliches Nasenbluten und ausgeprägte Teleangiektasien, arteriovenöse Malformationen in der Leber sind auch

bekannt. Ihre Schwester (II/3) schilderte eine ähnliche Symptomatik. Ein Sohn der Indexpatientin (III/1) sowie seine Cousine mütterlicherseits (III/3) leiden unter nicht näher bezeichnetem Nasenbluten. Teleangiektasien sind nicht bekannt. Der Vater (I/1) der Indexpatientin sei auch betroffen gewesen und verstorben (Abb.23).



Abb. 23:Stammbaum der Familie der Index-Patientin 26515. Der Pfeil markiert die Indexpatientin. Zahlen in Klammern bezeichnen der Alter der Patienten

Bei der Indexpatientin (II/2), ihrem Sohn(III/1), ihrer Schwester (II/3) wie auch bei dem Neffen (III/3) konnten wir die Mutation c.199C>T im Exon 3 des ACVRL1-Gens identifizieren. Sie führt zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Tryptophan an Position 67 (p.R67W). Die o.g Mutation wurde bereits von Olivieri et al. (2002) beschrieben.

Patient 26526

Der Patient 26526 schilderte eine typische Anamnese eines M. Osler mit regelmäßigem Nasenbluten und Teleangiektasien im Gesichtsbereich. Außerdem soll es weitere betroffene Personen in seine Familie geben, von denen jedoch weder

weitere Daten noch Blutproben erhalten werden konnten. Bei diesem Patienten konnten wir durch Sequenzierung die Veränderung c.1048+5G>A identifizieren(Abb. 24 und 25).



Abb. 24: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 26526,Exons 6 und 7 des ACVRL1-Gens.



Abb. 25: Mutation ACVRL1 c.1048+5G>A beim Patienten 26526 und deren Lokalisation auf genomischer Ebene.

Um die Auswirkung der "splice-site"-Mutation im ACVRL1-Gen beim Patienten 26526 festzustellen, wurde eine RNA-Analyse durchgeführt. Die RT-PCR Bedingungen entsprachen denen für den Patienten 24967. Nach der PCR (Abb. 26) und der Sequenzierung ließ sich kein aberrantes Spleißprodukt nachweisen.



Abb. 26: RT-PCR an RNA des Patienten 26526.

Da auch hier die durchgeführten Computeranalysen (2.2.14) keine alternative "splicesite"-Stelle ergaben, wird derselbe pathogenetische Mechanismus wie beim Patienten 24967 vermutet (s. Abb.15), d.h. dass das aberrante Transkript abgebaut wird. Auch diese Mutation wurde vorher noch nicht beschrieben und war bei 50 gesunden Kontrollen nicht vorhanden.

3.3 Untersuchung der Promotorregion des Endoglin-Gens

Bisherige Studien am Endoglin-Promotor in verschiedenen Zelllinien haben gezeigt, dass die Transkription an Sequenzen der DNA beginnt, die TATA - und CAAT- arm sind. Dieser Promotorabschnitt besitzt GC-reiche Regionen und Konsensusmotive für mehrere Transkriptionsfaktoren, einschließlich Sp1, Ets, GATA, AP2 und TGF-ß. Ein Endoglin-Sequenzvergleich bei 3 Säugetierspezies: Mensch (*Homo sapiens*), Hund (*Canis familiaris*), Maus (*Mus musculus*) und Opossum (*Monodelphis domestica*) zeigt multiple hochkonservierte (mehr als 50%) Regionen sowohl in 5' als auch in 3' Richtung des Endoglin-Gens.(Abb.27). ADD. 27:Schematische Darstellung des Endoglinvergleiches von Hs (Homo sapiens),

Cf (Canis familiaris), Mm (Mus musculus) und Md (Monodelphis domestica).

Kodierende Abselferbandes fort dargestellt, nichtkodierende in blau.



58

Die E3 Region (-507 bis -24) in Abbildung 3.26 entspricht der Promotorregion des Endoglins. Die Sp1-Konsensusstelle an der Position -386 (Abb.28. Bp Nummerierung relativ zum Translationstart) ist für die basale Transkription in vitro notwendig. Es gibt 4 hochkonservierte Ets-Faktorbindungstellen an der Position -415, -369, -359 und -37, die für die Transkriptionsaktivität des Promotors notwendig sind.

Abb. 28:Nucleotide sequence alignment" der Promotorregion (E3) des Endoglingens.

Mensch: Hs, Hund :Cf, Maus : Mm, Opossum : Md.Hochkonservierte Ets Bindungsstellen Ergebnisse sind in Schwarz markiert (1-4), andere konservierte Stellen in Grau (Pimanda et al. 2006)

