

Aus dem
Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. E. Seifried

**Die genetische Variabilität des
 γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens (GGCX)
bei Patienten mit angeborener Verminderung
der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren
und in der Allgemeinbevölkerung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
vorgelegt von
Sa Lan Nguyen
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2009

Dekan: Prof. Dr. med. Josef M. Pfeilschifter
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erhard Seifried
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med Jens Gille
Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	11
2	Thematische Grundlagen	13
2.1	Blutgerinnung	13
2.1.1	Organisation der Blutgerinnung	13
2.2	Vitamin-K-abhängig gebildete Faktoren	16
2.3	Hereditärer Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren	18
2.4	Pseudoxanthoma-elasticum-like Disorder	20
2.5	Struktur des γ -Carboxylase-Gens und -Proteins	22
2.6	Funktion der γ -Glutamyl-Carboxylase	23
2.7	Grundlagen der Genetik	25
2.7.1	Aufbau der DNA	25
2.7.2	Mutationen, Polymorphismen und deren Auswirkungen	25
3	Patienten, Material und Methoden	27
3.1	Probanden	27
3.1.1	Patienten mit VKCFD	27
3.1.2	Blutspender	27
3.2	Material	28
3.3	Puffer und Lösungen	29
3.3.1	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	29
3.3.2	Lösungen für die DNA-Isolation	29
3.3.3	PCR-Reagenzien	30
3.3.4	Reagenzien für die dHPLC	30
3.3.5	Reagenzien für die Sequenzierung	30
3.3.6	Gele	31
3.4	Geräte	31
3.5	γ -Glutamyl-Carboxylase Oligonukleotide	32
3.6	Methoden	33
3.6.1	Isolation und Konzentrationsbestimmung der DNA	33
3.6.2	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.6.3	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.6.4	Heteroduplexbildung	36
3.6.5	Denaturierende-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)	36
3.6.6	Sequenzierung	39
3.7	Methoden der Bioinformatik	40
3.7.1	Datenquellen	41
3.7.2	Nomenklatur	42
3.7.3	Sequenzvergleich homologer Proteine	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Ermittlung der Genvarianten im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen	44
4.2	Mutationen bei VKCFD-Patienten	46
4.3	Genvarianten bei 200 gesunden Blutspendern	49

5	Diskussion	57
5.1	Entstehung und Charakterisierung von DNA-Veränderungen	57
5.2	Einteilung von DNA-Veränderungen.....	58
5.3	Bedeutung und Selektion von DNA-Veränderungen.....	58
5.4	γ -Carboxylase-Mutationsdiagnostik.....	59
5.5	Patienten mit Mutationen im γ -Carboxylase-Gen	67
5.6	Polymorphismen im γ -Carboxylase-Gen in der Allgemeinbevölkerung	73
5.6.1	Polymorphismen in nicht codierenden Abschnitten	74
5.6.2	Polymorphismen in codierenden Abschnitten ohne Aminosäureaustausch.....	74
5.6.3	Genvarianten mit Auswirkungen auf die AS-Sequenz	75
5.7	Vergleich der dHPLC und der Sequenzierung als Mutationsanalysemethoden.....	76
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	80
8	Literaturverzeichnis	82
9	Anhang	89
10	Danksagung	96
11	Lebenslauf	97
12	Eidesstattliche Erklärung	99

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AT	„Annealingtemperatur“
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c.	die cDNA betreffend (bei Angabe von Sequenzvariationen)
ca.	cirka
cDNA	copy desoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
CRS	Carboxylation recognition site
Cys	Cystein
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
	dCTP Desoxycytydin-5'-triphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
dHPLC	„denaturing high performance/pressure liquid chromatography“
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylenditriлотetraessigsäure
EBP	Emopamil-binding-Protein
et al.	et alii (und andere)
FII	Faktor II
FV	Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIIa	aktivierter Faktor VII
FIX	Faktor IX

FX	Faktor X
FXa	aktivierter Faktor X
FXI	Faktor XI
FXIa	aktivierter Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIIa	aktivierter Faktor XII
FXIII	Faktor XIII
Fbg.	Fibrinogen
FFP	Fresh Frozen Plasma
fs	„frameshift“
G	Guanin
g.DNA	genomische DNA
GGCX	γ -Glutamyl-Carboxylase
ggf.	gegebenenfalls
Gly	Glycin
His	Histidin
HK	„high molecular weight kininogen“
HPLC	„high performance/pressure liquid chromatography“
Ile	Isoleucin
Ins	Insertion
kb	Kilobase
l	Liter
Leu	Leucin
LFM	lösliche Fibrinmonomere
Lys	Lysin
μ	Mikro
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
M	Mol
Met	Methionin
Mg	Milli
MGP	Matrix-Gla-Protein
min	Minuten
mM	Millimol
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-RNA)
n	Nano
NA ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetra-azetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p.	das Protein betreffend (bei Angabe von Sequenzvariationen)
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)

PK	Präkallikrein
PXE	Pseudoxanthoma Elasticum
Pro	Prolin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	„Ribonucleic acid“
sek	Sekunde
Ser	Serin
SNP	„single nucleotide polymorphism“
Syn.	Synonym
T	Thymin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TF	„tissue factor“
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u-PA	Urokinase-Plasminogenaktivator
UV	ultraviolett
V	Volt
VKCFD	„Vitamin-K-dependent Coagulation Factor Deficiency“ (kombinierter Mangel aller Vitamin-K abhängigen Faktoren)
VKORC1	Vitamin-K-Epoxid-Reduktase
Val	Valin
Vs	versus
wt	„wildtype“
z.B.	zum Beispiel
X	Stopp-Codon

Aminosäuren

Aminosäuren	Ihre Abkürzungen	Ein-Buchstaben-Symbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Das plasmatische Blutgerinnungssystem.	15
Abb. 2	Vitamin K.	16
Abb. 3	Der Vitamin-K-Epoxidzyklus.	18
Abb. 4	Lokalisation und Struktur des γ-Carboxylase-Gens (GGCX).	22
Abb. 5	Modell des γ-Carboxylase-Proteins (Tie et al. 2000).	23
Abb. 6	Beispiele für PCR-Proben.	38
Abb. 7	Stammbaum von Patientin 1.	48
Abb. 8	Ausschnitt der Sequenz einer Probe mit Polymorphismus in Exon 1.	50
Abb. 9	Ausschnitt der Sequenz einer Probe ohne Polymorphismus in Exon 1.	51
Abb. 10	Ausschnitt einer Probe mit Polymorphismus in Exon 9.	53
Abb. 11	Ausschnitt einer Probe ohne Polymorphismus in Exon 9.	54
Abb. 12	„Wildtyp“-Sequenz von Exon 15 auf dem Bildschirm der dHPLC.	56
Abb. 13	Probe mit heterozygotem Polymorphismus in Exon 15.	56
Abb. 14	„Wildtyp“ (blau) und Probe mit Polymorphismus (rot).	56
Abb. 15	Modell des γ-Carboxylase-Proteins (Tie et al. 2000).	62
Abb. 16	Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäure Arg204 (rot) flankierenden Region.	63
Abb. 17	Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäuren Trp315 und Gln328 (rot) flankierenden Region.	64
Abb. 18	Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäure His404 (rot) flankierenden Region.	65
Abb. 19	Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäure Arg485 (rot) flankierenden Region.	67
Abb. 20	Haplotypanalyse in Familie1 und in einer zweiten Familie (A).	68
Abb. 21	Aktivitäten der Vitamin-K-abhängigen Faktoren nach FFP-Gabe.	71
Abb. 22	Aktivitäten der Vitamin-K-abhängigen Faktoren nach FFP-Gabe + Vitamin K.	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien, Enzyme und Kits	28
Tabelle 2:	Arbeitsgeräte	31
Tabelle 3:	Oligonukleotide und Temperatur für PCR	32
Tabelle 4:	Reaktionsansatz für PCR	34
Tabelle 5:	Temperatur und Zyklen der PCR	35
Tabelle 6:	Humane γ-Carboxylase und homologe Proteine verschiedener Spezies mit Zugangscode („accession“-Nummer) für die entsprechenden internetbasierten Datenbanken.	43
Tabelle 7:	Nachgewiesene Mutationen im GGCX-Gen bei VKCFD-Patienten und Familienangehörigen	46
Tabelle 8:	Gerinnungsbefunde bei Patientin 1 vor und nach Vitamin-K-Gabe.....	46
Tabelle 9:	Ermittelte Polymorphismen mit Lokalisation und Häufigkeit.	49
Tabelle 10:	Mutationen bei Patienten mit VKCFD	60
Tabelle 11	Gerinnungswerte Patientin 2 vor und nach Vitamin-K-Gabe.	70
Tabelle 12:	Publizierte und ermittelte Polymorphismen mit Lokalisation und Häufigkeit.	73
Tabelle 13	GGCX-Polymorphismenkarte . Genotyp in 200 Blutspendern.....	89

1 Einleitung und Zielsetzung

Die γ -Glutamyl-Carboxylase spielt eine wichtige Schlüsselrolle im menschlichen Organismus, da sie als integrales Membranprotein am rauen endoplasmatischen Retikulum für die posttranslationale Modifikation der Vitamin-K-abhängigen Proteine verantwortlich ist (Darghouth et al. 2006).

Zu den Vitamin-K-abhängigen Proteinen zählt man neben den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X auch Osteocalcin, Matrix-Gla-Protein (MGP) oder das wachstumshemmende spezifische Protein, Gas6, (Wu et al. 1997a). Ein Defekt der γ -Glutamyl-Carboxylase führt zu einer verminderten Bildung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren und damit zu einer gesteigerten Blutungsneigung.

In der Literatur werden Koagulopathien dieser Art als VKCFD („Vitamin-K-dependent Coagulation Factor Deficiency“) beschrieben, die sich in zwei Subtypen unterscheiden lassen (Darghouth et al. 2006). Der erste, VKCFD1, resultiert aus einem Defekt der γ -Glutamyl-Carboxylase, während der zweite Subtyp, VKCFD2, durch einen Defekt der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKORC1) bedingt ist. VKORC1 stellt im Vitamin-K-Zyklus das für die Carboxylierung benötigte reduzierte Vitamin-K-Hydrochinon bereit.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Mutationsdiagnostik bei 4 Patienten mit kongenitalem Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren. Hierbei ging es darum, Veränderungen im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen nachzuweisen und zu charakterisieren.

Zweites Ziel der Arbeit war es, 200 gesunde, nicht verwandte Blutspender als repräsentative Stichprobe der Normalbevölkerung in Bezug auf Genvariationen im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen zu untersuchen. Durch die Analyse von 400 Allelen (entspricht bei autosomalen Genen 200 Individuen) können auch seltene Polymorphismen mit einer Häufigkeit von über 1% systematisch und quantitativ erfasst werden. Anhand dieser Ergebnisse kann die statistische Verteilung von Polymorphismen im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen in der europäischen Normalbevölkerung geschätzt werden.

Als drittes Ziel sollte ein Weg zur effizienten Diagnostik von Mutationen bzw. Polymorphismen herausgearbeitet werden mit besonderem Augenmerk hinsichtlich der Gegenüberstellung der „denaturing high performance liquid chromatography“ (dHPLC) und der Gensequenzierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten die Grundlage zur proteinchemischen und funktionellen Charakterisierung von Mutationen und Polymorphismen durch Expressionsstudien.

2 Thematische Grundlagen

2.1 Blutgerinnung

2.1.1 Organisation der Blutgerinnung

Die Blutstillung oder Hämostase ist ein Prozess, der die Integrität des zirkulatorischen Kreislaufsystems nach einer Verletzung der Gefäßwand sicherstellt. Eine Beschädigung der Gefäßwand inklusive der Endothelschicht mit Austreten von Blut initiiert sofort einen Reparaturmechanismus, der an dieser Stelle zur Thrombusbildung führt. Ein funktionierendes Blutgerinnungssystem ist für den Organismus lebenswichtig. Es sorgt nicht nur für ein Drosseln des lokalen Blutflusses an einer verletzten Stelle, sondern verhindert durch gerinnungshemmende Faktoren eine Thrombusbildung in intakten Bereichen des Gefäßsystems. Wenn pathologische Prozesse den Regulationsmechanismus der Hämostase überwiegen, bilden sich Thromben an unversehrten Stellen des Gefäßes, die dann zum Krankheitsbild der Thrombose führen (Furie und Furie 2008). Myokardinfarkte, Schlaganfälle sowie Lungenembolien als Manifestationsformen einer Thromboseneigung gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen (Murray und Lopez 1997).

Grundsätzlich kann die Hämostase in eine primäre und eine sekundäre eingeteilt werden. Die primäre Hämostase beinhaltet die Bildung eines Plättchenpfropfes, der sich aus anhaftenden Thrombozyten zusammensetzt, die vasokonstriktorische Substanzen wie Serotonin und Tromboxan A_2 freisetzen, um das Gefäß am Verletzungsort zu kontrahieren und dadurch den lokalen Blutfluss zu drosseln. Dies reicht jedoch nicht für einen stabilen Wundverschluss aus und erfordert somit eine sekundäre Hämostase (Furie und Furie 1992). Die sekundäre Hämostase stellt die eigentliche Blutgerinnung dar, die durch die Bildung des Faserproteins Fibrin zu einem endgültigen Blutungsstillstand führt (Spronk et al. 2003).

Die Gerinnung umfasst eine Kaskade proteolytischer Enzyme. Sie liegen zunächst als inaktive Proenzyme vor, die durch limitierte Proteolyse in die aktive Form

überführt werden. Klassischerweise werden zwei „Zweige“ der Kaskade, der „intrinsische“ Weg und der „extrinsische“ Weg unterschieden, die jedoch in eine „gemeinsame Endstrecke“ einmünden und unmittelbar miteinander verflochten sind (Jesty et al. 2005). Die extrinsische Gerinnungsaktivierung wird durch eine Gefäßwandschädigung ausgelöst. Zellen der subendothelialen Matrix, die normalerweise keinen Kontakt mit dem Blut haben, tragen ein bestimmtes Membranprotein auf ihrer Oberfläche, den Gewebefaktor (engl. „tissue factor“, TF), der den in kleinen Konzentrationen frei zirkulierenden und bereits enzymatisch aktiven Faktor VIIa (FVIIa) bindet. Dieser Komplex aus TF und FVIIa aktiviert nun über eine limitierte Proteolyse rasch und effektiv Faktor IX und Faktor X zu Faktor IXa und Faktor Xa (FXa). Gleichzeitig besteht ein positiver Rückkoppelungsmechanismus, der eine Verstärkung der Aktivierung um mehrere Potenzstufen gewährleistet. FXa spaltet schließlich mithilfe von Faktor Va, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa).

Die intrinsische Kaskade wird durch Blutgerinnungsfaktor XII (Hageman-Faktor, FXII) gestartet (Hojima et al. 1984). Kontakt zu Oberflächenladungen induziert eine Konformationsänderung im FXII, der dadurch eine Proteasenaktivität erlangt (FXIIa) (Cochrane und Revak 1980). FXIIa aktiviert dann entweder direkt oder indirekt über Präkallikrein (PK) den Blutgerinnungsfaktor XI (FXI) (Kurachi und Davie 1977, Ratnoff und Saito 1979). Aktiver FXI (FXIa) kann dann in einer kalziumionenabhängigen Reaktion, die durch Phospholipide signifikant beschleunigt wird, Faktor IX durch limitierte Proteolyse aktivieren. Dieser Gerinnungsfaktor kann seinerseits den Faktor X (FX) aktivieren. Bei FX trifft die intrinsische auf die extrinsische Kaskade. Hierbei ist zu erwähnen, dass bei Faktor IX bereits eine Querverbindung, bekannt als Josso-Schleife, zwischen beiden „klassischen Zweigen“ der Gerinnungskaskade besteht, da er sowohl intrinsisch über Faktor XIa aktiviert wird als auch extrinsisch über den Komplex aus Faktor VIIa, Gewebefaktor und Ca^{2+} (Xi et al. 1989). Endogene und exogene Gerinnungsaktivierung bewirken dann über einen gemeinsamen Reaktionsweg die Aktivierung von Prothrombin (FII) (Dahlback 2000). Die Protease führt zur Bildung von Fibringerinnseln, indem sie Fibrinogen zu Fibrin umsetzt und darüber hinaus Thrombozyten aktiviert. Dieses wasserfallartige Modell hat sich als sehr nützlich für das Verständnis vieler Tests in der Hämostaseologie erwiesen. Es besteht eine Vielzahl gegenseitiger Beeinflus-

sungen und Querverbindungen in vivo. Eine schematische Übersicht des revidierten aktuellen Modells der plasmatischen Blutgerinnungskaskade gibt Abb. 1.

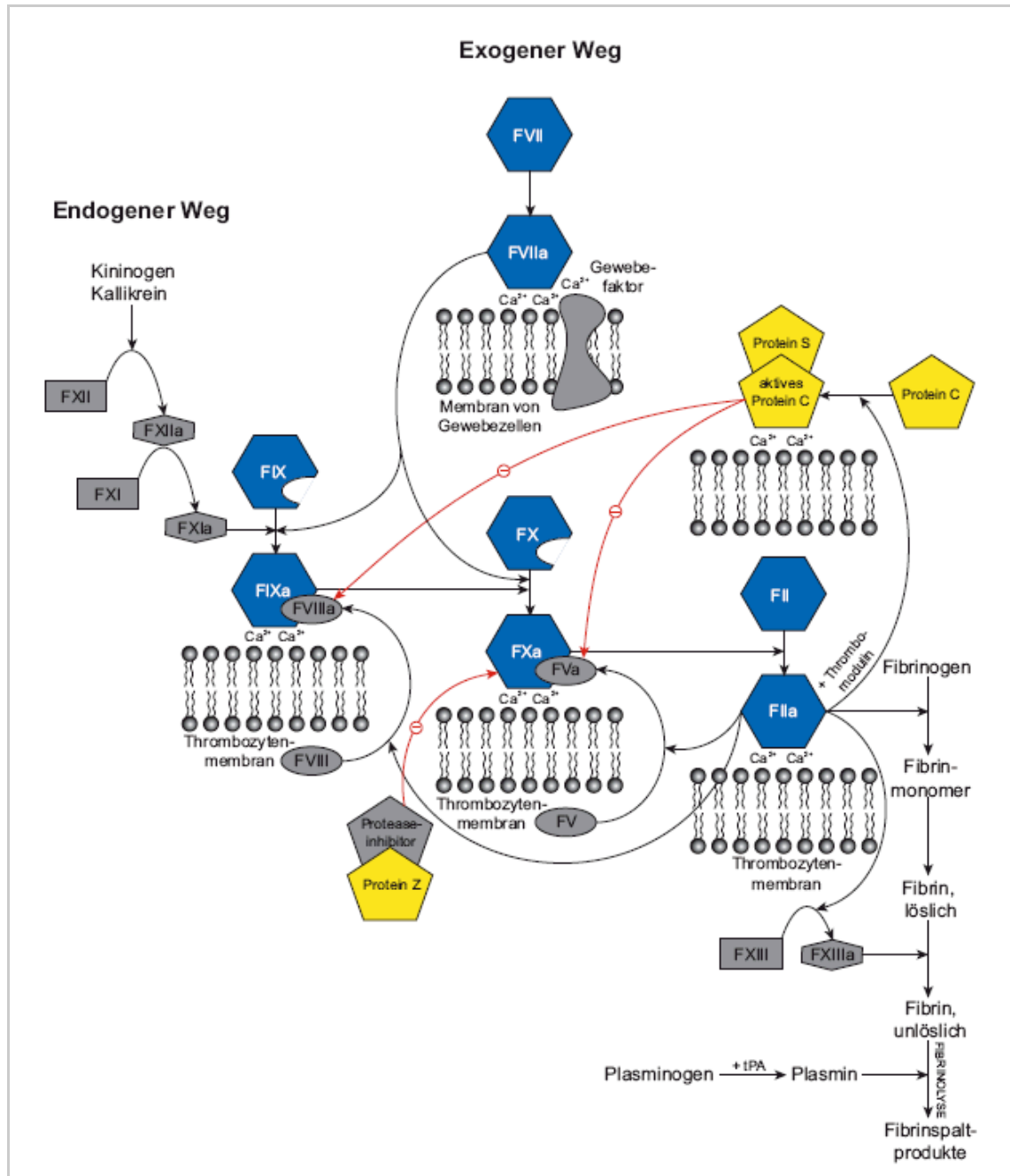


Abb. 1

Das plasmatische Blutgerinnungssystem.

Prokoagulatorische Vitamin-K-abhängige Proteine sind blau dargestellt, antikoagulatorische Proteine gelb. Inhibierende Einflüsse sind durch rote Pfeile mit Minus-Zeichen verdeutlicht, schwarze Pfeile stehen für aktivierende Einflüsse, meist durch proteolytische Spaltung (Rost 2005)

2.2 Vitamin-K-abhängig gebildete Faktoren

Vor mehr als 70 Jahren wurde Vitamin K als antihämorrhagischer Faktor entdeckt. Er wird benötigt für die Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, die Bildung der gerinnungshemmenden Faktoren Protein C, S und Z, für das zellzyklusstimulierende Protein Gas 6 („growth arrest specific protein“ 6) und für die Knochenproteine Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein (MGP) (Dam 1935).

Vitamin K existiert in zwei Formen: Als Vitamin K₁ wird es in grünen Pflanzen und Algen synthetisiert und befindet sich überwiegend in den Chloroplasten, da es integraler Bestandteil des Photosystems I ist (Vitamin K₁-Phyllochinon). Als Vitamin K₂ (Menachinon) wird es von Bakterien der menschlichen Darmflora aufgebaut (Abb. 2). Vitamin K wird hauptsächlich durch pflanzliche Nahrung zugeführt.

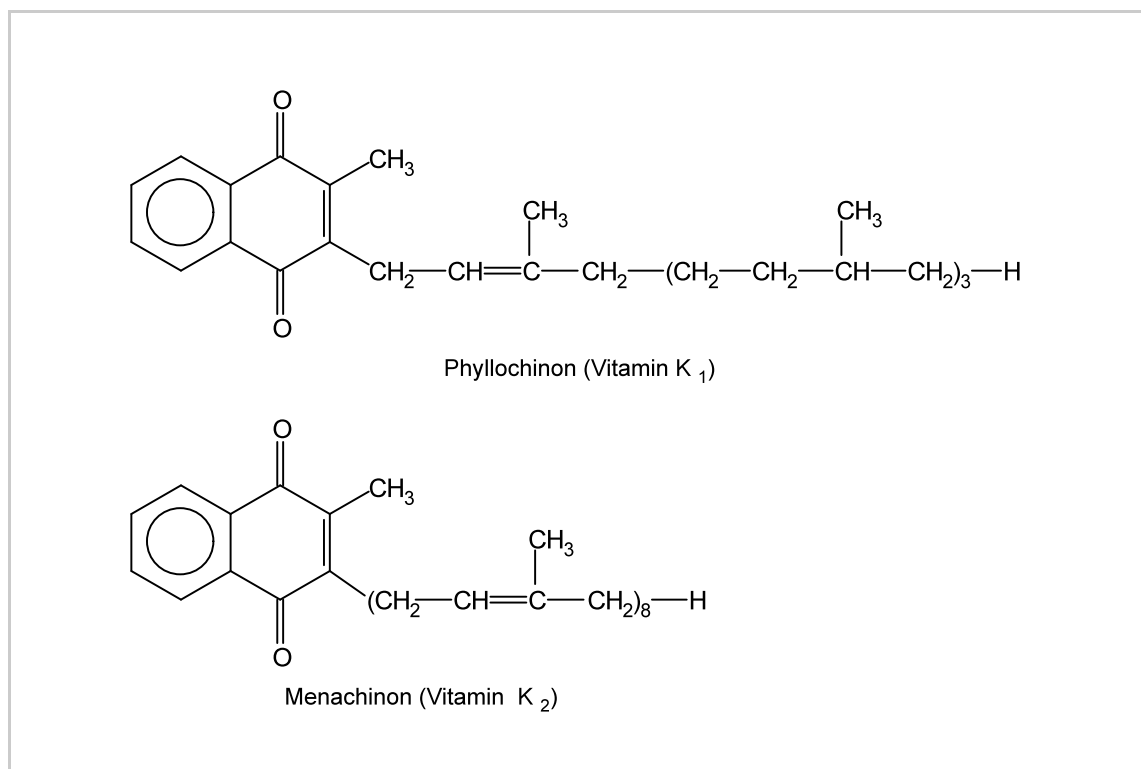


Abb. 2

Vitamin K.

Der Aufbau von Phyllochinon und Menachinon. Grundstruktur ist ein Chinon, das 2-Methyl-1,4-naphthoquinon. Die einzelnen Vitamin-K-Formen unterscheiden sich in der langen Seitenkette an Position 3. Menachinon weist in dieser Kette n wiederkehrende Prenyleinheiten auf, hier sind es 8. Sie differieren meist zwischen 6 und 19, sodass die Benennung Menachinon-n üblich ist, wobei n folglich die Anzahl der Prenylreste wiedergibt.

Die Aufnahme von Vitamin K erfolgt zusammen mit anderen lipophilen Substanzen im Darm. Die optimale Resorption beider Vitamine in Micellen erfordert die Anwesenheit von Gallensalzen und Produkten der Pankreaslipase-Reaktion (Fettsäuren und 2-Monoacylglycerol). Dadurch führen extrahepatische Cholestase und Pankreasinsuffizienz zu einem Vitamin-K-Mangel. Nach der Synthese der oben genannten Proteine werden Glutamatreste durch eine Carboxylase an ihrem γ -C-Atom carboxyliert. Diese Reaktion ist Vitamin-K-abhängig. Die Glutamatreste reagieren mit CO_2 , molekularem Sauerstoff O_2 und dem Reduktionsäquivalent Vitamin-K-Hydrochinon zu γ -Carboxyglutamat. Hierbei wird Vitamin-K-Hydrochinon durch die Epoxidase-Aktivität der γ -Carboxylase zu Vitamin-K-2,3-Epoxid oxidiert (Begent et al. 2001).

Betroffen sind davon die ersten zehn N-terminalen Glutamatreste des Proteins. Die Carboxylierung verwandelt Glutamat zu γ -Carboxyglutamat (Abb. 3) und erhöht dadurch die Fähigkeit Kalzium zu binden. Die Regeneration des Vitamin-K-Hydrochinon erfolgt in zwei aufeinander folgenden, thiolgruppenabhängigen Schritten, die vom gleichen Enzym katalysiert werden.

Eine fehlende oder mangelnde Carboxylierung von Glutamatresten, entweder durch einen Vitamin-K-Mangel oder durch die Anwesenheit von Vitamin-K-Antagonisten, führt somit zu einer Störung der Blutgerinnung. Vitamin-K-Antagonisten vom Cumarintyp (z.B. Dicumarol oder Warfarin) werden heute als Antikoagulantien klinisch eingesetzt (Oldenburg et al. 2008).

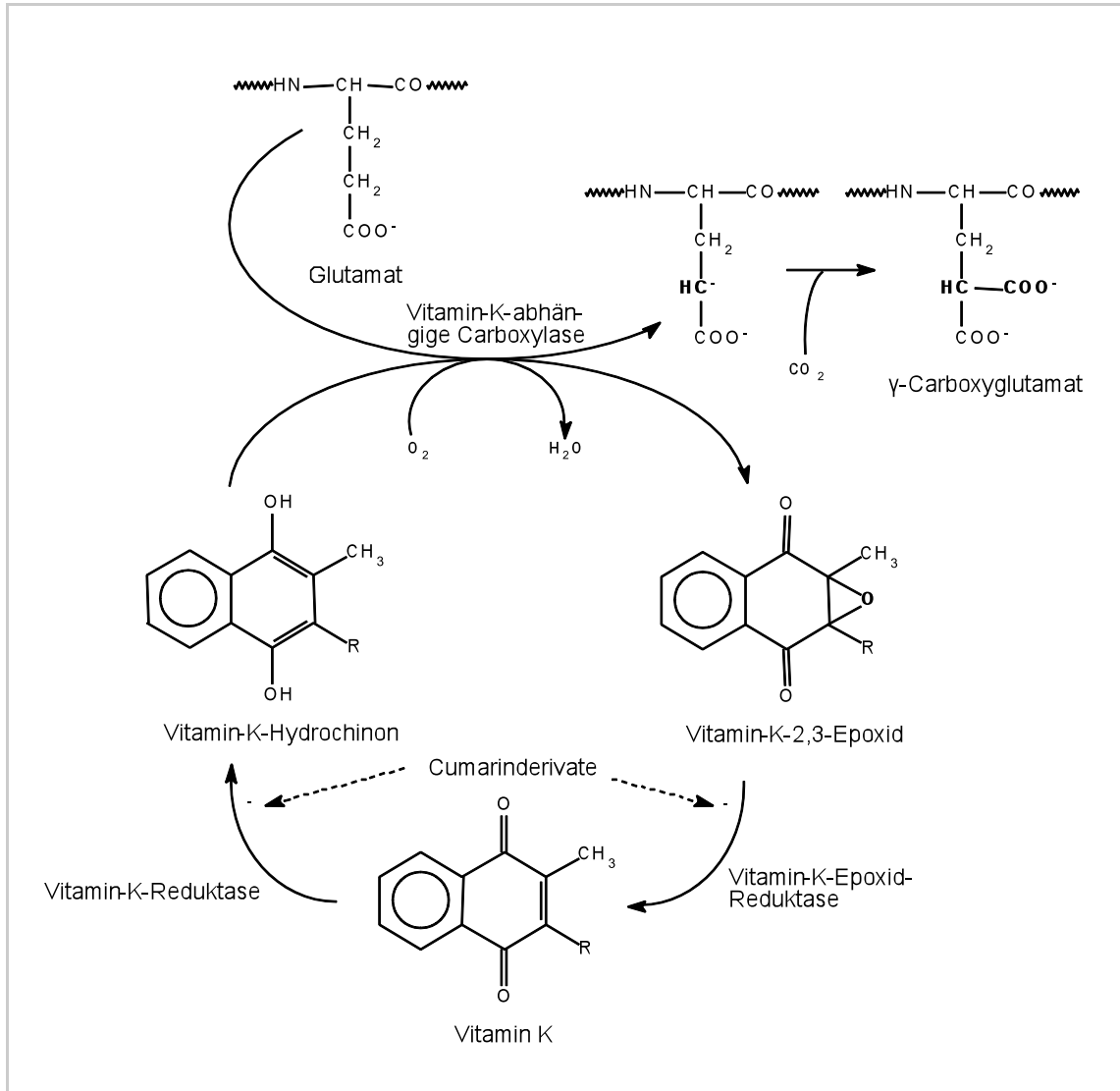


Abb. 3 **Der Vitamin-K-Epoxidzyklus.** Obwohl hier separat dargestellt, werden vermutlich beide Reduktaseaktivitäten von einem Enzym gestellt. Die Cumarinderivate greifen hier an. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

2.3 Hereditärer Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren

Der erblich bedingte Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Parameter („Vitamin K dependent Clotting Factor Deficiency“, VKCFD) stellt eine extreme Rarität dar. In der Literatur wurden ca. 30 verschiedene, betroffene Familien beschrieben (Boneh und Bar-Ziv 1996, Brenner et al. 1990, Brenner et al. 1998, Darghouth et al. 2006,

Ekelund et al. 1986, Goldsmith, Jr. et al. 1982, Johnson et al. 1980, Le Corvaisier-Pieto et al. 1996, Li et al. 2009a, Li et al. 2009b, Macmillan und Vickers 1971, Marchetti et al. 2008, McMillan und Roberts 1966, Mousallem et al. 2001, Mutucumarana et al. 2000, Oldenburg et al. 2000, Orbak et al. 2003, Pauli et al. 1987, Pechlauer et al. 1992, Rongioletti et al. 1989, Rost et al. 2004b, Rost et al. 2004a, Rost et al. 2006, Soute et al. 2004, Spronk et al. 2000, Thomas und Stirling 2003, Titapiwatanakun et al. 2009, Vanakker et al. 2007, Vicente et al. 1984, Watzka et al. 2008, Weston und Monahan 2008).

Für die angeborene Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Parameter sind zwei Ursachen bekannt.

Zum einen kommt ein angeborener Defekt der γ -Carboxylase in Betracht (VKCFD Typ 1, OMIM [*137167](#)), der aufgrund unvollständiger oder ausbleibender Carboxylierung der Vitamin-K-abhängigen Proteine zu deren Funktionseinschränkung führt. Bisher wurden bei 22 VKCFD1-Patienten insgesamt 21 verschiedenen GGCMutationen beschrieben (Brenner et al. 1990, Brenner et al. 1998, Darghouth et al. 2006, Li et al. 2009c, Li et al. 2009a, Mousallem et al. 2001, Mutucumarana et al. 2000, Rost et al. 2004b, Rost et al. 2006, Soute et al. 2004, Spronk et al. 2000, Thomas und Stirling 2003, Titapiwatanakun et al. 2009, Vanakker et al. 2007)

Zum anderen kann der Defekt im Vitamin-K-Epoxid-Reduktase-Komplex (VKORC1) liegen (VKCFD Typ 2, OMIM [#607473](#)), sodass Vitamin-K-Epoxid nicht regeneriert werden kann und für weitere Carboxylierungen nicht zur Verfügung steht (Wu et al. 1997b). In der Literatur wurde bisher eine kausale VKORC1-Mutation bei 3 VKCFD2-Patienten nachgewiesen (Marchetti et al. 2008, Oldenburg et al. 2000, Rost et al. 2004a).

Phänotypisch tritt diese Art der Erkrankung sehr variabel auf. In Abhängigkeit der verbliebenen Restaktivität der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren kann es sowohl zu unterschiedlich stark ausgeprägter Blutungsneigung als auch – in seltenen Fällen – zu Skelettanomalien aufgrund der Beeinträchtigung der für den Knochenstoffwechsel wichtigen Vitamin-K-abhängigen Proteine (Osteocalcin, Matrix-Gla-Protein) kommen. Häufig entwickeln sich bereits intrauterin oder perinatal aufgrund des zu diesem Zeitpunkt bestehenden physiologischen Vitamin-K-Defizits schwerste intrazerebrale Blutungen. Bei einigen Patienten kann der Fakto-

renmangel durch orale Vitamin-K-Substitution komplett beseitigt werden, in anderen Familien dagegen gelingt dies selbst durch eine hochdosierte intravenöse Vitamin-K-Gabe nicht.

2.4 Pseudoxanthoma-elasticum-like Disorder

Eine weitere kürzlich beschriebene Manifestation von Mutationen im γ -Carboxylase-Gen ist ein dermatologisches Krankheitsbild, welches der Pseudoxanthoma elasticum stark ähnelt.

Pseudoxanthoma elasticum (PXE), oder auch Grönblad-Strandberg-Syndrom, ist eine autosomal-rezessive multipel ausgeprägte Erkrankung, die hauptsächlich die Haut, die Augen und das kardiovaskuläre System betrifft. Ursache für die Erkrankung sind Mutationen im ABCC6-Gen (Finger et al. 2009). PXE ist charakterisiert durch fortschreitende Kalzifizierungen und Degeneration der elastischen Fasern im ganzen Körper (Bercovitch und Terry 2004). Typisch sind unter anderem Retinopathien, sogenannte „angioid streaks“ oder „peau d’orange“, die zu Sehstörungen führen, konfluierende Papeln an Nacken und Beugestellen, Hautschädigungen im Sinne von lederartigen Faltungen und der Befall des kardiovaskulären Systems und somit arterielle Insuffizienzen, die zu Hämorrhagien führen können (Chassaing et al. 2005, Hu et al. 2003, Neldner 1988). Histologisch ist PXE charakterisiert durch fragmentierte und mineralisierte elastische Fasern in der retikulären Dermis.