	- 507		
hs: cf: mm:	CTTGGGGAGACAAGCCTAGAGCCTGGGCCCTCCCACCCC - ACTGCCTCCCCCCATCCCAGG CATAGGGAGACCAGCCTGGAGCCTGGGCCCTCCCACTCCCC CATGGGGGAGGTCTGTTCCTGGGCCCTCCCATCACCCTACCTCCCCATCCCAGG	11	60 41 54
md:	ria h	÷	-
hs: cf: mm: md:	GCCCCCCACCAGCGACAAAGCCCGTGG A TICC ACCCGGT A CCG TGG -CCCCCCACCCAGCGACAAAGCCCGTGG A TICC GCGTGCC A CC TGG GCCCCCACCCAGCGACAAAGCCCGTGG A TICC ACTCGCC A CC TGG CCCCCCACCCAGCGACAAAGCCTGTGG A TICC ACTCGCC A CC TGG A TICC TCCATT T TG ACC	1 1 1	122 102 116 34
hs: cf: mm: md:	- ACCOUNT CANCER AND CONTROL OF A TRACCOUNT CONTROL CONTROL CONTROL CONTROL OF A TRACCOUNT AND	* * * *	183 158 173 95
hs: cf: mm: md:	AATALLA A CONTRACTS CCTG TGCCGGTCATALLA A CONTRACTG C	* * * *	223 203 213 146
hs: cf: mm: md:	CGC CTGC CAEG" - CTGCTGCTGTCACTG CATC CATC CCCAC C CGC CCTGCCGCTGCCGCCT CGCCTCCACC TGTCCCGT CCCAC C A G CCGCCGACAGCTGCTGC C AGC TTGA A A A CTCTTTCTCTCCCCTCT TCTCCCCTCTCCCGCCTTTCTC		263 251 256 203
hs: cf: mm: md:	GGAGG AGCAC O CTC CCC CCAT CTTCGGACAGCAACT AGCC AG CCCGCGT C AGGCC GGCAC C CGC CTG TCAT CTCTGG-CCGTGACC CGGC GG CCGGCGC C AGAGC AGTGA T TTT CCA CACC AGTCAGCTAGAGACT TGCC TG TGTGAGT T TTTCT AACAA C CAC AGG TCAC CTCCCCTGTTC CCTGA AT ATCTCAT C	* * * *	325 312 318 261
hs: cf: mm: md:	CTGTGT A TO TO A CC G GG G G CC ACADOCTODADC CTGTGC A TT TC TA CC CC G G CC ACADOCTODADC C-GAGC A TT TC TA TT CC G G CC CC ACADOCTODADC TTCCTG TT CC TA TT CC CC C ACACTTCCCCAA C TTGACADOCTODADC	1 1 1	375 362 367 323
hø: cf: mm: md:	A C C T C C G C C C C C C C C C C C C C C	1 1 1	437 424 429 385
hs: cf: mm:	CGGTGC GG CC AG CTG CA TCH CT AGAT AF C AGC : 484 CCACAC A C AG CTG C CTC CA CGAT C C GT : 471 CGGCGC G C AG T A T TT TT TA CGAT C C AGC : 476 CCACAC A C AG C AG C C C C C C C C C C C		

3.3.1 Etablierung der PCR-Bedingungen und der Sequenzanalyse für die Promotorregion

Bei dem unter 2.1.8.2 beschriebenen Patientenkollektiv handelt es sich um Patienten mit einem Morbus Osler oder mit Verdacht auf Morbus Osler, bei denen keine Mutationen in den Genen ENG und ACVRL1 gefunden wurden. Bei diesen Patienten wurde daher eine Mutationssuche mittels PCR und Sequenzierung der Promotorregion des ENG-Gens vorgenommen. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt optimiert:

Denaturierung:	95°C	15 min
38 Zyklen von:		
Denaturierung:	95°C	30 sec
Anlagerung:	62°C	45 sec
Elongation:	72°C	60 sec.

Die Sequenzanalyse ergab bei allen Patienten ein unauffälliges Ergebnis.

3.4 Diagnostik auf cDNA Ebene

Es wurden eine Vielzahl an Methoden für das Screening auf Mutationen auf DNA-Ebene entwickelt, darunter Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus (SSCP), Denaturierung Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) und die direkte Sequenzierung. Doch jede dieser Methoden hat seine Grenzen: entweder eine geringe Sensitivität und Reproduzierbarkeit oder hohe Kosten und Schwierigkeiten bei der Durchführung. Aus diesen Gründen haben wir versucht, die HHT-Diagnostik auf die RNA-Ebene umzustellen. Zu diesem Zweck wurden 15 Patienten (Tab.3.2) mit gesichertem M.Osler und verschiedenen Mutationen ("Missense", "Nonsense", kleine Deletionen und "Splice-site"-Mutationen) ausgesucht. Die Patienten wurden gebeten, ihre EDTA-Blutproben an uns zu schicken. Die Blutentnahmen erfolgten durch die Hausärzte. Leider waren einige Blutproben bei Eingang nicht mehr für die RNA-Isolierung geeignet. Die Patienten wurden darüber telefonisch informiert.

Nummer	Lokus	cDNA	Тур	Sonstige
26522	ENG Ex 3	c.277 C>T	Nonsense	
24915	ALK1	c.526 G>T	Missense	
24934	ALK1 Fx 3	c.200.G>A	Missense	
24958	ALK1 Ex 8	c.1208.T>C	Missense	
24948	ENG Ex 8	c.1080-83 del	Frameshift	
22530*	ALK1 Ex 9	c.1346 C>T	Missense	
22576*	ENG Ex.6	c.751-53 del CTC	Frameshift	
24904	ENG Int.11	c.1687 A>C	Splice site	
22575*	ALK1 Ex.5	c.541-42 Ins A	Frameshift	
22579	ENG Ex.3	c.326-27 del TG	Frameshift	
24969	ALK1 Ex.8	c.1221 G>T	Missense	
24967	ALK1 Int.4	c.526-7C>G	Splice site	
26507	ALK1 Ex.3	c.197 A>C	Missense	
26508	ALK1 Ex 6	c.698 C>T	Missense	
26502	ALK1 Ex.7	c.773-2 A>C	Splice site	

Tab.3.2:Liste der Patienten, die um die Blutprobe für die RNA-Analyse gebeten wurden. Bei mit * markierten Patienten konnte wegen langer Transportzeit der Blutprobe keine RNA mehr präpariert werden.

3.4.1 Etablierung der RT-PCR-Bedingungen und Sequenzanalyse

Da die Sequenzierung von Amplikons, die größer als 500 bp sind, mit Schwierigkeiten verbunden ist, wurde die ACVRL1- cDNA in 4- und die ENG- cDNA in 5 Amplikons unterteilt und sequenziert.



Nach der RNA Isolierung mittels der unter 2.2.2 beschriebenen Methode wurden zur Durchführung von RT-PCR Reaktionen die in der Tabelle 2.1 erwähnten Primerpaare cDNAalk.1, 2, 3, 4 (Abb. 29) und cDNAendo.1, 2, 3, 4, 5 (Abb. 30) verwendet.



Abb. 29: ACVRL1- mRNA und Lage der RT-PCR Primer (Rot=Forward, Blau=Reverse).

cDNA



Abb. 30: ENG- mRNA und Lage der RT-PCR Primer (Rot=Forward, Blau=Reverse).

Die Bedingungen der RT-PCR wurden wie folgt optimiert:

Für ENG	:Denaturierung:	95°C	15 min
	35 Zyklen von:		
	Denaturierung:	95°C	30 sec
	Anlagerung:	62°C	45 sec
	Elongation:	72°C	30 sec

Für ACVRL1	:Denaturierung:	95°C	15 min
	35 Zyklen von:		
	Denaturierung:	95°C	30 sec
	Anlagerung:	62°C	30 sec
	Elongation:	72°C	30 sec

Durch diese Methode konnten wir folgende Mutationen nachweisen:

"Missense" Mutation c.197 A>C (ACVRL1, Exon 3)



Abb. 31: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 26507. Links Mutation auf DNA Ebene, rechts auf cDNA Ebene.

"Missense" Mutation c.1221 G>T (ACVRL1, Exon 8)



Abb. 32: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 24969. Links Mutation auf DNA Ebene, rechts auf cDNA Ebene.

"Nonsense" Mutation c.277 C>T (ENG, Exon 3)



Abb. 33: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 26522. Links Mutation auf DNA Ebene, rechts auf cDNA Ebene.

"Spleiß"-Mutation c.1687-2A>C



Abb. 34: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm von Patient 24904. Exon 12 des ENG-Gens fehlt.

Mithilfe des hier dargestellten Verfahrens konnten wir zwar 3 verschiedene Mutationsarten ("missense", "nonsense" und "splice-site") nachweisen, jedoch nicht die "Frameshift" Mutationen.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden 33 Index-Patienten, bei denen der klinische Verdacht auf Morbus Osler bestand, auf Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 untersucht. Sämtliche kodierende Exons mit angrenzenden intronischen Bereichen wurden dabei molekulargenetisch analysiert. Standen Angehörige der Indexpatienten zur Verfügung, wurden auch diese molekulargenetisch untersucht.

Von den 33 Index-Patienten konnten bei 22 krankheitsauslösende Mutationen identifiziert werden. Davon befinden sich 13 im Gen für ACVRL1, davon 8 "Missense"-Mutationen, 2 "Frameshift"-Mutationen und 3 "Splice-site"- Mutationen. Im Gen für Endoglin befinden sich 9 Mutationen, davon 5 "Missense"-, eine "Nonsense"- Mutation, eine "Splice-site" Mutation und 2 Deletionen.

4.1 Mutationen in den Genen für ACVRL1 und Endoglin als Ursache für Morbus Osler

Das Mutationsspektrum in den Genen für Endoglin und ACVRL1 ist sehr heterogen. So wurden in den vergangenen Jahren weit über 600 verschiedene, über die beiden Gene verteilte Mutationen detektiert und publiziert, (www.hhtmutation.org), (Abb. 35).

Diskussion



Abb. 35: Verteilung der publizierten Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1. a): Oben, Domänen von Endoglin. Unten: Schematische Darstellung der Endoglin-Mutationen berichtet zu <u>www.hhtmut.org</u>. b): Oben, Domänen von ACVRL1, Schematische Darstellung der ACVRL1-Mutationen berichtet zu <u>www.hhtmut.org</u>

Da das Mutationsspektrum sehr breit gefächert ist, sind kaum Patienten bekannt, die dieselbe Mutation tragen. Für die Leeward-Inseln der niederländischen Antillen wurde zum einen die wohl höchste Prävalenz (1:1639) des Morbus Osler beschrieben (Jessurun et al. 1993; Gallione et al. 2000), zum anderen konnte für die Mutation c.1238G>T, die bei 2 Familien auf der Inselgruppe und auch bei einer

Familie in den Niederlanden gefunden wurde, ein Founder-Effekt nachgewiesen werden (Gallione et al 2000). So liegen, mit Ausnahme einer solchen durch Founder-Effekte bedingten Häufung von bestimmten Mutationen, bei der großen Mehrzahl der M. Osler-Patienten sogenannte "private" Mutationen vor.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten konnte bei 2 Patienten (Patientin 26523 und Patient 26540) dieselbe Mutation im Gen für Endoglin identifiziert werden (c.572G>A; p.G191D). Diese Mutation wurde bereits in der Literatur erwähnt (Lesca et al. 2004, Abdalla et al. 2005, Lenato et al. 2006). Auch die Mutationen

c.1031 G>A, p.C344Y (Patient 24988), c.773-2A>C (Patient 26502), c.199C>T, p.R67W (Patient 26515), c.277C>T, p.R93X (Patient 26522), c.1428G>C (Patient26524), c.1712delG (Patient 26539), c.1221 G>T, p.E407D (Patient 24969), wurden bereits beschrieben (Abdalla et al. 2000, Cymerman et al. 2000, Olivieri et al. 2002, Lesca et al. 2004, Kuehl et al. (2005).