Ein Zusammenhang zwischen einem klinischen Ausprägungsbild der PXE und einem Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren wurde erstmals im Jahre 1971 und dann zwischen 1982 und 1996 beschrieben, jedoch ohne einen gemeinsamen genetischen Hintergrund erkannt zu haben (Goldsmith, Jr. et al. 1982, Le Corvaisier-Pieto et al. 1996, Macmillan und Vickers 1971, Rongioletti et al. 1989).

Vanakker beschrieb im Jahr 2007 diverse Mutationen im γ -Carboxylase-Gen im Zusammenhang mit der klinischen Ausprägung der PXE-ähnlichen generalisierten Bindegewebsstörung (Vanakker et al. 2007). In seiner Studie wurden sechs kaukasische Patienten untersucht, die alle typisch gelbe Papeln, teilweise plaqueartig

konfluierend aufwiesen, sowie ausgeprägte Hautfaltungen hatten. Nur teilweise waren „angioid streaks“ vorhanden, jedoch leichte artherosklerotische Plaques. Einer der Patienten wurde zweimal wegen eines Hirnaneurysmas behandelt. Alle sechs jedoch zeigten eine verlängerte Prothrombinzeit und eine Verminderung der Vitamin-K-abhängigen Faktoren auf Werte zwischen 18 und 66% für Faktor II, 39 und 88% für Faktor VII, 48 und 103% für Faktor IX und 15 und 40% für Faktor X. Obwohl lichtmikroskopisch alle Faktoren identisch mit der PXE waren, stellte sich nach molekulargenetischer Untersuchung heraus, dass keine Mutation im *ABCC6*-Gen, typisch für die PXE, zu finden war. Auch Mutationen im *VKORC1*-Gen, die zu einem Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren führen (*VKCFD2*), konnten ausgeschlossen werden (Rost et al. 2004b). Schließlich wurde das *GGCX*-Gen auf Mutationen hin untersucht, und es stellten sich sieben neue Mutationen bei sechs Patienten heraus, die in Exon 8, 10 und 12 lokalisiert waren. Somit folgerte Vanakker, nach Ausschluss der Kriterien für PXE und *Cutis laxa*, dass es sich bei den klinischen Ausprägungen der Patienten um ein neues, der Pseudoxanthoma elasticum ähnliches Krankheitsbild handelt. In aktuellen Studien von Li et al. werden zwei weitere Fälle vorgestellt, in denen Patienten an Hauteffloreszenzen charakteristisch für PXE leiden, aber gleichzeitig eine Gerinnungsstörung vorweisen (Li et al. 2009c, Li et al. 2009a). Nach Sequenzierung der Gene *ABCC6*, *VKORC1* und *GGCX* ergaben sich auch bei diesen Patienten Mutationen im *GGCX*-Gen.

Li stellt als Hypothese bezüglich des Zusammenhangs zwischen den Mutationen im *GGCX* und den PXE-ähnlichen Hautveränderungen auf, dass durch eine Funktionsstörung im MGP (Matrix-Gla-Protein) Hypermineralisationen der Haut ermöglicht werden. MGP reguliert normalerweise, wenn es vollständig carboxyliert ist, abweichende Mineralisationen in der Haut (Price et al. 1998, Shearer 2000). Die hier vorliegenden Hypermineralisationen ähneln den mit PXE assoziierten Hypermineralisationen. Die genauen pathogenetischen Mechanismen konnten noch nicht abschließend geklärt werden.

2.5 Struktur des γ -Carboxylase-Gens und -Proteins

Das γ -Carboxylase-Gen (GGCX, Abb. 4) liegt auf Chromosom 2 im Bereich 2p11.2 (Kuo et al. 1995). Es ist rund 13 kb lang und besteht aus 15 Exonen (Wu et al. 1991).

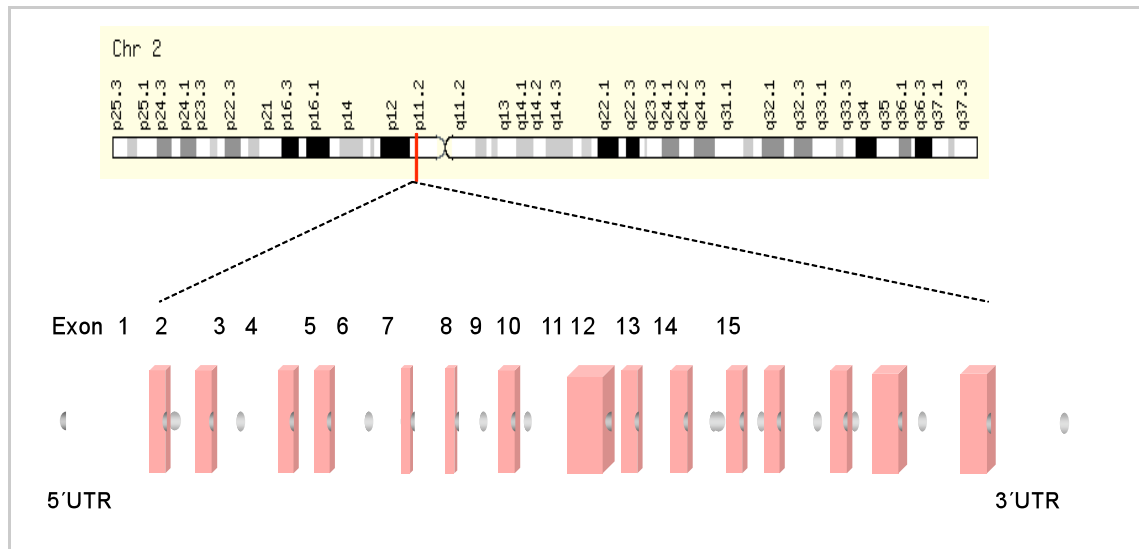


Abb. 4 **Lokalisation und Struktur des γ -Carboxylase-Gens (GGCX).**
GGCX ist lokalisiert im Chromosom 2 an der Stelle p11.2 und besteht aus 15 Exonen.

Die γ -Glutamyl-Carboxylase (Abb. 5) ist ein integrales Membranprotein sowohl des Golgi-Apparates als auch des rauen endoplasmatischen Retikulums, und setzt sich aus insgesamt 759 Aminosäuren zusammen. Am N-Terminus des Proteins liegt eine kurze hydrophile Region (Position 1–50), darauf folgt ein hydrophober Bereich (Position 51–314) und anschließend der lange, hydrophile C-Terminus (Position 315–758). Im hydrophoben Bereich sind vermutlich 3–5 Transmembrandomänen enthalten (Tie et al. 2000). Sie wird außer in der Leber in einer Vielzahl weiterer Gewebe wie z.B. Haut, Lunge oder Niere exprimiert (Vermeer 1984).

Entscheidend für die Funktion der γ -Glutamyl-Carboxylase sind folgende Domänen:

- die Propeptid-Bindungsstelle, welche die primäre Bindung des noch nicht carboxylierten Proteins an die γ -Carboxylase gewährleistet

- die katalytische Domäne, in der die Carboxylierung der Glutamatreste stattfindet, welche die sogenannte γ -Carboxylierungs-Erkennungssequenz („ γ -carboxylation recognition site“, γ -CRS) der Vitamin-K-abhängigen Vorläuferproteine bindet
- die Region mit Epoxidase-Aktivität, welche für die Oxidation von Vitamin-K-Hydrochinon verantwortlich ist

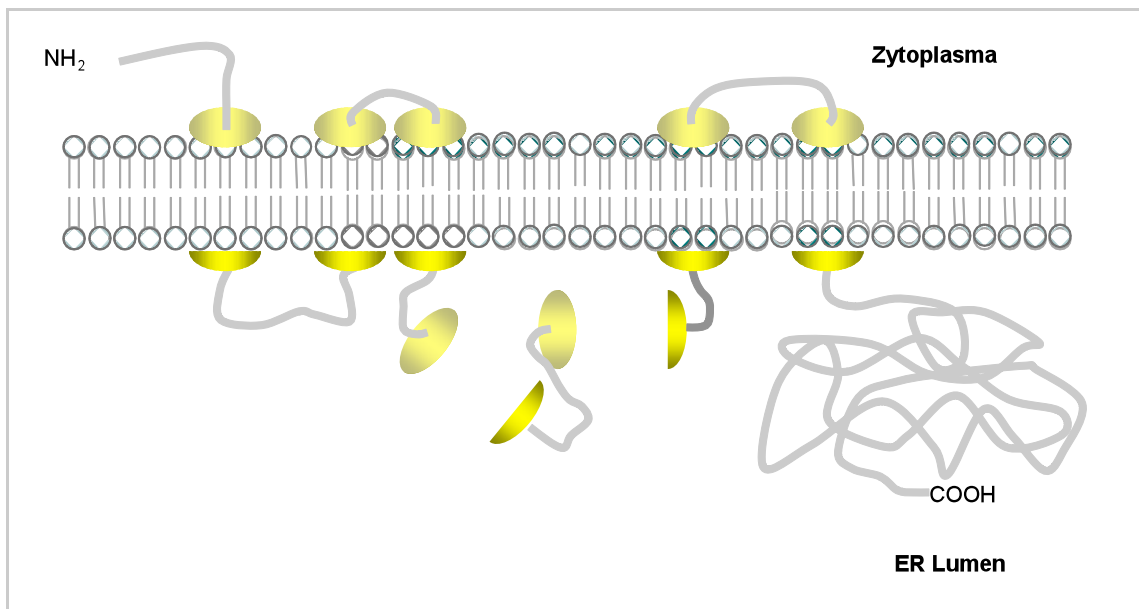


Abb. 5

Modell des γ -Carboxylase-Proteins (Tie et al. 2000).

Die Transmembrandomänen sind in Form von Zylindern dargestellt, wobei die beiden außerhalb der Membran liegenden Zylinder stark hydrophobe Regionen symbolisieren.

2.6 Funktion der γ -Glutamyl-Carboxylase

Die γ -Glutamyl-Carboxylase, die die Carboxylierung der Vitamin-K-abhängigen Faktoren gewährleistet, ist das einzige bekannte Enzym, das Vitamin K in seiner reduzierten Form, Vitamin-K-Hydrochin, als Cofaktor benötigt. Die γ -Glutamyl-Carboxylase katalysiert zwei chemische Reaktionen in ihrem aktiven Zentrum (Wallin und Suttie 1982). Die physiologisch wichtige Reaktion ist die Umwandlung von spezifischen Glutamatresten in der sogenannten Gla-Domäne der Vitamin-K-abhängigen Proteine zu γ -Carboxyglutamat. Der Grund dafür ist, dass γ -Carboxy-

glutamat eine weitaus höhere Bindungsaffinität zu Ca^{2+} hat als Glutamat und dadurch eine Konformationsänderung in den besagten Proteinen bewirkt. Nach der Konformationsänderung der nun carboxylierten Proteine ist eine Bindung an Phospholipidmembranen möglich, was für ihre Aktivierung und somit für die Ausübung ihrer physiologischen Funktion essenziell ist (Borowski et al. 1986, Sperling et al. 1978).

Die zweite Funktion der γ -Glutamyl-Carboxylase ist die Oxidation von Vitamin-K-Hydrochinon (KH₂) zu Vitamin-K-2,3-Epoxid, die unmittelbar mit der Carboxylierung gekoppelt ist.

Voraussetzung für die Substraterkennung und die anschließenden γ -Carboxylierung ist das Vorhandensein einer Propeptidsequenz, mit welcher die γ -Glutamyl-Carboxylase interagieren kann. Diese Propeptidsequenz, welche sich auch „ γ -carboxylation recognition site“ (γ -CRS) nennt, weist von Protein zu Protein abweichend eine unterschiedliche Affinität zur γ -Carboxylase auf. Beispielsweise weist Faktor X die höchste und Osteocalcin die niedrigste Affinität auf (Stanley et al. 1997).

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die γ -CRS als allosterischer Aktivator fungiert, indem die Affinität der Gla-Domäne an die γ -Glutamyl-Carboxylase erhöht wird. Beide zusammen, also die γ -CRS und die Gla-Domäne erhöhen wiederum die Affinität der γ -Glutamyl-Carboxylase gegenüber Vitamin-KH₂ (Berkner und Pudota 1998, Knobloch und Suttie 1987). Eine vollständige Carboxylierung der Vitamin-K-abhängigen Proteine wird erreicht, indem die γ -Carboxylase prozessiv arbeitet und somit alle Modifikationen der Glutamatreste während eines einzigen Bindungsereignisses ablaufen, ohne dass das Substrat freigegeben wird, wenn es nicht vollständig carboxyliert ist. GGCX kann somit zwischen Glu- und Gla-Resten unterscheiden (Morris et al. 1995).

Eine weitere Eigenschaft der γ -Carboxylase ist die Selbst-Carboxylierung, die jedoch nur in Anwesenheit von Vitamin K erfolgen kann (Berkner und Pudota 1998). Eine Erklärung für die Selbst-Carboxylierung der γ -Glutamyl-Carboxylase könnte eine Regulation des Carboxylase-Spiegels sein, welcher von der Verfügbarkeit von Vitamin K bzw. den Vitamin-K-abhängigen Proteinen abhängt, ist aber bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend geklärt.

2.7 Grundlagen der Genetik

2.7.1 Aufbau der DNA

Die DNA („desoxyribonucleic acid“) ist aufgebaut aus Einzelbausteinen, die Nukleotide genannt werden. Diese bestehen jeweils aus drei Komponenten:

- ein Fünf-Kohlenstoff-Zucker (Desoxyribose)
- eine Purin- bzw. Pyrimidinbase
- ein Phosphat-Rest

Dabei ist der Zucker mit der Base über eine N-glykosidische Bindung verbunden und der Phosphat-Rest ist über eine Ester-Bindung mit dem C5-Atom des Zuckers verknüpft.

Die Einzelbausteine werden zu zwei Nukleotidsträngen verknüpft, die antiparallel angeordnet sind und sich schraubenförmig um eine gemeinsame Achse winden, die sogenannte Doppelhelix. Dabei kommen die Nukleotidbasen im Innenraum der Helix zu liegen, während die Desoxyribosephosphatreste den äußeren Mantel bilden.

Durch die komplementäre Basenpaarung, die über Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, gibt es zu jeder Base nur eine komplementäre „Gegenbase“. So gibt es bei den vier Basen nur zwei Basenpaarungen: Adenin-Thimin und Guanin-Cytosin.

2.7.2 Mutationen, Polymorphismen und deren Auswirkungen

Veränderungen in der DNA-Sequenz, ob vererbt, spontan aufgetreten oder durch Umwelteinflüsse (z.B. ionisierende Strahlung oder chemische Substanzen) bedingt, werden in der Genetik unabhängig von phänotypischen Auswirkungen im Allgemeinen als Mutationen bezeichnet.

In der Medizin hingegen erfolgt eine Unterscheidung qualitativ nach dem Phänotyp. Eine Genvariation, die krank machende Eigenschaften besitzt, wird als Mutation bezeichnet, während eine Genveränderung, die ohne phänotypische Konse-

quenz bleibt, als Polymorphismus bezeichnet wird. Da Polymorphismen somit keinen Selektionsnachteil verursachen, können sie sich durch Vererbung in einer Population ausbreiten. Als Indiz für die fehlende funktionelle Bedeutung einer Genvariante wird häufig ein quantitatives Kriterium herangezogen. Treten Genvariationen gehäuft auf, d.h. findet sich das seltenere Allel bei mindestens 2% in der Bevölkerung bzw. bei mindestens 1% der Allele, spricht man grundsätzlich von Polymorphismen.

Wird nur ein Nukleotid durch eine Genveränderung betroffen, spricht man von einer Punktmutation. Wird diese durch eine andere ersetzt, bezeichnet man dies als Substitution, bei Austausch eines Basentyps mit dem gleichen (Purin gegen Purin bzw. Pyrimidin gegen Pyrimidin) spricht man von Transition. Wird dagegen eine Purinbase durch eine Pyrimidinbase ersetzt, oder umgekehrt, handelt es sich um eine Transversion.

Des Weiteren kann eine Genvariation in einem nicht codierenden (z. B. Introne) oder in einem codierenden Bereich (Exone) lokalisiert sein.

Insbesondere bei Veränderungen der codierenden Sequenz ist eine Störung der Proteinsynthese möglich. Je nach funktioneller Auswirkung werden folgende Mutationsformen unterschieden: Bei Kettenabbruch durch die neue Basensequenz spricht man von einer Nonsense-Mutation, bei Codierung für eine andere Aminosäure von Missense-Mutation. Codiert das neu entstandene Codon für die gleiche Aminosäure spricht man auch von einer „Silent Mutation“. Durch Wegfall oder Hinzukommen einer Base (Deletion oder Insertion) verschiebt sich das Leseraster (frameshift-Mutation), und der mRNA-Strang codiert häufig ein vorzeitiges Stopp-Codon.

Genveränderungen außerhalb der codierenden Sequenz können ebenfalls funktionelle Bedeutung erlangen. So führen Genveränderungen in den, die Exone flankierenden Bereiche als Spleißstellen-Mutationen zu einer Beeinträchtigung der RNA-Prozessierung. Mutationen in einem regulatorischen Bereich wie z.B. dem Promotor, können ebenfalls die Genexpression beeinflussen.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Probanden

3.1.1 Patienten mit VKCFD

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von vier Patienten mit einer Verminderung aller Vitamin-K-abhängiger Gerinnungsfaktoren auf Genveränderungen hin untersucht. Dabei handelte es sich um eine 38-jährige Frau aus Düren (Patient 1), eine 18-jährige Frau aus Berlin (Patient 2), eine junge Frau aus Portugal (Patient 3), deren klinischer Phänotyp bereits 1984 von Vicente et al. veröffentlicht wurde (Vicente et al. 1984), sowie um einen Patienten aus Indien (Patient 4).