5 der in dieser Arbeit erstmals identifizierten Mutationen sind von Argyriou et al. (2006) unter meiner Ko-Autorenschaft publiziert worden(c.1208T>C, p.L403P (Patient 24958), c.526-7C>G (Patient 24967), c.793A>C, p.T265P (Patient 24995), c.197A>C, p.H66P (Patient 26507), c.698C>T, p.S233L (Patient 26508). Die restlichen 5 beschriebenen Mutationen, von denen 1 im Endoglin- und 4 im ACVRL1-Gen liegen, werden in dieser Arbeit erstmalig erwähnt. Um den kausalen Zusammenhang zwischen den bislang unbekannten 5 Mutationen in den Genen für ACVRL1 und Endoglin und dem Morbus Osler zu zeigen, wurden Sequenzanalysen bei 50 gesunden Kontrollpersonen sowie Segregationsanalysen in den Familien der Betroffenen oder "protein alignments" vorgenommen. Die 5 Mutationen wurden bei den Kontrollen nicht gefunden.

68

In den meisten, wenn nicht allen Fällen, führen Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 zu einem Verlust an funktionsfähigem Protein, der vom intakten, nicht mutierten Allel nicht ausgeglichen werden kann. Durch Expressionsanalysen an HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) und aktivierten Makrophagen konnte die Menge an Endoglin-Protein bei Patienten mit Mutationen im Gen für Endoglin festgestellt werden. Sie ist im Vergleich zu Normalpersonen um etwa 50% reduziert (Pece et al. 1997; Pece-Barbara et al. 1999; Shovlin und Letarte 1999; Bourdeau et al. 2000; Cymerman et al. 2000 und 2003; Paquet et al. 2001).

Viele der Mutationen, die im Gen für Endoglin als krankheitsauslösend identifiziert wurden, führen zu Leserasterverschiebungen und vorzeitigem Kettenabbruch. Da kein verändertes Protein nachgewiesen werden kann, wird als ursächlicher Mechanismus der sogenannte NMD (nonsense mediated decay) angenommen. Dieser ist dafür verantwortlich, dass veränderte und verkürzte mRNA nicht translatiert, und kein verändertes Protein synthetisiert wird (Pece et al. 1997; Bourdeau et al. 2000; Cymerman et al. 2003)

Diese Befunde unterstützen die Theorie, dass Haploinsuffizienz der prädominante, auslösende Mechanismus für den Morbus Osler ist (Pece-Barbara et al.1999; Cymerman et al. 2003).

4.2 Klinische Aspekte und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Es können große phänotypische Unterschiede innerhalb einer Familie mit derselben Mutation bestehen. Ein Beispiel bietet die Familie der Index-Patientin 24970, bei der gastrointestinale AVMs sowie Teleangiektasien im Gesichtsbereich und

Nasenbluten bestehen (Abb.3.4). Ihre Tochter (III/1) klagt nur über häufiges Nasenbluten. Bei der schwerstbetroffenen Enkelin (IV/2) der Index-Patientin wurden bereits im ersten Lebensjahr pAVMs und GI-AVMs, ein Jahr später zerebrale und spinale AVMs festgestellt. Die 10064-Basen-Deletion segregiert mit der Krankheit in der Familie, aber nicht die zunächst festgestellte Mutation (c.392C>T).

Da das betroffene Mädchen das einzige Mitglied der Familie mit stark ausgeprägter Symptomatik des M.Osler ist, sind wir davon ausgegangen, dass sie einen zusätzlichen modifizierenden Polymorphismus von ihrem Vater geerbt haben könnte. Daher haben wir auch den Vater auf der genomischen Ebene untersucht. Durch die Sequenzanalyse der Endoglin- und ACVRL1 Gene konnten wir jedoch keine Veränderung feststellen. Für das schwere Krankheitsbild bei der Patientin IV/2 Polymorphismus könnte eine Mutation oder ein in einem anderen krankheitsmodifizierenden Gen ("Modifier-Gen"), verantwortlich sein, die zusammen zu einem schwerer ausgeprägten Krankheitsbild führen als die Deletion alleine. Diese Hypothese, in unserem Fall für M.Osler postuliert, ist für andere Krankheiten nachgewiesen, wie z.B. beim M. Alexander (Nobuhara et al. 2004) oder bei der Zystischen Fibrose (Salvatore et al. 2002).

Ein weiteres Beispiel bietet die Familie der Index-Patientin 24995 (Abb.3.18, II/2), bei der spontanen Epistaxen und pulmonale AVMs bestehen, nicht aber bei ihrer Mutter (Patientin (I/3)), die dieselbe Mutation trägt.

Auch in der Familie der Indexpatientin 26515 (II/2, Abb.322) gibt es große phänotypische Unterschiede. Sowohl die Patientin II/2 wie auch ihre Schwester (Patientin II/3) haben fast tägliches Nasenbluten und Teleangiektasien. Arteriovenöse Malformationen in der Leber wurden nur bei der Patientin II/2

nachgewiesen. Ein Sohn (III/1) der Indexpatientin sowie seine Cousine mütterlicherseits (III/3) leiden nur unter nicht näher bezeichnetem Nasenbluten. Sowohl die Indexpatientin (II/2), ihre Schwester (II/3) als auch ihr Sohn (III/1) und seine Cousine (III/3) tragen dieselbe genetische Veränderung c.199C>T, p.R67W.

Die Suche nach Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beim Morbus Osler erweist sich als schwierig, da die Phänotypen von Patienten mit in der Regel unterschiedlichen und auch mit denselben Mutationen nur schwer miteinander vergleichbar sind. Im Prinzip lässt sich eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation am ehesten in Bezug auf Mutationen in den beiden Genen herstellen. So haben Patienten mit Mutationen im Gen für Endoglin eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine Lungenbeteiligung zu entwickeln (Letteboer et al. 2006; Bossler et al. 2006; Sabba et al. 2007) als Patienten mit Mutationen im Gen für ACVRL1. Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv war die Verteilung jedoch fast gleich. So zeigten 2 von 9 Familien mit Mutationen im Endoglin-Gen und 3 von 13 Familien mit Mutationen in ACVRL1-Gen eine pulmonale Beteiligung. Angesichts des hohen Risikos für eine paradoxe Embolie und für neurologische Komplikationen, die durch pAVMS verursacht und durch die Embolisierung verhindert werden können, werden für diese Läsionen Screeningprogramme empfohlen, auch wenn Patienten noch asymptomatisch sind (Moussouttas et al. 2006). Die Tatsache, dass kleine pAVMs häufiger in HHT2 Patienten vorhanden sind als in HHT1, diese aber bei einigen Patienten eine Größe erreichen, bei der die Embolisierung nicht mehr durchführbar ist, zeigt, dass sowohl bei HHT1 und HHT2 Patienten regelmäßige Kontrolluntersuchungen bezüglich pAVMs durchgeführt werden sollten.

71

In der Literatur wurde berichtet, dass hepatische arteriovenöse Malformationen bei Patienten mit ACVRL1-Mutationen häufiger auftreten als bei Patienten mit Endoglinmutationen. Für die Mutation c.199C>T; p.R67W beispielsweise konnte gezeigt werden, dass sie sehr häufig mit hepatischen AVMs vergesellschaftet ist (Argyriou et al. 2005). Familien mit dieser Mutation zeigen extensive Leberbeteiligung (Olivieri et al. 2002). Die Mutation c.1202T>C, p.F401S (Patient 27926) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben. Es wird über verschiedene Mechanismen diskutiert, die die Tendenz der Leber Richtung AVM Bildung in HHT2

beeinflussen: Die Leber kann bestimmte angiogene Faktoren produzieren, vor allem ACVRL1 spezifische, die auf parakrine Weise auf die Lebergefäße wirken. Arbeiten über die Bedeutung der parakrinen Signale in der TGF-β-Kaskade der Angiogenese im ENG, ALK-5 und TGFßRII wurden schon publiziert (Carvalho et al.2004). Eine CT-basierte Screeninguntersuchung der Leber ist geeignet um H-AVMs bei beiden HHT1 und HHT2 Patienten frühzeitig zu erkennen.

Das Wissen über den M.Osler wächst rasant. Allerdings sind weitere multizentrische Studien notwendig, um die Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp zu etablieren. Im klinischen Alltag ist die Diagnose des M.Osler in erster Linie auf die klinischen Befunde nach Curaçao-Kriterien basiert. Dennoch ist aufgrund der heterogenen Manifestationen der Erkrankung in vielen Fällen die klinische Diagnose schwierig.

4.3 M.Osler ohne Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1

DNA-Sequenzierungen von zahlreichen Forschungsgruppen rund um die Welt zeigen, dass die Mehrheit der HHT Patienten Mutationen in einem der beiden Gene für Endoglin oder ACVRL1 haben (Lesca et al. 2004, Abdalla et al. 2005, Kuehl et al. 2005, Schulte et al 2005, Letteboer et al.2006,). Die Mutationsdetektionsraten variieren zwischen 63 % bis 93% (Gallione et al.2006). Es können also nicht bei allen Patienten mit der klinischen Diagnose Morbus Osler Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 gefunden werden. Bei diesen Patienten könnten Veränderungen in regulatorischen Bereichen (z.B. Promotor) der Gene bestehen oder Mutationen in bisher unbekannten Genen vorliegen (Cole et al. 2005). SMAD4 ist in die TGF-β-Kaskade involviert und ist ein Tumorsuppressorgen (Zhang et al. 2004). Mutationen im SMAD4 Gen führen zum JP-HHT Syndrom (Galione et al. 2004, 2006), in dem Darmpolypen und Anämie die vorherrschenden klinischen Symptome sind. Die M.Osler Symptomatik ist bei den Patienten variabel, aber auf alle treffen die Curaçao-Kriterien zu. Es besteht eine hohe Penetranz von AVMs in dieser JP-HHT Kohorte, insbesondere bei jungen Patienten.

Ein gemeinsames Merkmal beider Erkrankungen ist die gastrointestinale Blutung. In unserer Abteilung wurden 11 Patienten mit Morbus Osler oder Verdacht auf Morbus Osler, die keine Punktmutationen oder größere Rearrangements (Deletionen oder Duplikationen) in den Genen für Endoglin und ACVRL1 hatten, auf Mutationen in SMAD4 Gen untersucht (Argyriou et al. unveröffentlichte Daten). Es konnten jedoch keine Veränderungen festgestellt werden. Eine mögliche Ursache dafür kann die kleine Anzahl der untersuchten Patienten sein. Als andere Erklärung käme die Methode der direkten Sequenzierung in Frage.

Die Promotorregion des Endoglin-Gens (Abb: 27 und 28) besitzt GC-reiche Regionen und Konsensusmotive für mehrere Transkriptionsfaktoren, einschließlich Sp1, Ets, GATA, AP2, TGF-ß (Pimanda et al.2006). Die Ets-Bindungsstellen sind für die transkriptionelle Aktivität des Promotors erforderlich.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Ets-Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Angiogenese spielen (Carmeliet , Jain. 2000). Die Ets Familienmitglieder, Fli-1 und ERG, regulieren auch den Promotor des Rezeptor TGF- β R II (Im. et al 2000), an den Endoglin in der TGF- β -Kaskade bindet (Abb.2). Interessanterweise sind Ewing-Sarkome und verwandte neuroektodermale Tumoren mit chromosomalen Translokationen assoziiert,durch die das EWS-Gen mit Fli-1 und Erg fusioniert (Kovar, 2005). Eine mögliche Erklärung für die molekulare Pathogenese dieser Erkrankung ist, dass die Expression des antimitogen wirkenden TGF- β R II-Gens, das normalerweise durch die Fli-1 und Erg Faktoren reguliert wird, durch die EWS-Fli-1 und EWS-Erg Fusionsgene inaktiviert wird (Hahm et al. 1999, Im. et al. 2000).