Darüber hinaus standen die Mutter und ein Bruder von Patientin 1 sowie die Eltern von Patientin 2 für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Patientenproben wurden der Abteilung für Molekulare Hämostaseologie des Instituts für Transfusionsmedizin Frankfurt des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen zur genetischen Abklärung zugewiesen. Ein Vitamin-K-Mangel als Ursache der Verminderung der Gerinnungsfaktorenaktivität wurde jeweils im Vorfeld ausgeschlossen. Auch eine generelle Beeinträchtigung der Lebersyntheseleistung konnte aufgrund der normwertigen lebersyntheseabhängigen Parameter Antithrombin und Faktor V sowie durch einen unauffälligen, sonografischen Untersuchungsbefund ausgeschlossen werden.

3.1.2 Blutspender

Für die Ermittlung der genetischen Variabilität und des GGCX-Gens in der Allgemeinbevölkerung wurde DNA aus dem Blut von insgesamt 720 nicht verwandten, gesunden Blutspendern extrahiert. Für die statistische Ermittlung von Polymorphismen im genannten Gen wurden die jeweils 100 jüngsten männlichen und 100 jüngsten weiblichen Probanden herangezogen.

Durch die Untersuchung von 200 Proben bzw. 400 Allelen als Stichprobe der Normalbevölkerung gelingt die Ermittlung von Genvariationen, deren Prävalenz mindestens 1% beträgt, mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95%.

3.2 Material

Die in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien, Enzyme bzw. Kits wurden in Analysequalität oder höchstem erhältlichen Reinheitsgrad verwendet.

Tabelle 1: **Chemikalien, Enzyme und Kits.**

Hersteller	Reagenz
Applied Biosystems	Sequenzier-Kit (Big Dye [®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit)
MWG-Biotech	Oligonukleotidprimer
Biozym	Pipettenspitzen
Cambrex	Agarose (Seakem LE Agarose)
Eppendorf	Reaktionsgefäße 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml
Fluka	Nonidet P40
Greiner	Zentrifugenröhrchen
Invitrogen	Taq-Polymerase, 10x PCR Puffer
Merck	Kaliumacetat, Magnesiumchlorid, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid
PeqLab	100 bp-DNA-Längenstandard, Nukleotide
Qiagen	PCR-Purification-Kit
Sarstedt	EDTA-Blutmonovetten
Roth	Borsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Na ₂ EDTA, Proteinase K, Trishydroxymethylaminomethan, Salzsäure
Sigma	Bromphenolblau, Xylencyanol, Orange G, Glycerin, DMSO

3.3 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem H₂O angesetzt.

3.3.1 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Gel-Ladepuffer(1x):	0,25% Bromphenolblau 0,5% Orange G 0,25% Xylencyanol Glycerol
TBE-Puffer (5x):	0,44 M Tris-Borat 0,01 M Na ₂ EDTA pH 8,0–8,5
Ethidiumbromid-Färbelösung:	TBE-Puffer (1x) Ethidiumbromidlösung 1% (10mg/ml)

3.3.2 Lösungen für die DNA-Isolation

Kern-Lysispuffer (Blut):	Nonidet P40 0,1% NaCl 0,9%
SE-Puffer:	NaCl 75 mM Na ₂ EDTA 25 mM pH 8,0
Proteinase-K-Lösung:	10 mg/ml
SDS-Lösung:	20% SDS
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCL 1 mM EDTA pH 8

3.3.3 PCR-Reagenzien

Reaktionspuffer (10x):	100 mM Tris-HCl, pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂
PCR-Puffer (1x):	100 µl 10x-PCR Puffer 160 µl dNTP-Stammlösung 30 µl 50 mM MgCl ₂ -Lösung 610 µl HPLC-H ₂ O
dNTP-Mix:	1,25 mM je Nukleotid (dATP; dCTP, dGTP, dTTP) 950 µl HPLC-H ₂ O
Taq-Polymerase:	5U/µl

3.3.4 Reagenzien für die dHPLC

Puffer A	50 ml 2 M TEAA 250 µl Acetonitril HPLC-Wasser ad 1 l
Puffer B	50 ml 2 M TEAA 250 ml Acetonitril HPLC-Wasser ad 1 l
Puffer C	750 ml Acetonitril HPLC-Wasser ad 1 l
Puffer D	80 ml Acetonitril HPLC-Wasser ad 1 l

3.3.5 Reagenzien für die Sequenzierung

Mastermix:	0,12 µl Exo I (Fermentas, EN 0582) 0,50 µl CIAP (Fermentas, EF 0342) 0,30 µl 10x CIAP Puffer 2,10 µl Wasser
------------	--

3.3.6 Gele

Agarosegel: 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE;
Elektrophorese in 1x TBE-Puffer

3.4 Geräte

Die in Tabelle 2 aufgeführten Arbeitsgeräte wurden für die vorliegende Arbeit eingesetzt:

Tabelle 2: **Arbeitsgeräte.**

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik AG
Elektrophoresekammer	Horizon 11.14	Gibco-BRL
UV-Licht-Transilluminator	Fluorescent Tables	Renner GmbH
Kamera	The Imager	Appligene
Magnetrührer	Heidolph MR 3001	Heidolph
Mikrowelle	HF 22024	Siemens
Netzgeräte	Standard Power Pack P25	Biometra
PCR-Prozessoren	T3 Thermocycler	Biometra
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Pipetten	Serie Research	Eppendorf
Pipetten	Serie Labmate	Abimed
Schüttler	REAX	Heidolph
Waage	BL 610	Sartorius
Wasserbad	WB 10	Memmert
Zentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge	Universal 32 R	Hettich

3.5 γ -Glutamyl-Carboxylase Oligonukleotide

Für die Amplifikation sowie für die später folgende Sequenzierung wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide als Primer verwendet. Die Primer wurden mithilfe des internetbasierten, frei verfügbaren Programms „Primer3“ entworfen und von der Firma MWG Biotech synthetisiert (Rozen und Skaletsky 2000).

Tabelle 3: Oligonukleotide und Temperatur für PCR.

Exon	Primer	„Annealing“-Temperatur	Sequenz
1	forward	55 °C	GTT CAG ACG CGG CAG CTG TG
1	reverse	55 °C	CGG AGG GCG GGG TCC TAA G
2	forward	54 °C	CCC CCG CAC ACA TAT TTT CT
2	reverse	54 °C	CCA AAT TGC TCC CAC CCA TA
3	forward	53 °C	AGC TGA GGC CCA ATG ACC AA
3	reverse	53 °C	AGG CCA GTC AAT ATT TCC CA
4	forward	54 °C	CTC TTA ATC CTC TCC CTA CA
4	reverse	54 °C	TCC CCT TTG TCC CCC CTG AC
5	forward	54 °C	CTC CCC CCT CCA ATG TTT AC
5	reverse	54 °C	TCC CCT TTG TCC CCC CTG AC
6	forward	54 °C	TTT ATT CTT GCC TAT CTG TA
6	reverse	54 °C	CTG CTT CTG CTG AAT AGG GA
7	forward	53 °C	CTC CAG TGG GCT GGT GCT TG
7	reverse	53 °C	TGT GGT TCC TGT TTC CTC CC
8	forward	55 °C	GCC AAA CTC CTG AAA TAT GT
8	reverse	55 °C	GCC TTT GCT GTA CAC TCC AC
9	forward	52 °C	CAG TGT GAG AAG CAT TGA GC
9	reverse	52 °C	ACA AAA CCA GAC CCC AAA GC
10	forward	52 °C	GGT GGG ACT AAT ATG GGG GT
10	reverse	52 °C	CTT GGT AAA AAG AAC TGT GCT
11	forward	54 °C	CCT TAG GAA TGA TGA TGA AA
11	reverse	54 °C	CAA AAA CAT TCC CTC TCC CC
12	forward	56 °C	TGG GGT GGG ATG ATG AAC TC

Exon	Primer	„Annealing“-Temperatur	Sequenz
12	reverse	56 °C	TTA CTG GTG TGA GCT ACT GC
13	forward	55 °C	ATT TAT CCA TTT CTT CTC CC
13	reverse	55 °C	CTA TCT CAG CCC AAA TGT TC
14	forward	56 °C	AGG GGA GAG AGT GAT CCA TC
14	reverse	56 °C	CCA GGG GAA AGT TAC CAA GC
15	forward	54 °C	ACT TGG TCG GCT TTT TCC TG
15	reverse	54 °C	CTA TAT CTG CAC CCA ACA TC

3.6 Methoden

3.6.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA wird aus den Leukozyten der genannten Probanden gewonnen. Nach der „Aussalzmethode“ nach Miller und Dykes (Mullis und Faloona 1987) wird das Blut zunächst mit Kern-Lysispuffer versetzt und damit die Lyse der Zelle induziert. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wird das Pellet in SE-Puffer resuspendiert. Anschließend werden Proteinase K und die SDS-Lösung über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Proben werden daraufhin mit 6M NaCl-Lösung versetzt, gemischt und zur endgültigen Zerstörung der Proteine im Wasserbad erhitzt. Die so freigewordenen Zellbestandteile, wie Proteine und Membranen werden schließlich abzentrifugiert und verworfen. Der DNA-Überstand wird mit 96%igem Ethanol gefällt und sorgfältig gemischt bis die DNA fadenförmig sichtbar wird. Die durch eine Pasteurpipette mit Häkchen aufgenommene DNA wird zuletzt noch mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

Im Anschluss an die Isolation der DNA erfolgt die Konzentrationsbestimmung. Die Konzentration wird dabei photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, da die Nukleinsäuren hier ihr Absorptionsmaximum aufweisen.

Nach der Messung werden die Proben für die Amplifikation mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 100 µg DNA/ml eingestellt.

3.6.2 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Ermittlung von Polymorphismen in den einzelnen Fragmenten des GGCX-Gens wird eine ausreichende Menge der DNA-Teilstücke benötigt. Die notwendige Vervielfachung eines bekannten DNA-Abschnitts erfolgt mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Für diese Reaktion ist der in Tabelle 4 genannte Ansatz notwendig:

Tabelle 4: Reaktionsansatz für PCR.

Menge	Material
50 µl	1 x Puffer
1 µl	Forward Primer
1 µl	Reverse Primer
0,1 µl	Taq – Polymerase
2 µl	DNA

Neben dem zu amplifizierenden Fragment und der thermostabilen Polymerase werden noch zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer) benötigt, die zu den Randbereichen der bekannten DNA-Sequenz komplementär sind. Da die Polymerase nur in der Lage ist, in der Richtung 5'-3' zu synthetisieren, wird ein „forward“ Primer und ein „reverse“ Primer verwendet. Es folgt schließlich eine zyklische Wiederholung von drei Einzelreaktionen wobei bei n Zyklen theoretisch 2^n Kopien produziert werden. Somit ist es möglich, bei 30–35 Zyklen den gewünschten DNA-Abschnitt etwa um den Faktor $2-5 \times 10^5$ zu vervielfältigen (Mullis und Faloona 1987, Saiki et al. 1988).

Im ersten Schritt erfolgt zunächst die Erhitzung der DNA über ihren Schmelzpunkt hinaus und damit ihre Denaturierung. Im Anschluss kommt es zur Anlagerung der Primer („Annealing“) an die entsprechende nun einzelsträngige DNA und letztlich beginnt die Polymerisationsreaktion, katalysiert durch die Taq-Polymerase (Elongation). Dies geschieht in einem Thermocycler.

Für eine möglichst spezifische Amplifikation der gewünschten Zielsequenz wird das Prinzip der „touchdown“-PCR eingesetzt. Dies bedeutet, dass für die ersten neun Zyklen um 6 °C bzw. 3 °C höhere Temperaturen für das „Annealing“ eingesetzt werden. Damit wird eine unspezifische Anlagerung der Primer an nicht komplementäre DNA-Sequenzen bzw. an andere Primermoleküle reduziert. Während der ersten Zyklen wird das richtige Amplikon im Verhältnis zu unerwünschten Produkten überproportional vermehrt. Für die dann folgenden Zyklen wird die „Annealingtemperatur“ so gewählt, dass eine optimale Hybridisierung mit der Zielsequenz gewährleistet ist. Eine unspezifische Bindung mit Amplifikation unerwünschter Sequenzen fällt dann nicht mehr ins Gewicht. Das PCR-Programm enthielt die in Tabelle 5 aufgeführten Schritte und Temperaturen.

Die so entstandenen PCR-Produkte stellen jetzt das Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen dar.

Tabelle 5: Temperatur und Zyklen der PCR.

Status	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1 x
Denaturierung	95	30 sek	3 x
Annealing	AT* + 6	30 sek	
Elongation	72	30 sek	
Denaturierung	95	30 sek	6 x
Annealing	AT* + 3	30 sek	
Elongation	72	30 sek	
Denaturierung	95	30 sek	29 x
Annealing	AT*	30 sek	
Elongation	72	30 sek	
Finale Elongation	72	5 min	1 x

* AT bezeichnet die für die verschiedenen Fragmente charakteristischen Annealingtemperaturen, wobei für die ersten 9 Zyklen um 6 °C bzw. 3 °C höhere Temperaturen angewendet wurden.

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der DNA-Amplifikation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden die Amplifikate in Abhängigkeit ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt, mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt, anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Hierfür wurden die zu prüfenden Proben mit Gel-Ladepuffer gemischt in die Geltaschen eines 1,5%igen Agarose-Gels pipettiert (Meyers et al. 1976). Im Anschluss wurde eine Spannung von 150 Volt für ca. 20 Minuten angelegt. Nach Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid wurde die Laufstrecke der Amplifikate mit einem gleichfalls elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Längenstandard verglichen.

3.6.4 Heteroduplexbildung

Um durch die Denaturierende-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (dHPLC) einen möglichen Wildtyp von einer Mutation unterscheiden zu können, werden die PCR-Produkte der zu untersuchenden Patienten mit den PCR-Produkten einer Kontrollperson gemischt und 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Dann wurden die Ansätze zur Heteroduplexbildung 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht zunächst in der Denaturierung der DNA. Dafür werden durch Hitze die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den zwei Strängen gelöst und die DNA wird einzelsträngig. Darauf folgend kommt es durch die Renaturierung zur Bildung von Homo- und Heteroduplexen.

3.6.5 Denaturierende-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)

Die denaturierende-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (dHPLC) ermöglicht das empfindliche und schnelle Auffinden von bekannten und nicht bekannten Mutationen und Polymorphismen in den einzelnen Fragmenten eines zu untersuchenden Gens (Xiao und Oefner 2001). Das Prinzip des Verfahrens beruht auf dem der Flüssigkeitschromatographie.

Die Analyse der Proben erfolgte mit einem WAVE®-DNA-Fragment-Analysesystem (Fa. Transgenomic, San José, USA). Hier werden jeweils 8 µl einer Probe zu der in einer Säule befindlichen Trennmatrix gepumpt und in dieser gebunden. Im Zeitverlauf und mit ansteigender Acetonitril-Konzentration werden sie von hier wieder eluiert. Nach der Abtrennung von der Matrix können sie mittels eines Photometers analysiert werden. Die Ergebnisse können anschließend mithilfe der geeigneten Software WaveMaker 3.4 (Fa. Transgenomic, La Jolla) auf einen Rechner übertragen und auf dem Bildschirm als Peaks in einem Chromatogramm dargestellt werden.

Um die Bindung zwischen den negativ geladenen DNA-Molekülen und der neutralen Trennmatrix der HPLC-Säule zu erreichen, wird als Zwischenmolekül das, sowohl in Puffer A als auch B vorhandene, positiv geladene Triethylammoniumacetat (TEAA) verwendet. Dies bedeutet eine umso festere Bindung, je mehr negative Ladung die jeweiligen DNA-Moleküle besitzen. Ziel hierbei ist die Unterscheidung von Homoduplices oder Heteroduplices. Homoduplices sind DNA-Stränge mit identischer Sequenz. Eine solche Probe kann somit eine Probe vom Wildtyp oder aber eine Probe mit homozygotem Polymorphismus sein. Bei Heteroduplices befindet sich immer eine Sequenzveränderung, entweder auf dem einen oder dem anderen Strang. Mit steigender Temperatur denaturieren zunächst die Heteroduplices. Durch die dadurch geringere negative Ladung und damit weniger starke Bindungskraft zur Matrix werden diese zuerst vom Photometer erfasst und als Peaks festgehalten, sodass anhand der jeweiligen Peaks eine Probe als Homo- bzw. Heteroduplex erkannt werden kann. Diese beiden stellen sich dann in den Untersuchungen mit der dHPLC unterschiedlich dar (Abb. 6), wobei das Bild der Homoduplices zum einen Wildtyp darstellen kann, zum anderen aber auch bedeuten kann, dass bei der Probe ein homozygoter Polymorphismus vorliegt. Ein sich vom Wildtyp unterscheidendes Muster ergibt sich bei Sequenzunterschieden zwischen beiden Strängen einer Probe, also bei heterozygot vorliegenden Genvarianten.

Ganz entscheidend für die Qualität und die Empfindlichkeit der beschriebenen Methode ist die Kontrolle des Acetonitril-Gradienten und der Temperatur (Kuklin et al. 1997).

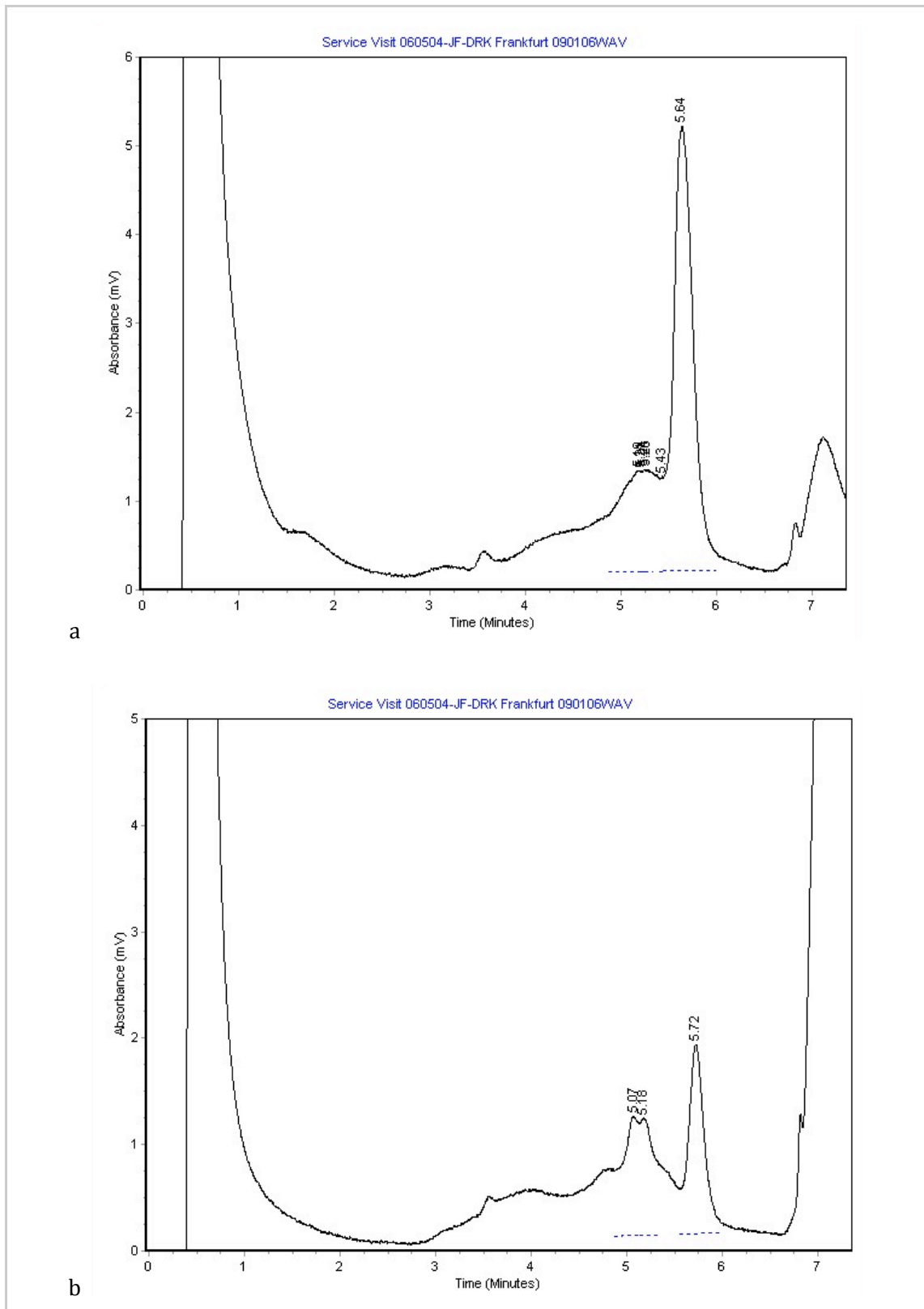


Abb. 6

Beispiele für PCR-Proben.

- a) Ohne Polymorphismus nach der Analyse durch die dHPLC.
- b) Mit Polymorphismus nach Analyse durch die dHPLC.

3.6.6 Sequenzierung

Das WAVE®-DNA-Fragment-Analysis-System stellt eine Screening-Methode zum Nachweis von Genvarianten dar. Zur näheren Charakterisierung der vorliegenden Varianten muss anschließend die genaue Abfolge der Nukleotidsequenz ermittelt und mit der bekannten „Wildtyp“-Sequenz des entsprechenden Fragmentes verglichen werden. Dies erfolgte durch die Sequenzierungsreaktion nach dem Prinzip des Kettenabbruchs (Sanger et al. 1977):

Verwendet werden dabei fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP), die bei der Reaktion mit den unmarkierten Nukleotiden konkurrieren. Beim Einbau von markierten Nukleotiden kommt es allerdings wegen der fehlenden freien OH-Gruppe zu keiner weiteren Kettenverlängerung, sondern zum Abbruch. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange Teilstücke, die je nach der letzten Base unterschiedlich markiert sind. Im Kapillarsequenzierautomat ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Fa. PE Applied Biosystems) werden dann die DNA-Teilstücke elektrophoretisch aufgetrennt und automatisch analysiert, sodass die Nukleotidsequenz gelesen werden kann.

Die einzelnen Reaktionsschritte bei der Sequenzierung sind:

- **Exo/CIAP Verdau von Primern und dNTPs**

Für die Aufreinigung werden 5 µl des PCR-Produktes mit 3 µl des nachfolgend aufgeführten Mastermixes gemischt und anschließend im Thermocycler inkubiert (30 min 37 °C, 20 min 85 °C)

Mastermix:

0,12 µl Exo I (Fermentas, EN 0582)

0,50 µl CIAP (Fermentas, EF 0342)

0,30 µl 10 x CIAP Puffer

2,10 µl Wasser

3,02 µl

Nach Ablauf des Programms sollten die Proben möglichst schnell sequenziert werden, da die Enzymrestaktivität das PCR-Produkt langsam degradiert. Für die nächsten Schritte werden die zu sequenzierenden Proben mit 5 µl Wasser verdünnt.

■ Sequenzierung

Hierfür wird 1 µl des Produktes mit 9 µl des nachfolgend aufgezeigten Mastermixes gemischt und im Thermocycler sequenziert:

96 °C 1 min

96 °C 10 sec

50 °C 5 sec

60 °C 4 min

10 °C unendlich

Mastermix:

0,5 µl Big Dye

1,5 µl 5 x Sequenzierungspuffer

1,0 µl Primer 1,6 pmol/µl

6,0 µl H₂O (Sigma)

9,0 µl

■ Fällung zur Abtrennung fluoreszenzmarkierter ddNTPs

Es wird zunächst folgender Ansatz gemischt:

10 µl H₂O (Sigma)

2 µl NaAc-Lösung (3 M, pH 4,6)

54 µl Ethanol (96%)

Diese 66 µl werden mit 10 µl der Sequenzierreaktion gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 45 Minuten bei 20 °C zentrifugiert (1780 g; 4000 UpM).

Nach dem Abnehmen des Überstandes wird das Pellet mit 260 µl Ethanol 70% versehen und erneut 10 Minuten zentrifugiert. Erneut wird der Überstand abgenommen, die Probe wird getrocknet und letztlich werden 10 µl Formamid hinzugegeben. So kann die Probe nun in dem Sequenzierautomaten analysiert werden.

3.7 Methoden der Bioinformatik

Die Methoden der Bioinformatik liefern die Basis zur Analyse und zum Verständnis großer Datenmengen, die über die molekulare Diagnostik in der Genomik und Proteomik geliefert werden.

Bioinformatische Methoden werden für Sequenzvergleiche, Datenbanksuchen, Motiverkennung, phylogenetische Analysen, Strukturvorhersagen von RNAs und Proteinen, Promotoranalysen, Transkriptomanalysen, Proteomanalysen und zur Modellierung komplexer biologischer Systeme verwendet.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Datenquellen und bioinformatischen Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

3.7.1 Datenquellen

Die Bereitstellung von Daten im Internet war eine entscheidende Voraussetzung für die Weiterentwicklung der Bioinformatik. Die dort verfügbaren Datenbanken speichern sowohl Primärdaten als auch abgeleitete Daten. In primären Sequenzdatenbanken werden DNA-, RNA-, und Proteinsequenzen gespeichert.

Im Rahmen einer internationalen Zusammenarbeit tauschen drei weltweit relevante Hauptdatenbanken täglich ihre Daten aus:

- GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI; Bethesda, MD, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>)
- Nucleotide Sequence Database (European Molecular Biology Laboratory, EMBL/EBI; Hinxton, UK; <http://www.ebi.ac.uk/>)
- DNA Data Bank of Japan (DDBJ; Mishima, Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)

Hier legen Wissenschaftler neu ermittelte Sequenzdaten nach minimaler Konsistenzprüfung ab. Der Vorteil liegt in der schnellen öffentlichen Verfügbarkeit der Sequenzen. Nachteilig ist die fehlende Qualitätsprüfung, sodass zu einem einzigen Gen zum Teil sehr viele redundante Sequenzen mit minimalen Sequenzabweichungen vorhanden sind. Einmal gespeicherte fehlerhafte Sequenzen werden von den Datenbankbetreibern nicht nachträglich korrigiert und verbleiben für immer in der Datenbank.

Manuell gewartete und betreute Datenbanken wie beispielsweise Swiss-Prot überprüfen und filtern die Daten, um Fehler, Widersprüche und Redundanzen zu vermeiden. Sofern vorhanden, wurde in der vorliegenden Arbeit bei Proteinsequenzvergleichen bevorzugt auf Sequenzdaten aus Swiss-Prot zurückgegriffen.

3.7.2 Nomenklatur

Für die Angabe der Art und Lokalisation der Mutationen wurde in dieser Arbeit die Nomenklatur der Human Genome Variation Society (g.=genomische DNA, c.=cDNA, p.=protein) verwendet (<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/>). Die Angabe der Aminosäuren bezieht sich hier auf das translatierte Protein, inklusive Signalpeptid.

3.7.3 Sequenzvergleich homologer Proteine

Zur Beurteilung des Effektes einer nachgewiesenen Missense-Mutation bedient man sich unter anderem auch eines Sequenzvergleichs („Alignment“) mit verschiedenen homologen Proteinen (Tabelle 6). Als homologe Proteine werden solche bezeichnet, die vermutlich von einem gemeinsamen Urgen abstammen. Ein hoher Grad an Sequenzidentität von über 40% zählt dabei als Kriterium ihrer Homologie.

Man kann das „Alignment“ als Rekonstruktion der Veränderungen – Mutationen, Deletionen, Insertionen – auffassen, die im Zug der Evolution erfolgten. Taucht eine Aminosäure in den verglichenen Proteinsequenzen an gleicher Stelle auf, so spricht man von einem „match“ (Treffer), bei unterschiedlichen Aminosäuren von einem „mismatch“. Zum Teil treten dabei auch Lücken auf, d.h. Positionen in einer Sequenz, zu der sich keine Entsprechungen in der anderen finden lassen. Der Quotient der Übereinstimmungen zur Gesamtzahl der Aminosäuren in der angeordneten Sequenz gilt als quantitatives Maß für die Sequenzidentität. Man bewertet nicht nur die Identität, sondern auch die Ähnlichkeit entsprechender Positionen. So erwartet man etwa beim Austausch von zwei Aminosäuren mit gleicher Ladung und ähnlicher Größe weniger drastische Effekte als beim Austausch zweier Aminosäuren mit unterschiedlicher Ladung und Größe.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das im Internet frei verfügbare Programm CLUSTAL W[®] verwendet (Chenna et al. 2003).

Tabelle 6: **Humane γ -Carboxylase und homologe Proteine verschiedener Spezies** mit Zugangscode („accession“-Nummer) für die entsprechenden internetbasierten Datenbanken.

Protein	Spezies	deutsche Spezies-Bezeichnung	„accession“-Nummer
γ -Carboxylase	Homo sapiens	Mensch	P38435
γ -Carboxylase	Mus musculus	Hausmaus	Q9QYC7
γ -Carboxylase	Rattus norvegicus	Wanderratte	O88496
γ -Carboxylase	Bos taurus	Europäisches Hausrind	Q07175
γ -Carboxylase	Ovis aries	Hausschaf	AAG30935
γ -Carboxylase	Delphinapterus leucas	Belugawal	AAF82125
γ -Carboxylase	Opsanus tau	Krötenfisch	AAF82126
γ -Carboxylase	Drosopila melanogaster	Fruchtfliege	AAF89097
γ -Carboxylase	Conus textile	Textil-Kugelschnecke	AAM46172

4 Ergebnisse

4.1 Ermittlung der Genvarianten im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen

In der vorliegenden Arbeit wurde DNA von vier Patienten mit Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren und insgesamt vier Verwandten, sowie die vorher extrahierte DNA von 200 nicht verwandten gesunden Blutspendern untersucht, um Genveränderungen im GGCX-Gen zu charakterisieren, die in der Allgemeinbevölkerung mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auftreten und damit als nicht „krank machende“ Polymorphismen gelten. Mittels des PCR-Verfahrens wurde der zu untersuchende DNA-Abschnitt vervielfältigt, sodass eine ausreichende Menge des zu analysierenden Amplifikats vorhanden war. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung der Qualität des PCR-Produktes wurden sämtliche Proben für die Analyse in das WAVE® -DNA-Fragment-Analysis-System gegeben. Es handelte sich dabei also insgesamt um 3000 Proben: 200 Spenderproben x 15 Exone des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens.

Prinzipiell wurden danach solche Proben weiter untersucht, die ein vom Wildtyp abweichendes Muster aufwiesen. In der Regel stellte dies ein Doppel- bzw. Mehrfachpeak dar, wogegen das Wildtypmuster als Einzelpeak sichtbar war. Dieses Verfahren kann allerdings nur für solche Exone zuverlässig eingesetzt werden, bei denen nur wenige und seltene Polymorphismen oder Mutationen bekannt sind. In Genabschnitten, in denen ein oder mehrere Polymorphismen gehäuft vorkommen, ist die beschriebene Methode zu ungenau. Insbesondere wenn die Polymorphismenhäufigkeit mehr als 10% beträgt ist, könnte das Bild eines Einzelpeaks mit einer Wahrscheinlichkeit von über 1% einer Probe mit einem homozygotem Polymorphismus entsprechen. Da diese Homozygoten unbedingt ermittelt werden sollten, wurden solche Exone weitergehend untersucht.

Hierfür wurde eine Probe, die durch die Sequenzierung sicher als Wildtyp-Probe identifiziert wurde, mit einer Probe gemischt, die auf dem dHPLC-Bildschirm einen Einzelpeak aufwies und somit also entweder Wildtyp oder Polymorphismus homozygot bedeutet. Aus dieser neuen Probe bestehend aus Wildtyp (WT) + Wildtyp oder Wildtyp + Homozygot wurden erneut Heteroduplices gebildet. Dabei ergeben sich folgende Kombinationsmöglichkeiten:

- aa + aa = aa, aa, aa, aa
- aa + AA = aA, aA, Aa, Aa
- aa entspricht Wildtyp
- AA entspricht Homozygot
- Aa/aA entspricht Heterozygot

Liegt eine Mischung von zwei Wildtyp-Proben vor, resultiert ein Einzelpeak. Handelt es sich dagegen um die Kombination Wildtyp/Homozygot, muss sich ein Doppelpeak und damit das Bild eines Heterozygoten ergeben.

Nach Abschluss der Analysen durch die dHPLC, wurden alle auffälligen Proben sequenziert, um die gefundenen Polymorphismen eindeutig zu charakterisieren.

Zur Ermittlung von Genveränderungen bei den vier VKCFD-Patienten sowie bei den insgesamt dazugehörigen vier Verwandten wurde auch hier die DNA extrahiert, durch die PCR amplifiziert und schließlich eine Kompletsequenzierung des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens unternommen.

4.2 Mutationen bei VKCFD-Patienten

Tabelle 7 zeigt die bei den Probanden und den jeweiligen Angehörigen gefundenen Mutationen im GGCX-Gen.

Tabelle 7: **Nachgewiesene Mutationen im GGCX-Gen bei VKCFD-Patienten und Familienangehörigen.**

Proband	Allel 1	Allel 2	Genotyp
1-1	c.1211A>C, p.His404Pro	c.1454G>C, p.Arg485Pro	Comp. het.
1-2 (Mutter)		c.1454G>C, p.Arg485Pro	Het.
1-3 (Bruder)			Wildtyp
2-1	c.944G>A, p.Trp315X	c.1454G>C, p.Arg485Pro	Comp. het.
2-2 (Mutter)	c.944G>A, p.Trp315X		Het.
2-3 (Vater)		c.1454G>C, p.Arg485Pro	Het.
3-1	c.610C>T, p.Arg204Cys	c.610C>T, p.Arg204Cys	Hom.
4-1	c.982C>A, p.Gln328Lys	c.982C>A, p.Gln328Lys	Hom.

Patient 1

Bei Patientin Nr. 1, einer 38-jährigen Frau aus Düren, war im Rahmen einer routinemäßig durchgeführten präoperativen Gerinnungsdiagnostik eine ausgeprägte Verminderung des Quickwertes aufgefallen. Im Rahmen weitergehender Untersuchungen fiel eine chronische Verminderung aller gemessenen Vitamin-K-abhängigen Parameter auf. Selbst durch die hochdosierte Gabe von Vitamin K konnte die Aktivität dieser Parameter nur teilweise normalisiert werden. Die Werte vor und nach der Gabe sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: **Gerinnungsbefunde bei Patientin 1 vor und nach Vitamin-K-Gabe.**

	Einheit	Normalbereich	vor Vitamin-K-Gabe	nach Vitamin-K-Gabe
APTT	[s]	30–45	38	28
Quick	[%]	70–100	28	56
Fibrinogen	[g/L]	2,0–4,5	2,8	

	Einheit	Normalbereich	vor Vitamin-K-Gabe	nach Vitamin-K-Gabe
FII:C	[%]	75–110	35	71
FV:C	[%]	70–140	118	
FVII:C	[%]	65–130	37	69
FVIII:C	[%]	70–170	126	
FIX:C	[%]	70–120	54	90
FX:C	[%]	75–115	13	28
Antithrombin	[%]	80–120	118	
Protein S-Aktivität	[%]	70–120	56	63
Protein C-Aktivität	[%]	60–140	37	48

Zum Ausschluss einer angeborenen Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Parameter aufgrund eines γ -Glutamyl-Carboxylase-Defekts (VKCFD Typ 1, OMIM *137167) wurde eine Komplettssequenzierung des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens unternommen.

In die Untersuchung konnten neben der Probandin auch die Mutter sowie ein Bruder einbezogen werden. Bei der Index-Person konnten zwei Defekte im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um eine Missense-Mutation (p.His404Pro) in Exon 9 sowie um eine Missense-Mutation (p.Arg485Pro) in Exon 11. Bei der Mutter der Patientin konnte die Mutation p.Arg485Pro in heterozygoter Ausprägung nachgewiesen werden, gerinnungsphysiologisch ergaben sich keine Auffälligkeiten (Abb. 7).