Außerdem, wurde gezeigt, dass die Sequenzen außerhalb der Promotorregion, d.h eine Enhancer Region (-8Kb), ist erforderlich, um das gesamte Spektrum der endogenen Endoglin Expression im Endothel zu rekapitulieren (Pimanda et al. 2006).Auch ist die Promotor-Region von Endoglin ebenso wie konservierte Ets-Bindungsstellen für die in vivo Aktivität der endothelialen -8 Enhancer erforderlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 15 Patienten, bei denen weder Mutationen noch größere Deletionen im Endoglin- und im ACVRL1-Gen gefunden wurden, auf Veränderungen im Promotor des Endoglin-Gens untersucht.

Durch die Sequenzanalyse konnten wir keine Veränderungen in der Promotorregion des Endoglin-Gens feststellen.

74

4.4 Perspektiven der Arbeit

Neben Mutationen und größeren Deletionen in den beiden bekannten Genen und Veränderungen im Bereich des Promotors des Endoglin-Gens, ist zu vermuten, dass auch Mutationen in der Promoterregion des ACVRL1-Gens eine Rolle in der Verursachung des Morbus Osler spielen könnten. Der Promotor des ACVRL1-Gens wurde vor kurzem beschrieben (Garrido-Martin et al. 2010). Man könnte diese Region bei einem Patientenkollektiv mittels PCR amplifizieren und sequenzieren. Dabei ist es wichtig, dass ein Patientenkollektiv zur Verfügung steht, bei dem die Diagnose eines Morbus Osler möglichst gesichert ist (3 oder 4 erfüllte Curaçao-Kriterien) und Mutationen in den Genen für Endoglin, ACVRL1 und SMAD4 schon ausgeschlossen wurden.

Es wäre zudem sinnvoll, Patienten, bei denen keine Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 gefunden wurden, auf Mutationen im SMAD4-Gen zu untersuchen, insbesondere bei Patienten mit gastrointestinalen Manifestationen.

Die biologische Funktion der TGF-ß-Kaskade ist äußerst vielfältig, dosisabhängig und unterscheidet sich je nach Art und Umfeld der Zielzelle. Eine Identifizierung der neuen SMAD Partner und Regulatoren ist für das Verständnis der TGF-ß-Kaskade von entscheidender Bedeutung. Weitere Studien sollen Klarheit darüber verschaffen, ob die selektive Aktivierung von SMADs, einschließlich I-SMADs, zu verschiedenen angiogenen Antworten führen könnten, wie es im Rahmen des M.Osler der Fall ist, bei dem es zu einer Dysregulation der TGF-β- Signaltransduktionskaskade kommt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 33 Index-Patienten, bei denen der klinische Verdacht auf Morbus Osler bestand, auf Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 untersucht. Bei allen Patienten wurden beide Gene mit allen kodierenden Exons sequenziert. Dadurch konnte bei 22 Patienten eine krankheitsauslösende Mutation identifiziert werden. 5 der 22 identifizierten Mutationen werden in dieser Arbeit erstmalig erwähnt. Bei einer Patientin konnten 2 Mutationen im Gen für Endoglin identifiziert werden. Bei keinem Patienten konnten Mutationen in beiden Genen gefunden werden. Im Rahmen einer Promotorregionuntersuchung wurden 15 Patienten mit einem Morbus Osler oder mit Verdacht auf Morbus Osler, bei denen keine Mutationen in den Genen für Endoglin und ACVRL1 gefunden wurden, untersucht. Es wurden jedoch keine Veränderungen im ENG-Gen-Promotor gefunden.

6 Literaturverzeichnis

- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M (2000): Analysis of ACVRL1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. Hum Mol Genet <u>9</u>(8), 1227-1237
- Abdalla SA, Cymerman U, Johnson RM, Deber CM, Letarte M (2003): Diseaseassociated mutations in conserved residues of ALK-1 kinase domain. Eur J Hum Genet <u>11(</u>4), 279-287
- Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, Chen N, Stoeber GP, Lemire EG, Letarte M (2005): Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia. Hum Mutat <u>25(3)</u>, 320-1
- Abdalla SA, Letarte M. (2006) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease.J Med Genet <u>43(2):97-110</u>
- Anabtawi IA, Ellison RG, Ellison LT (1965): Pulmonary arteriovenous aneurysms and fistulas. Ann Thorac Surg <u>1</u>, 277-285
- Argyriou L, Pfitzmann R, Wehner LE, Twelkemeyer S, Neuhaus P, Nayernia K, Engel
 W (2005): ALK-1 mutations in liver transplanted patients with hereditary
 haemorrhagic teleangiectasia. Liver Transpl <u>11(9)</u>:1132-5
- Argyriou L, Twelkemeyer S, Panchulidze I, Wehner LE, Teske U, Engel W, Nayernia
 K. (2006): Novel mutations in the ENG and ACVRL1 genes causing hereditary
 hemorrhagic teleangiectasia. Int J Mol Med. <u>17</u>(4):655-9

- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, Tang W, Miller F, Mao R. (2006): A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. Am J Med Genet <u>140(</u>20):2155-62
- Berg JN, Guttmacher AE, Marchuk DA, Porteous ME (1996): Clinical heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: are pulmonary arteriovenous malformations more common in families linked to endoglin?. J Med Genet <u>33(3)</u>, 256-257
- Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. (2005): Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. J Cell Physiol 204(2):574-84
- Bossler AD, Richards J, George C, Godmilow L, Ganguly A. (2006): Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. Hum Mutat. <u>27(7):667-75</u>
- Bourdeau A, Cymerman U, Paquet ME, Meschino W, McKinnon WC, Guttmacher AE, Becker L, Letarte M (2000): Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. Am J Pathol 156(3), 911-923

- Carmeliet P, Jain RK. (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407(6801):249-57
- Carvalho RL, Jonker L, Goumans MJ, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke PT, Arthur HM, Mummery CL. (2004): Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. Development <u>131(</u>24):6237-47
- Chien A, Edgar DB, Trela JM. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus. J Bacteriol <u>127(3)</u>:1550-7
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. (2005): A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. J Med Genet 42(7):577-82
- Cooley DA, McNamara DG (1954): Pulmonary telangiectasia: report of case proved by pulmonary biopsy. J Thorac Surg <u>27(6)</u>, 614-622
- Cottin V, Dupuis-Girod S, Lesca G, Cordier JF (2007): Pulmonary vascular manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia (rendu-osler disease). Respiration <u>74(4)</u>, 361-78
- Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI Jr, Dunn J, Letarte M (2000): Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. Pediatr Res <u>47(1)</u>, 24-35

- Cymerman U, Vera S, Karabegovic A, Abdalla S, Letarte M (2003): Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Hum Mutat 21(5), 482-492
- Den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000): Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat <u>15(1)</u>, 7-12
- Feng XH, Derynck R (2005): Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol <u>21</u>:659-93
- Fuchizaki U, Miyamori H, Kitagawa S, Kaneko S, Kobayashi K (2003): Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). Lancet <u>362(9394)</u>, 1490-1494
- Gallione CJ, Scheessele EA, Reinhardt D, Duits AJ, Berg JN, Westermann CJ, Marchuk DA (2000): Two common endoglin mutations in families with hereditary hemorrhagic telangiectasia in the Netherlands Antilles: evidence for a founder effect. Hum Genet <u>107(1)</u>, 40-44
- Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJ, Marchuk DA (2004): A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). Lancet <u>363</u>(9412), 852-9

- Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP, Ganguly A, Castells A, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ, Pyeritz RE, Marchuk DA. (2006): SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. J Med Genet <u>43</u>(10):793-7.
- Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee UE, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C. (2010): Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. BMC Mol Biol <u>29</u>;11(1):51
- Giordano P, Nigro A, Del Vecchio GC, Sabbà C, De Mattia D (2006): HHT in childhood: screening for special patients. Curr Pharm Des <u>12(10)</u>:1221-5
- Govani FS, Shovlin CL (2009): Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. Eur J Hum Genet 17(7):860-71
- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI (1995): Hereditary hemorrhagic telangiectasia. N Engl J Med <u>333(14)</u>, 918-924
- Hahm KB. (1999): Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. Nat Genet 23(4):481
- Haitjema T, Disch F, Overtoom TT, Westermann CJ, Lammers JW (1995): Screening family members of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Am J Med 99(5), 519-24

- Haitjema T, Westermann CJ, Overtoom TT, Timmer R, Disch F, Mauser H, Lammers JW (1996): Hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease): New insights in pathogenesis, complications, and treatment. Arch Intern Med 156(7), 714-719
- Hales MR (1956): Multiple small arteriovenous fistulas of the lungs. Am J Pathol <u>32</u>, 927-943
- Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, Kim SJ. (2000): EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. Cancer Res <u>60</u>(6):1536-40
- Jessurun GA, Kamphuis DJ, van der Zande FH, Nossent JC (1993): Cerebral arteriovenous malformations in The Netherlands Antilles. High prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related single and multiple cerebral arteriovenous malformations. Clin Neurol Neurosurg <u>95(3)</u>, 193-198
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA (1996): Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. Nat Genet <u>13(</u>2), 189-195
- Kovar H.: Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. Semin Cancer Biol <u>15(</u>3):189-96

- Kuehl HK, Caselitz M, Hasenkamp S, Wagner S, El-Harith el-HA, Manns MP, Stuhrmann M (2005): Hepatic manifestation is associated with ALK1 in hereditary hemorrhagic telangiectasia: identification of five novel ALK1 and one novel ENG mutations. Hum Mutat 25(3), 320
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P (2004): Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. EMBO J ;23 (20): 4018-28
- Lee ST, Kim JA, Jang SY, Kim DK, Do YS, Suh GY, Kim JW, Ki CS (2009): Clinical features and mutations in the ENG, ACVRL1, and SMAD4 genes in Korean patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. J Korean Med Sci <u>24(1)</u>:69-76.
- Lenato GM, Guanti G. (2006): Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT): genetic and molecular aspects. Curr Pharm Des.; <u>12(10)</u>:1173-93
- Lenato GM, Lastella P, Di Giacomo MC, Resta N, Suppressa P, Pasculli G, Sabbà C, Guanti G. (2006): DHPLC-based mutation analysis of ENG and ALK-1 genes in HHT Italian population. Hum Mutat 27(2):213-4
- Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Riviere S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A, Giraud S (2004): Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. Hum Mutat 23(4), 289-299