Somit ließ sich schlussfolgern, dass die Mutation an Position 404 von dem zwischenzeitlich verstorbenen Vater vererbt worden sein musste, sodass bei der Patientin 1 die beiden unterschiedlichen Mutationen beide Chromosomen betreffen und somit „compound heterozygot“ vorliegen.

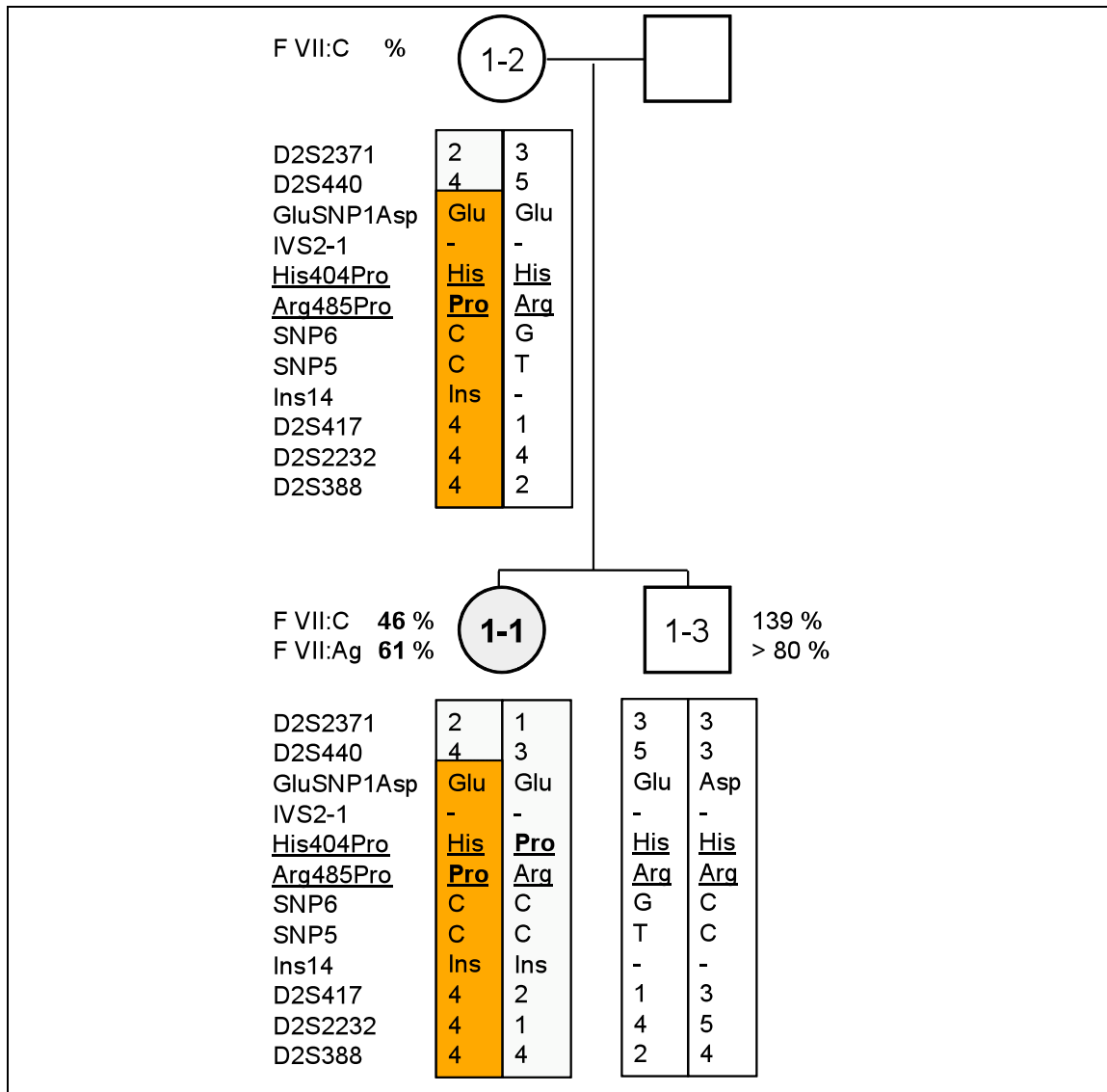


Abb. 7 Stammbaum von Patientin 1.

Patient 2

Patientin 2, ein 18-jähriges Mädchen aus Deutschland, das Vitamin-K-substitutionspflichtig war, wurde ebenfalls auf eine Veränderung im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen getestet. Zusätzlich konnten Mutter und Vater des Mädchens analysiert werden. Bei der Patientin ergaben sich in Exon 8 eine Stopp-Mutation (p.Trp315X) und in Exon 11 eine Missense-Mutation (p.Arg485Pro). Von der Mutter wurde die Stopp-Mutation vererbt und vom Vater die Missense-Mutation, somit konnte bei der Patientin eine „compound heterozygote“ Konstellation bestätigt werden.

Patient 3

Patientin 3 aus Portugal litt seit Geburt an zahlreichen hämorrhagischen Episoden und Hämatomen. Bei den Untersuchungen in Portugal im Jahr 1982 wurde eine Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren festgestellt. Eine molekular-genetische Analytik wurde nicht durchgeführt (Vicente et al. 1984).

Nach Analyse des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens im Rahmen der Untersuchungen ergab sich eine homozygote Missense-Mutation in Exon 5 (p.Arg204Cys), welche wahrscheinlich die Vitamin-K-Bindungsstelle beeinträchtigt.

Patient 4

Bei Patient 4 aus Indien, mit einer schwerwiegenden VKCFD, wurde eine homozygote Missense-Mutation in Exon 8 (p.Gln328Lys) gefunden. Da Gln328 in einer zytoplasmatischen Schleife liegt, ist es höchst unwahrscheinlich, dass es einen direkten Effekt auf die wichtigen Regionen (z.B. Vitamin-K-Bindungsstelle) hat.

4.3 Genvarianten bei 200 gesunden Blutspendern

Bei den beschriebenen Untersuchungen wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Polymorphismen gefunden.

Tabelle 9: **Ermittelte Polymorphismen** mit Lokalisation und Häufigkeit.

Exon/Intron	Genort	Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Allelhäufigkeit (eigene Daten)
Intron 1	g.807	c.43+33T>A		T 96,5% A 3,5%
Exon 3	g.3223	c.339C>T	p.(=)	C 98,25% T 1,75%
Exon 8	g.8762	c.974G>A	p.Arg325Gln	G 64,75% A 35,25%
Exon 9	g.9167	c.1218C>T	p.(=)	C 73,25% T 26,75%
Exon 9	g.9191	c.1242C>T	p.(=)	C91% T 9%
Intron 10	g.9570	c.1288-38T>C		T 99,25% C 0,75%
Exon 11	g.10248	c.1494C>T	p.(=)	C 99,5% T 0,5%
Intron 15	g.12028	c. 2085-21 C>T		C 79,5% T 20,5%

(nach g.DNA U65896)

Exon 1

In Exon 1 fand sich bei unseren Untersuchungen ein Polymorphismus, der in der Internet-Datenbank nicht angegeben war.

Die entsprechende Genveränderung auf einem der zwei Stränge stellt einen Austausch der Base Thymin mit der Base Adenin an der Stelle g.807, einem nicht codierenden Abschnitt im Anschluss an Exon 1 dar (Abb. 8, Abb. 9).

In Prozent ausgedrückt, kann für diese Untersuchung eine Häufigkeit des genannten Polymorphismus von 3,5% angegeben werden.

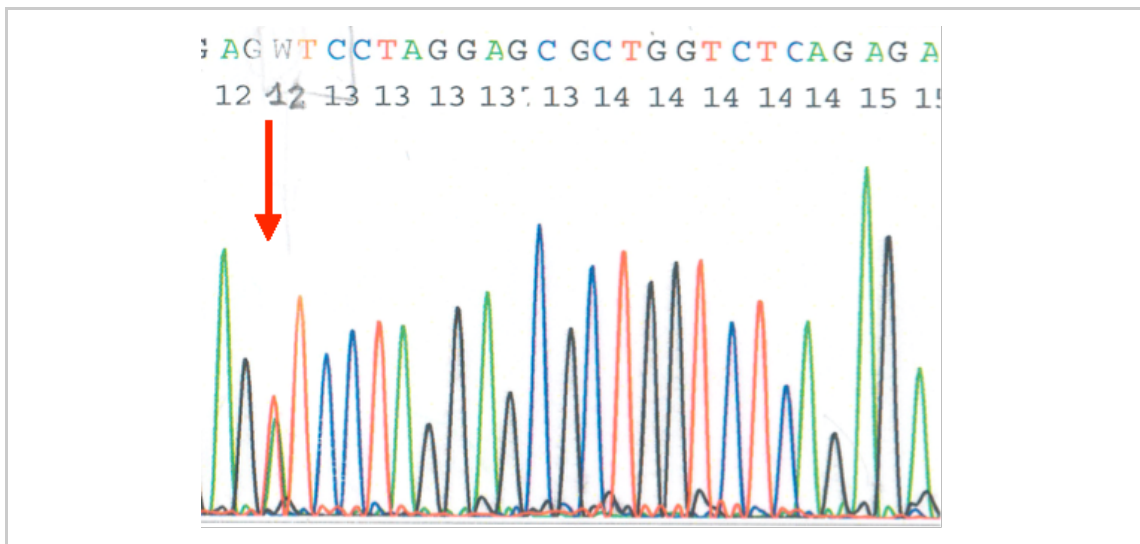


Abb. 8 **Ausschnitt der Sequenz einer Probe mit Polymorphismus in Exon 1.** g.807 c.43+33T>A, an der markierten Stelle befindet sich sowohl ein Thymin als auch ein Adenin. (Farbcodierung: rot = Thymin, grün = Adenin, schwarz = Guanin, blau = Cytosin).

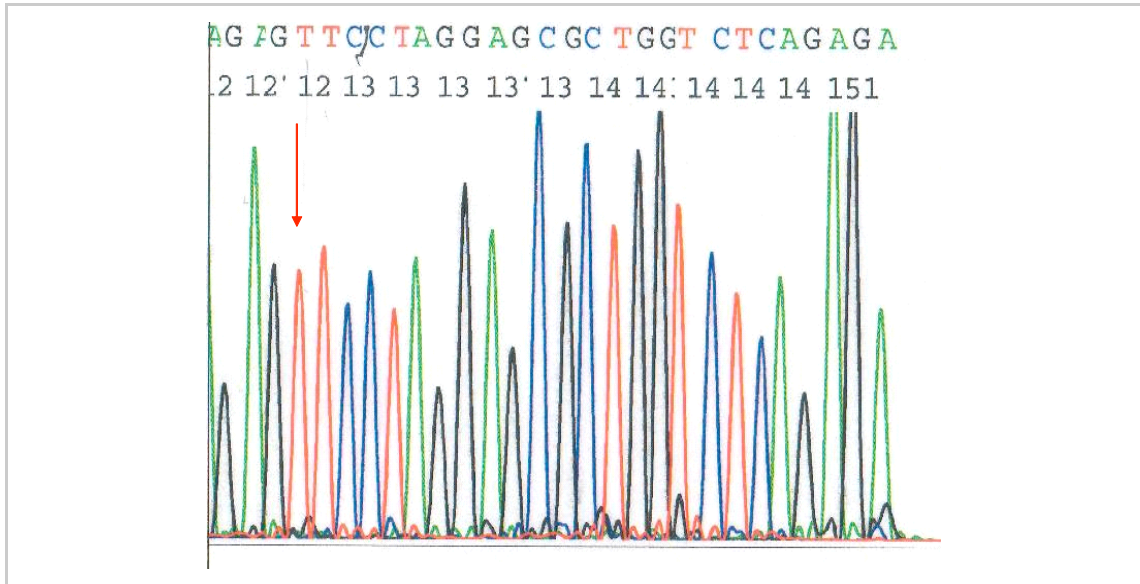


Abb. 9 **Ausschnitt der Sequenz einer Probe ohne Polymorphismus in Exon 1.**
(Farbcodierung: rot = Thymin, grün = Adenin, schwarz = Guanin, blau = Cytosin).

Exon 2

In Exon 2 fand sich bei unseren Untersuchungen kein Polymorphismus. Die Datenbank gibt jedoch zwei verschiedene Polymorphismen im codierenden Bereich an. Der erste Polymorphismus befindet sich im Codon 53 und bezeichnet einen Austausch von Cytosin zu Adenin, der keine Änderung der Aminosäure Threonin bewirkt (rs61733104). Der letzte bekannte Polymorphismus wird im Codon 63 angegeben, wobei auch hier keine Aminosäure verändert wird. Cytosin wird zu Thymin und die Aminosäure Serotonin bleibt gleich.

Exon 3

Der in diesem Exon gefundene Polymorphismus konnte den in der Literatur bereits bekannten Polymorphismus bestätigen. Unter den 200 Personen fand sich bei 7 das entsprechende Allel, der Polymorphismus trat also mit einer Häufigkeit von 1,75% auf. Im Codon 113 wird Cytosin in Thymin ausgetauscht, allerdings ohne eine Konsequenz für die Aminosäure Asparaginsäure.

Exon 4, 5, 6

In den codierenden Abschnitten vier, fünf und sechs konnten bei den 200 untersuchten gesunden Blutspendern keine Abweichungen von der Referenzsequenz erkannt werden. Auch die genannte Datenbank gibt keine Polymorphismen und Mutationen in diesen drei Exonen bzw. in deren unmittelbarer Nähe an.

Exon 7

Für das Exon 7 gibt die Datenbank einen seltenen Polymorphismus für das GGCX-Gen an. Als Austausch von Cytosin zu Adenin befindet sich dieser in Codon 279 (rs1254896). Diese Abweichung von der Norm-Sequenz konnte bei keinem der Blutspender gezeigt werden. Eine Häufigkeit wird zudem nicht angegeben.

Exon 8

Für das Exon 8 gibt die Datenbank zwei Polymorphismen an, einen ohne Häufigkeitsangabe und einen relativ häufigen. Der erste befindet sich in einem Bereich vor dem codierenden Exon. Er äußert sich in einen Austausch der Base Thymin durch Cytosin (rs4832003).

Der zweite, mit 42,5%, häufigere Polymorphismus ist in Codon 325 zu finden. Er äußert sich in einer Veränderung von Guanin zu Adenin an der zweiten Stelle des Basentriplets und führt somit zu einer Aminosäurenaustausch von Arginin zu Glutamin.

Unsere 200 Blutspender konnten diesen angegebenen Polymorphismus bestätigen.

Exon 9

In Exon 9 wurden zwei in der Datenbank bekannte Genveränderungen durch unsere Untersuchungen bestätigt.

Die erste Genveränderung beschreibt einen Austausch der Base Cytosin mit der Base Thymin in Codon 406 ohne eine nachfolgende Veränderung der Aminosäure Arginin (Abb. 10, Abb. 11). Sie wird mit 38 % angegeben (rs.2592551). Unsere Probanden zeigten eine Häufigkeit von 26,75 %.

Der zweite aus der Datenbank bekannte Polymorphismus befindet sich in Codon 414, in dem an der letzten Stelle des Triplets ein Austausch von Cytosin zu Thymin erfolgt, auch hier ohne Aminosäurenveränderung (Threonin bleibt gleich; rs.10179904). Die Datenbank gibt diesen mit 11 % Häufigkeit an, unsere Ergebnisse liegen bei 9 %.

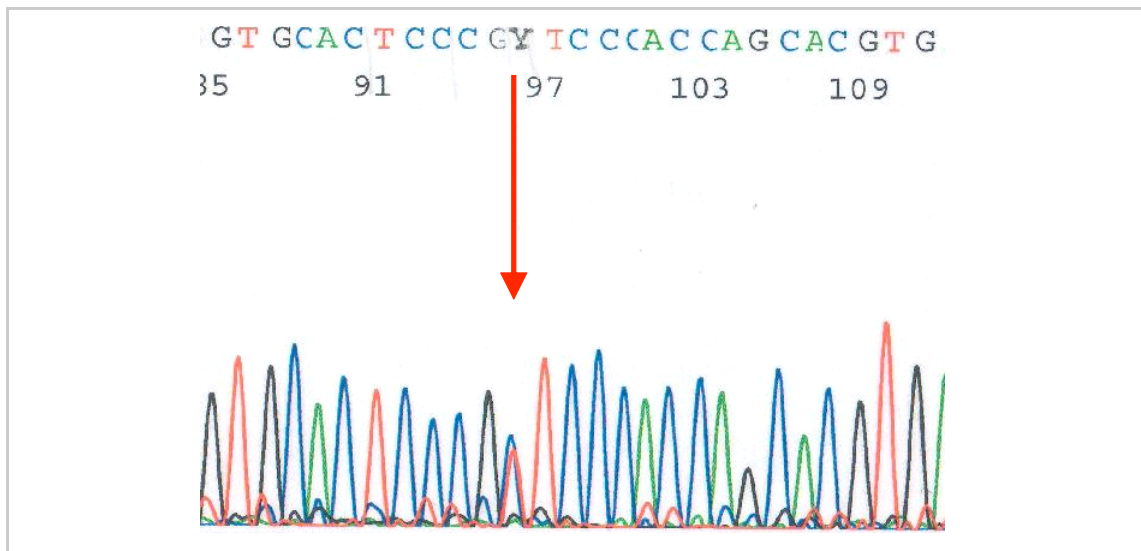


Abb. 10 **Ausschnitt einer Probe mit Polymorphismus in Exon 9.**
g.9167 c.1218C>T p.(=), an der markierten Stelle befindet sich sowohl ein Cytosin als auch ein Thymin. (Farbcodierung: rot = Thymin, grün = Adenin, schwarz = Guanin, blau = Cytosin).

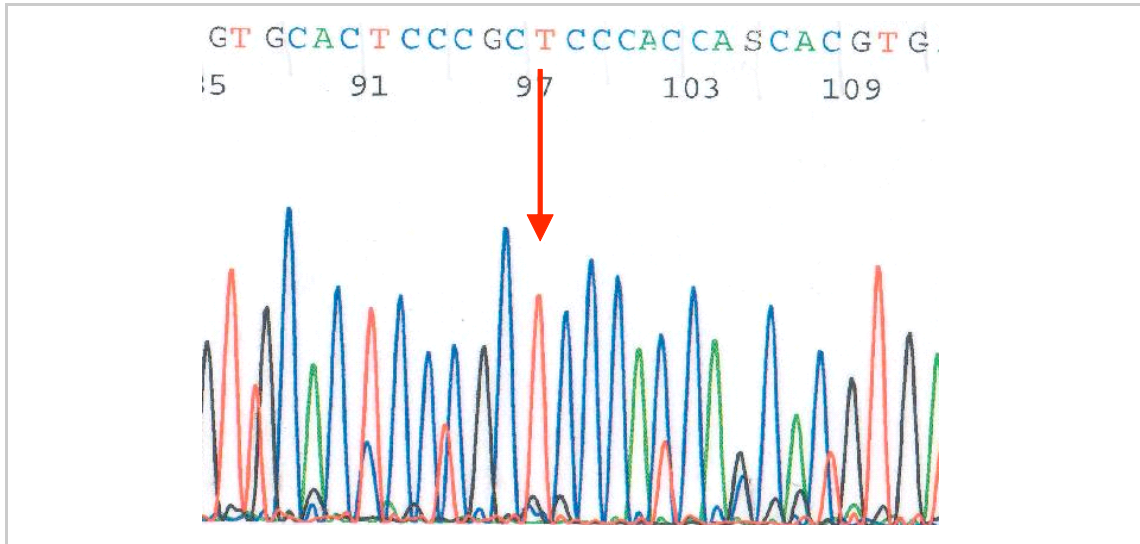


Abb. 11 **Ausschnitt einer Probe ohne Polymorphismus in Exon 9.**
(Farbcodierung: rot = Thymin, grün = Adenin, schwarz = Guanin, blau = Cytosin).

Exon 10

Im 10. codierenden Abschnitt des GGCX-Gens ist laut mehrfach genannter Datenbank kein bekannter Polymorphismus zu finden. Unsere Untersuchungen ergaben lediglich bei 3 Patienten in einem Abschnitt vor dem codierenden Bereich einen Austausch von Thymin zu Cytosin. Hierfür ergab sich eine Häufigkeit von 0,75%.

Exon 11

Die Datenbank gibt in diesem Exon einen Polymorphismus in Codon 498 an, mit Austausch der letzten Position des Triplets von Cytosin zu Thymin. Eine Aminosäureveränderung erfolgt nicht (rs41290033), es wird auch keine Häufigkeit angegeben. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen fand sich dieser Polymorphismus in zwei Patienten und führt somit zu einer Häufigkeit von 0,5%

Exon 12

Bei keinem der untersuchten Probanden fand sich ein Polymorphismus im Exon 12. Auch in der Datenbank wird in diesem Abschnitt keiner beschrieben.

Exon 13

In diesem Teil des GGCX-Gens gibt die Datenbank eine Polymorphismus ohne Häufigkeit an. Er befindet sich im Codon 581 und beschreibt den Austausch Guanin zu Adenin. Die Aminosäure Leucin wird nicht verändert (rs56165933). Bei keinem unserer 200 Probanden konnte diese Variabilität nachgewiesen werden.

Exon 14

In keinem der Patienten konnte im Exon 14 ein Polymorphismus nachgewiesen werden. Bekannt sind allerdings drei verschiedene, wovon zwei im codierenden Bereich liegen und einer in einem nachfolgenden Bereich.

Der erste findet sich im Codon 634. An der zweiten Stelle des Basentriplets wird Thymin zu Cytosin ausgetauscht, die Aminosäuresequenz ändert sich von Leucin zu Prolin (rs55778564). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte keine Häufigkeit gefunden werden. Im Codon 679 befindet sich der zweite bekannte Polymorphismus. Auch er hat keine Häufigkeitsangabe. Hier wird Guanin zu Adenin ausgetauscht, die Aminosäure Glutamat bleibt gleich (rs61003029).

Schließlich gibt es noch den Polymorphismus im nachfolgenden nicht codierenden Bereich, der Guanin zu Cytosin austauscht. Er wird mit ca. 11,7% Häufigkeit angegeben.

Exon 15

In diesem Abschnitt fand sich in der Literatur ein häufiger Polymorphismus. Der mit 37% angegebene fand sich in der vorliegenden Studie bei 81 der Probanden bzw. mit einer Allelhäufigkeit von 20,25%. Er äußert sich in einem Austausch der Base Cytosin durch Thymin in einem dem codierenden Bereich vorrausgehenden Abschnitt.

Auf dem Bildschirm der dHPLC ergab sich ein Muster, das sich vom Wildtyp deutlich unterschied (Abb. 12–Abb. 14).

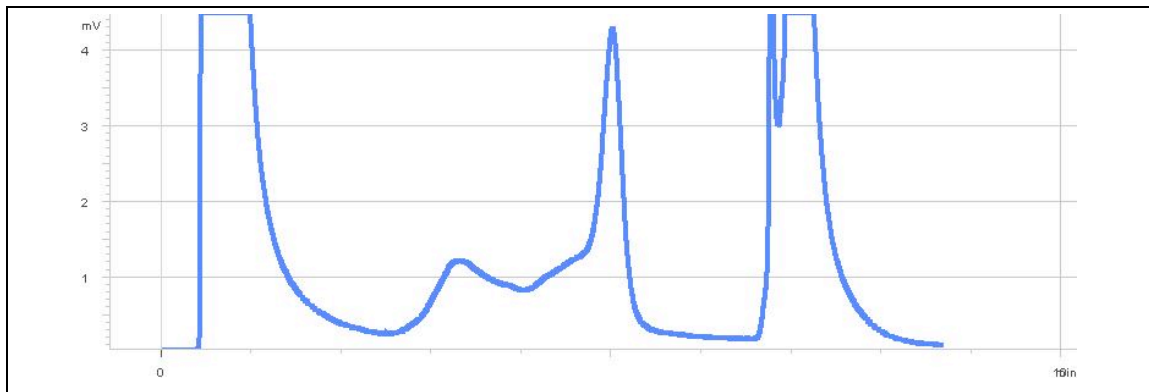


Abb. 12 **„Wildtyp“-Sequenz von Exon 15 auf dem Bildschirm der dHPLC.**
In der Mitte ist ein einzelner Peak zu erkennen.

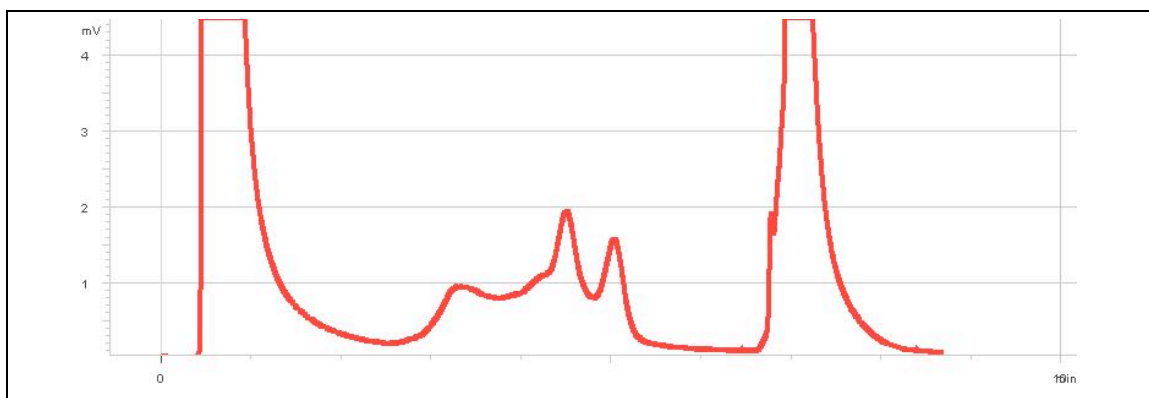


Abb. 13 **Probe mit heterozygotem Polymorphismus in Exon 15.**
Hier sind zwei kleine Peaks zu sehen, die diese Probe als eine mit heterozygotem Polymorphismus kennzeichnen.

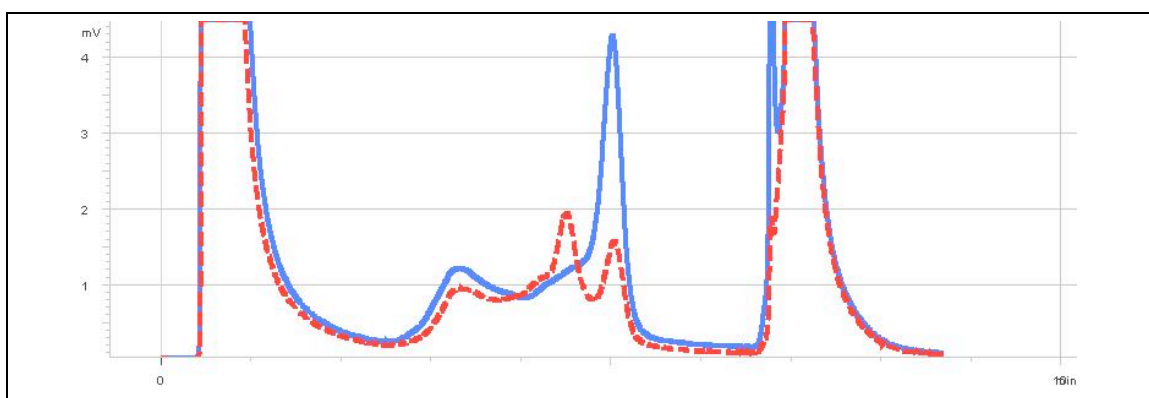


Abb. 14 **„Wildtyp“ (blau) und Probe mit Polymorphismus (rot).**
In dieser Abbildung sind beide Bilder in einem zusammengefügt, um den Unterschied zwischen „Wildtyp“ (einzelner blauer Peak) und heterozygotem Polymorphismus (zwei rote Peaks) besser darzustellen.

5 Diskussion

5.1 Entstehung und Charakterisierung von DNA-Veränderungen

Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, wurde in dieser Arbeit die DNA der Probanden auf Mutationen bzw. Polymorphismen im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen hin untersucht. Zu den Probanden gehörten vier Patienten mit einer ausgeprägten VKCFD sowie insgesamt vier Familienangehörige, und 200 gesunde Blutspender.

Polymorphismen und Mutationen sind Veränderungen in der DNA. Solche Veränderungen können entweder die Reaktion auf bestimmte Umwelteinflüsse (z.B. ionisierende Strahlung, chemische Substanzen) oder aber die Konsequenz aus Fehlern während des Replikationszyklus sein. Zwar wird durch die Korrekturlesefunktion der DNA-Polymerasen und die nachgeschalteten DNA-Reparatur-Mechanismen die Anzahl an fehlerhaften Replikationen reduziert, aber dennoch kann in Einzelfällen eine Genveränderung auftreten und auch an die Tochterzellen weitergegeben werden. Ist nur ein Nukleotid von der Mutation betroffen, spricht man von einer Punktmutation. Sind dagegen größere Sequenzabschnitte beteiligt, handelt es sich um eine sogenannte Chromosomenmutation.

Ein Genlocus für den mehrere Allele existieren sowie die Allelfrequenz des selteneren Allels in der Bevölkerung mehr als 1% beträgt – entsprechend einem Vorkommen von mindestens 2% Allelträgern bei autosomalen Genen – wurde ursprünglich als Polymorphismus bezeichnet. Mit dieser Grenze sollten häufigere neutrale Varianten von seltenen krankheitsverursachenden Mutationen abgegrenzt werden. Dem zugrunde liegt die Beobachtung, dass eine Prävalenz von mehr als 1% nicht alleine durch die Neumutationsrate für eine mit einem Selektionsnachteil versehene Genveränderung erklärbar wäre. In der medizinischen Genetik bezeichnet der Begriff Polymorphismus häufig allgemein eine variable Stelle im Genom, an der keine phänotypische Auswirkung durch das Vorliegen der einzelnen Allele beobachtet wurde. In internetbasierten Polymorphismen-

Datenbanken (z.B. dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) wird der Begriff zunehmend allgemeiner für DNA-Sequenzvarianten unabhängig von der Allelfrequenz und der phänotypischen Auswirkung verwendet, zumal dafür die Mehrzahl neu entdeckter Sequenzvarianten entsprechende funktionelle Daten nicht zur Verfügung stehen.

5.2 Einteilung von DNA-Veränderungen

Man spricht von Punktmutationen, wenn nur ein Nukleotid betroffen ist, von Chromosomenmutationen, wenn größere Sequenzabschnitte herausgeschnitten (Deletion), eingefügt (Insertion), verdoppelt (Duplikation), in der Orientierung umgedreht (Inversion) oder zwischen verschiedenen Chromosomen ausgetauscht (Translokation) sind. Erfolgt die Mutation innerhalb einer Transkriptionseinheit, bezeichnet man diese auch als Genmutation.

Nach funktionellen Gesichtspunkten unterscheidet man Variationen in der codierenden Region von solchen in regulatorischen Elementen (z.B. Promotor) bzw. in intronischen Bereichen, die über eine Beeinflussung der RNA-Prozessierung die Genexpression beeinflussen können.

5.3 Bedeutung und Selektion von DNA-Veränderungen

In dieser Arbeit wurde die genetische Variabilität des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens untersucht. Ziel dabei ist es, solche Veränderungen aufzudecken, die bestimmte physiologische Abläufe verändern und damit an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind.

In den Untersuchungen dieser Arbeit sind insbesondere die „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) als genetischer Marker analysiert worden. Diese Einzelbasensubstitutionen sind der mit Abstand häufigste Typ genetischer Variabilität beim Menschen. Die genaue Kenntnis der Anzahl von SNPs, ihrer Verteilung in einzelnen genomischen Bereichen und in unterschiedlichen Bevölkerungen wird als

der Schlüssel zum Verständnis von in der Bevölkerung häufigen Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes, Hypertonie, kardiovaskuläre und neuropsychiatrische Erkrankungen angesehen.

Neben der Entdeckung solcher Polymorphismen ist natürlich auch deren Häufigkeit in der Allgemeinbevölkerung von Interesse. Zunächst ist jede Genveränderung auf das Gründer-Individuum („founder“) beschränkt. Da Sequenzveränderungen die Expressionsstärke eines entsprechenden Gens reduzieren oder das Genprodukt aufgrund eines Aminosäureaustausches negativ beeinflussen können, kann es zu einem Selektionsnachteil kommen, d.h. die Fähigkeit des betroffenen Individuums zu überleben oder sich fortzupflanzen ist vermindert. Umgekehrt formuliert bedeutet das, dass sich eine Mutation im Laufe der Zeit innerhalb der Generationen erst dann verbreiten kann, wenn zum einen kein negativer Selektionsdruck greift oder zum anderen die Mutation nicht eventuell verloren geht dadurch, dass das Gründer-Individuum keine Nachkommen hat oder die Mutation nicht weitervererbt wird.

Hinzu kommt, dass eine Variabilität in codierenden Bereichen durch einen größeren Selektionsdruck gekennzeichnet ist. Auch die Lokalisation der Mutation innerhalb des Triplets wirkt sich auf die Selektion aus. Eine Veränderung der ersten beiden Basen führt meist auch zu einem Aminosäureaustausch, wodurch das resultierende Protein seine Funktion oft verliert und es folglich zu einem Selektionsnachteil kommt. Dahingegen bleibt der Basenaustausch an dritter Stelle des Codons aufgrund seiner degenerierten Position meist ohne Auswirkungen auf die Proteinsynthese und damit auf die Selektion.

5.4 γ -Carboxylase-Mutationsdiagnostik

Im Folgenden werden die gefundenen Genveränderungen bei den vier Patienten mit VKCFD einzeln bewertet. Dabei soll ihre Bedeutung für die Einschränkung der γ -Glutamyl-Carboxylase-Aktivität diskutiert werden.

In Tabelle 10 werden die VKCFD-Patienten, bei denen Mutationen entweder im GGX- oder im VKORC1-Gen nachgewiesen wurden, im Überblick dargestellt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Patienten sind gefettet dargestellt.