- Letteboer TG, Mager JJ, Snijder RJ, Koeleman BP, Lindhout D, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ. (2006): Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. J Med Genet <u>43(4)</u>:371-7
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. (1994): Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. Nat Genet 8(4), 345-351
- McDonald JE, Miller FJ, Hallam SE, Nelson L, Marchuk DA, Ward KJ (2000): Clinical manifestations in a large hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2 kindred. Am J Med Genet <u>93(4)</u>, 320-327
- Moussouttas M, Fayad P, Rosenblatt M, Hashimoto M, Pollak J, Henderson K, Ma TY, White RI. (2006): Pulmonary arteriovenous malformations: cerebral ischemia and neurologic manifestations. Neurology <u>55</u>(7):959-64
- Nobuhara Y, Nakahara K, Higuchi I, Yoshida T, Fushiki S, Osame M, Arimura K, Nakagawa M (2004): Juvenile form of Alexander disease with GFAP mutation and mitochondrial abnormality. Neurology <u>63</u>(7), 1302-4
- Olivieri C, Mira E, Delu G, Pagella F, Zambelli A, Malvezzi L, Buscarini E, Danesino C (2002): Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. J Med Genet 39(7), E39

- Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C, Letarte M (2001): Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. Hum Mol Genet 10(13), 1347-1357
- Pece N, Vera S, Cymerman U, White RI Jr, Wrana JL, Letarte M (1997): Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. J Clin Invest 100(10), 2568-2579
- Pece-Barbara N, Cymerman U, Vera S, Marchuk DA, Letarte M (1999): Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. Hum Mol Genet 8(12), 2171-2181
- Pimanda JE, Chan WY, Donaldson IJ, Bowen M, Green AR, Göttgens B.(2006): Endoglin expression in the endothelium is regulated by Fli-1, Erg, and Elf-1 acting on the promoter and a -8-kb enhancer. Blood <u>107(12)</u>:4737-45
- Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM (1989): Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. Am J Med Genet, <u>32(3)</u>, 291-7
- Reilly PJ, Nostrant TT (1984): Clinical manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia. Am J Gastroenterol 79(5), 363-367

- Ríus C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, Vary CP, Bernabéu C. (1998): Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. Blood <u>92(12)</u>:4677-90
- Roman G, Fisher M, Perl DP, Poser CM (1978): Neurological manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease): report of 2 cases and review of the literature. Ann Neurol 4(2), 130-144
- Rundles RW (1945): Hemorrhagic telangiectasia with pulmonary artery aneurysm: case report. Am J Med Sci <u>210</u>, 76–81
- Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G. (2007): Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. J Thromb Haemost <u>5(6)</u>:1149-57
- Sadick H, Sadick M, Götte K, Naim R, Riedel F, Bran G, Hörmann K. (2006): Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on clinical manifestations and diagnostic measures. Wien Klin Wochenschr 118(3-4): 72-80
- Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G (2002): Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. Am J Med Genet 111(1), 88-95
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA <u>74(12)</u>, 5463-5467

- Schulte C, Geisthoff U, Lux A, Kupka S, Zenner HP, Blin N, Pfister M. (2005): High frequency of ENG and ALK1/ACVRL1 mutations in German HHT patients. Hum Mutat.;25(6):595
- Shovlin CL, Letarte M (1999): Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. Thorax <u>54(8)</u>, 714-729
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H (2000): Diagnostic Criteria for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Syndrom). Am J Med Genet <u>91(1)</u>, 66-67
- Smith JL, Lineback MI (1954): Hereditary hemorrhagic telangiectasia; nine cases in one Negro family, with special reference to hepatic lesions. Am J Med <u>17(1)</u>, 41-49
- Vincent P, Plauchu H, Hazan J, Faure S, Weissenbach J, Godet J (1995): A third locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12q. Hum Mol Genet 4(5), 945-949
- Wallace GM, Shovlin CL (2000): A hereditary haemorrhagic telangiectasia family with pulmonary involvement is unlinked to the known HHT genes, endoglin and ALK1. Thorax <u>55(8)</u>, 685-690

- Wehner LE, Folz BJ, Argyriou L, Twelkemeyer S, Teske U, Geisthoff UW, Werner JA,
 Engel W, Nayernia K. (2006): Mutation analysis in hereditary haemorrhagic
 telangiectasia in Germany reveals 11 novel ENG and 12 novel ACVRL1/ALK1
 mutations. Clin Genet <u>69(3)</u>:239-45
- Zhang DY, Sabla G, Shivakumar P, Tiao G, Sokol RJ, Mack C, Shneider BL, Aronow
 B, Bezerra JA (2004): Coordinate expression of regulatory genes differentiates
 embryonic and perinatal forms of biliary atresia. Hepatology <u>39(4)</u>, 954-62

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof Dr. Wolfgang Engel für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für sein gar übermenschliches Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Ute Teske, die mich in die Geheimnisse der Laborarbeit einweihte und mir ständig hilfsbereit zur Seite stand.

Danke an alle anderen Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik für die freundliche Unterstützung, nicht nur in allen methodischen und theoretischen Fragen. Die gute Arbeitsatmosphäre hat zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen.

Lebenslauf

Mein Name ist Irakli Panchulidze. Ich wurde am 06 Februar 1978 in Tiflis/Georgien geboren.

Von 1985 bis 1995 besuchte ich die Schule in Tiflis/Georgien.

Von 1995 bis 1998 studierte ich Medizin an der medizinischen Hochschule "AIETI" in Tiflis/Georgien.

Von 1998 bis 1999 studierte ich "Deutsch als Fremdsprache" an der technischen Universität in Clausthal-Zellerfeld.

Im Oktober 1999 begann ich mein Studium an der Georg-August-Universität in Göttingen. Die Ärztliche Prüfung bestand ich im November 2008.

Vom November 2008 bis Oktober 2010 war ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemein -und Unfallchirurgie am Ortenauklinikum Kehl tätig.

Seit dem Oktober 2010 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Plastische und Handchirurgie im Krankenhaus Landshut-Achdorf tätig.

Im Oktober 2005 begann ich meine experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema "Zur molekulargenetischen Charakterisierung der Mutationen in den Endoglin- und ACVRL1-Genen bei den Morbus- Osler- Patienten" im Institut für Humangenetik der Universität Göttingen.