Tabelle 10: **Mutationen bei Patienten mit VKCFD.**

Mutation	Lokalisation	Typ	Genotyp	Herkunft	VKDF-Aktivität [%]	VKDF-Antigen [%]	Referenz
GGCX							
IVS1 del 14 bp	Intron 1	Deletion	Hom	Österreich	8–35		(Thomas und Stirling 2003)
IVS1 del 14 bp	Intron 1	Deletion	Hom	Österreich	9–59		(Thomas und Stirling 2003)
c.214+1G>T	Intron 2	Spleißstelle	Comp het	Mexiko	2–4		(Titapiwatanakun et al. 2009)
c.1609+3A>G	Intron 11	Spleißstelle					
c.215–1G>T	Intron 2	Spleißstelle	Comp het	Deutschland (Köln)	21–42		(Rost et al. 2004b)
Arg485Pro*	Exon 11	Missense					
Arg83Trp*	Exon 3	Missense	Comp het	USA	20–117		(Goldsmith, Jr. et al. 1982, Li et al. 2009c)
Gln374X*	Exon 8	Nonsense					
Arg83Trp*	Exon 3	Missense	Comp het	USA	18–88		(Goldsmith, Jr. et al. 1982, Li et al. 2009c)
Gln374X*	Exon 8	Nonsense					
Trp157Arg	Exon 4	Missense	Comp het	Tunesien	5–9	60–73	(Darghouth et al. 2006)
Thr591Lys Asp31Asn	Exon 13	Missense					
Arg204Cys	Exon 5	Missense	Hom	Portugal	1–65		(Vicente et al. 1984)
Val255Met*	Exon 7	Missense	Comp het	USA	33–108		(Li et al. 2009a)
Ser300Phe*	Exon 8	Missense					
Val255Met*	Exon 7	Missense	Comp het	USA	18–56		(Li et al. 2009a)
Ser300Phe*	Exon 8	Missense					

Mutation	Lokalisation	Typ	Genotyp	Herkunft	VKDF-Aktivität [%]	VKDF-Antigen [%]	Referenz
Phe299Ser	Exon 8	Missense	Compound	Frankreich	vermindert		(Le Corvaisier-Pieto et al. 1996, Vanakker et al. 2007)
Gly558Arg	Exon 12	Missense					
Trp315X	Exon 8	Nonsense	Compound	Deutschland	29–53		
Arg485Pro*	Exon 11	Missense		(Berlin)			
Gln328Lys	Exon 8	Missense	Hom	Indien	vermindert		
Gln374X*	Exon 8	Nonsense	Compound	USA	20–74		(Vanakker et al. 2007)
Gly537Tyr*	Exon 12	Missense					
Gln374X*	Exon 8	Nonsense	Compound	USA	18–88		(Vanakker et al. 2007)
Gly537Tyr*	Exon 12	Missense					
Leu394Arg	Exon 9	Missense	Hom	Arabien	2–8	10–57	(Brenner et al. 1990, Brenner et al. 1998, Mutucumarana et al. 2000)
His 404Pro	Exon 9	Missense	Compound	Deutschland	13–54		(Rost et al. 2006)
Arg485Pro*	Exon 11	Missense		(Düren)			
Arg476His*	Exon 10	Missense	Het	Frankreich	20–103		(Vanakker et al. 2007)
Arg476His*	Exon 10	Missense	Het	Italien	17–90		(Vanakker et al. 2007)
Trp493Ser	Exon 11	Missense	Hom	Belgien	15–70		(Vanakker et al. 2007)
Trp501Ser*	Exon 11	Missense	Hom	Libanon	1–6		(Soute et al. 2004, Spronk et al. 2000)
Trp501Ser*	Exon 11	Missense	Hom	Libanon	9–35		(Mousallem et al. 2001)
VKORC1							
Arg98Trp*	Exon 3	Missense	Hom	Libanon	20–60		(Oldenburg et al. 2000, Rost et al. 2004a)
Arg98Trp*	Exon 3	Missense	Hom	Deutschland	20–60		(Oldenburg et al. 2000, Rost et al. 2004a)
Arg98Trp*	Exon 3	Missense	Hom	Italien	8–26		(Marchetti et al. 2008)

Mutation	Lokalisation	Typ	Genotyp	Herkunft	VKDF-Aktivität [%]	VKDF-Antigen [%]	Referenz
----------	--------------	-----	---------	----------	--------------------	------------------	----------

* Mutationen, die in mehr als einer Person nachgewiesen werden konnten.

VKDF steht für „Vitamin K dependent Factors“ z.B. Faktor II, VII, IX, X, Protein C bzw. S. Die in dieser Arbeit beschriebenen Patienten sind gefettet dargestellt.

Abb. 15 zeigt die Lokalisation der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Missense-Mutation in einem Modell des γ -Carboxylase-Proteins nach Tie et. al 2000.

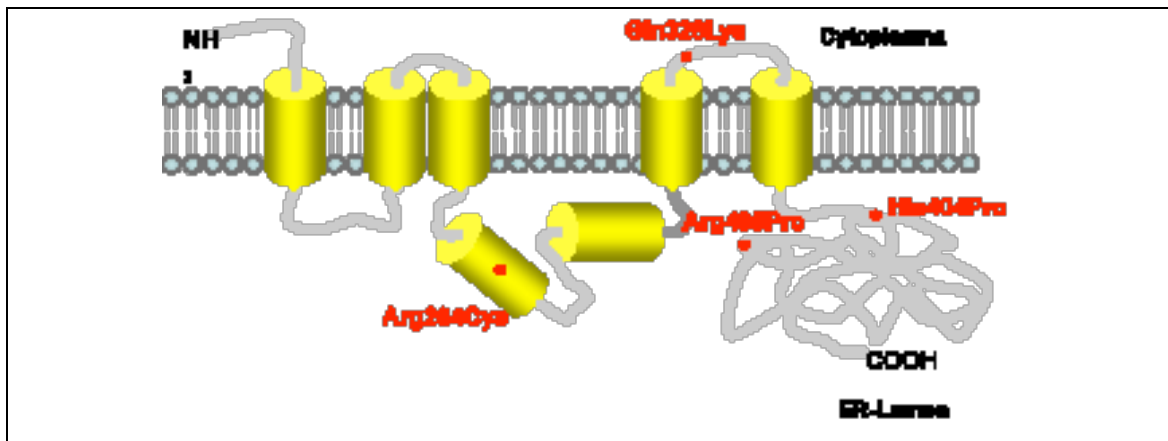


Abb. 15 Modell des γ -Carboxylase-Proteins (Tie et al. 2000). Die Transmembrandomänen sind in Form von Zylindern dargestellt, wobei die beiden außerhalb der Membran liegenden Zylinder stark hydrophobe Regionen symbolisieren.

g.5985C>T, c.610C>T, p.Arg204Cys (erstmal nachgewiesene Mutation)

Diese Missense-Mutation (Abb. 16) wurde zwischenzeitlich auch in einem Abstract von Watzka et al. beschrieben (Watzka et al. 2008). Dort wurde bei zwei Patienten, 11 und 14 Jahre alt, Geschwister mit vermutlich konsanguinen Eltern, eine signifikant verminderte Aktivität von Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren festgestellt. Bei beiden wurde die Veränderung homozygot nachgewiesen, was die Vermutung bestätigt, dass sie kausal für den Mangel sind.

Die Aminosäuresequenz in der Nähe von Arg204 ist in zahlreichen Spezies hochkonserviert, sodass diese Region offenbar eine große Relevanz für das GGCX-Gen aufweist.

Auch bei den 200 phänotypisch unauffälligen Blutspendern zeigte sich keine derartige Mutation.

g.8770C>A, c.982C>A, p.Gln328Lys (erstmal nachgewiesene Mutation)

Diese Missense-Mutation (Abb. 17), die zu einer Veränderung der Aminosäure Glutamin zu Lysin führt, wurde bei einem Patient aus Indien in der codierenden Region von Exon 8 homozygot gefunden. Phänotypisch zeigte sich bei dem Patienten eine schwerwiegende Form der VKCFD.

Da die Aminosäure Glycin an dieser Stelle in einer zytoplasmatischen Schleife liegt, ist ein direkter Effekt auf funktionell bedeutende Regionen wie die Propeptidbindungsstelle oder die Vitamin-K- oder die Glutamat-Bindungsstelle eher unwahrscheinlich. Dennoch ist diese Aminosäure durch zahlreiche Spezies hindurch hochkonserviert und dürfte eine wichtige Rolle für die Struktur des katalytisch aktiven Enzyms spielen. Auch diese Mutation war bei den gesunden Blutspendern nicht aufzufinden, was den Charakter eines Gendefekts bestätigt.

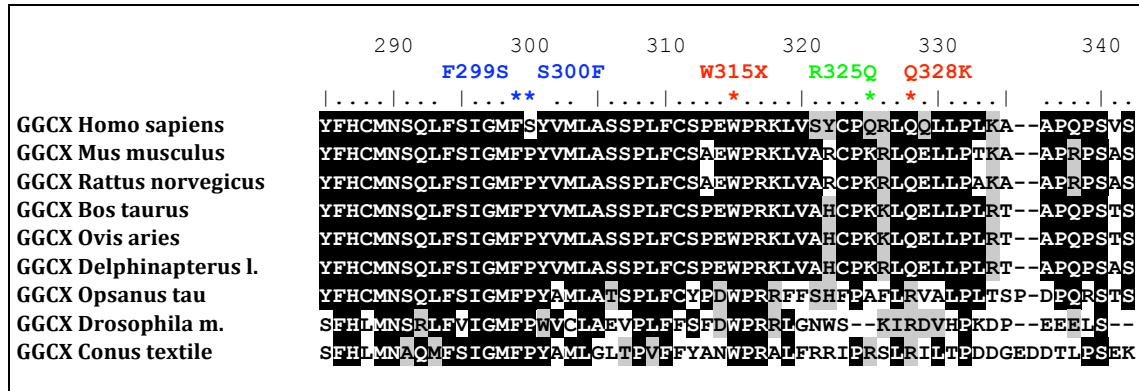


Abb. 17 Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäuren Trp315 und Gln328 (rot) flankierenden Region. F299S und S300F (blau) stellen bekannte Mutationen p.Phe299Ser und p.Ser300Phe dar. Die Nummerierung bezieht sich auf Aminosäureposition im translatierten Protein („accession“-Nummern: siehe Tabelle 6).

g.9160A>C, c.1211A>C, p. His404Pro

Diese Mutation (Abb. 18) fand sich bei der Patientin Nr. 1 in der codierenden Region des Exons 9. Die Position 404 liegt inmitten einer Region (384–415), für die eine identische Sequenz in den Spezies Mensch, Hausmaus, Wanderratte, Hausrind,

Hausschaf, Belugawal und Krötenfisch gefunden wurde. Dass sie bei keinem der Probanden des Blutspender-Kollektivs nachgewiesen werden konnte, spricht gegen den Charakter eines funktionell stummen Polymorphismus. Mutucumarana et al. konnten für den Bereich von 393–404, für den eine zusätzliche Sequenzidentität mit der Sequenz bei den Spezies Fruchtfliege und Textil-Kugelschnecke vorliegt, experimentell zeigen, dass diese Region essenziell für die Glutamatbindung ist (Mutucumarana et al. 2003). Zudem zeigt die natürlich vorkommende Mutation p.Leu394Arg in Expressionsstudien eine drastische Beeinträchtigung der Glutamatbindung (Mutucumarana et al. 2000). Für die benachbarte Mutation p.His404Pro ist aufgrund der Lokalisation ein ähnlicher Effekt anzunehmen.

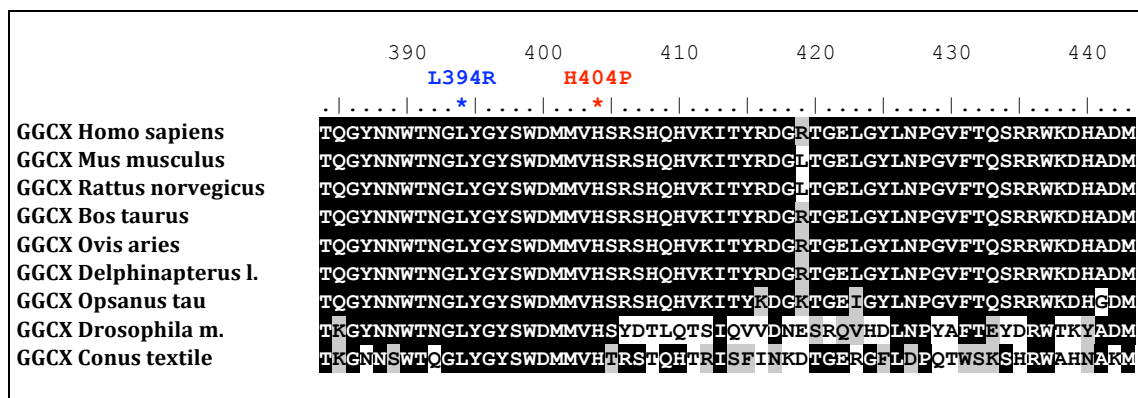


Abb. 18 Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäure His404 (rot) flankierenden Region. L394R (blau) stellt eine bekannte Mutation p.Leu394Arg dar. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäureposition im translatierten Protein („accession“-Nummern: siehe Tabelle 6).

g.10208G>C, c.1454G>C, p.Arg485Pro

Diese Mutation (Abb. 19), die sich in Exon 11 befindet, führt wie die zuvor beschriebene zu einem Austausch gegen die Aminosäure Prolin. Ein Austausch gegen Prolin führt in den meisten Fällen zu schwerwiegenden Störungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des resultierenden Proteins. Zudem zeigt ein Sequenzvergleich mit der γ -Carboxylase verschiedener anderer Spezies, dass auch die Aminosäure Arg485 hochgradig konserviert ist und sich zudem in einem hochkonservierten Bereich des Enzyms befinden (Abb. 21). Auch die Position 485 scheint funktionell oder strukturell ausgesprochen bedeutsam zu sein.

Bei den Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden fand sich die Mutation in Patientin 1, einer Patientin aus Düren, sowie in Patientin 2 aus Berlin. Beide hatten diese Mutation zusammen mit einer weiteren, also „compound heterozygot“.

Patientin 1, die durch eine chronische Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Parameter auffiel und die als andere Mutation die Mutation p.His404Pro aufzuweisen hatte, wies lediglich eine Hämatomneigung ohne adäquates Trauma klinisch auf.

Diese Mutation wurde bereits in einem zweiten Patienten, beschrieben von Rost im Jahr 2004, auch in einem der betroffenen Allele gefunden (Rost et al. 2004b).

Da beide Patienten aus dem gleichen Raum stammen, wurde die Hypothese eines „Founder“-Effekts gestellt, die sich nach Haplotypanalyse bestätigen ließ (Rost et al. 2006). Beide Patienten hatten von ihren Müttern die Mutation p.Arg485Pro vererbt bekommen und wiesen an acht benachbarten polymorphen Loci das gleiche Allel auf.

Bei Patientin 2 wurde die Mutation p.Arg485Pro in „compound heterozygoter“ Ausprägung zusammen mit einer Stopp-Mutation (p.Trp315X) nachgewiesen. Sollte sich der bei dieser Patientin vorliegende Haplotyp ebenfalls auf die oben erwähnte gemeinsame „Founder“-Mutation zurückführen lassen, böte sich dieser Mechanismus als eine Erklärung für das gehäufte Vorkommen von VKCFD Typ 1 in Deutschland an.

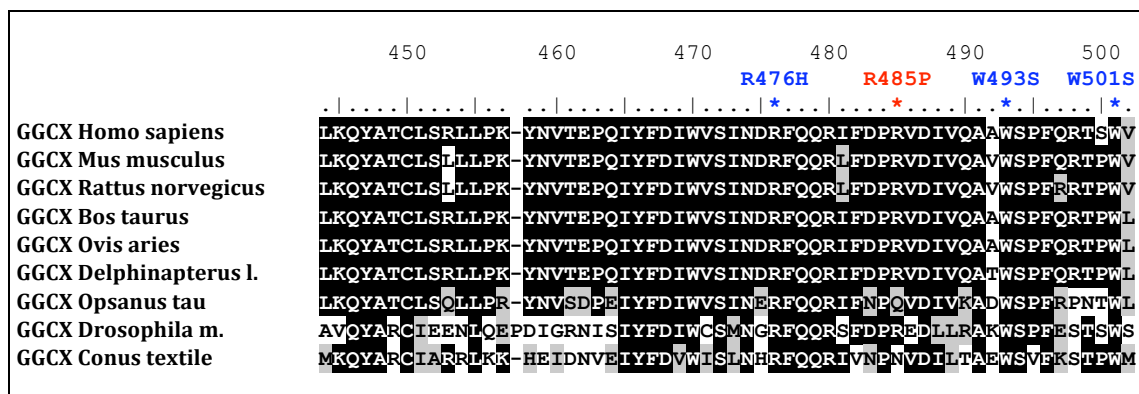


Abb. 19 **Sequenzvergleich verschiedener orthologer Proteine in der die Aminosäure Arg485 (rot) flankierenden Region.**
R476H, W493S sowie W501S (blau) stellen bekannte Mutationen p.Arg476His, p.Trp493Ser und p.Trp501Ser dar (delphinapterus l. steht für delphinapterus leukas; drosophila m. steht für drosophila melanogaster). Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäureposition im translatierten Protein („accession“-Nummern: siehe Tabelle 6).

5.5 Patienten mit Mutationen im γ-Carboxylase-Gen

Patient 1

Die Patientin Nr. 1 stammt aus Düren und ist eine 38-jährige Frau. Erstmals fiel 1986 im Zuge einer präoperativen Routine-Diagnostik auf, dass eine ausgeprägte Verminderung des Quickwertes bestand. Anamnestisch berichtete die Patientin, dass bei verschiedenen Verletzungen, wie z.B. einer Kopfplatzwunde im Kindesalter, keine besondere Blutungsneigung aufgefallen sei. Bei Operationen, wie einer Nävusentfernung am linken Bein und einer Atheromentfernung am linken Ohr traten keine pathologischen Blutungen auf. Die Extraktion zweier Zähne im Alter von 12 Jahren hatte ebenfalls nicht zu Nachblutungen geführt. Die monatliche Regelblutung halte unter derzeitiger oraler Kontrazeption etwa zwei bis drei Tage an, vor Einnahme der „Pille“ als „Teenager“ habe jedoch eine ausgeprägte Menorrhagie bestanden. Bei Alltagstätigkeiten, wie z.B. beim Zähneputzen, würden gelegentlich Blutungen auftreten. Allgemein bestünde eine Hämatomneigung auch ohne adäquates Trauma.

Die Patientin wies eine „compound Heterozygotie“ vor, mit einer Missense-Mutation in Exon 9 (p.His404Pro) und einer Missense-Mutation in Exon 11 (p.Arg485Pro). Die Mutter der Patientin, die auch untersucht werden konnte, wies klinisch keine Auffälligkeiten auf, die Gerinnungsdiagnostik war im Normbereich. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Mutation in Exon 11 heterozygot von ihr vererbt worden ist, sodass die andere Mutation in Exon 9 vom verstorbenen Vater stammen musste. Wie bereits bei der Diskussion der eigentlichen Mutation per se

erwähnt, stellt dies erst die zweite beschriebene Konstellation dieser Art dar, und wurde zuerst von Rost et al. beschrieben (Rost et al. 2004b). Da dieser Patient aus der gleichen Gegend kam, wurde die „Founder-Effekt“ Hypothese nach Haplotyp-Untersuchung bestätigt (Abb. 20). Da grundsätzlich die VKCFD Typ 1 selten ist, würde sich dieser Hinweis, gerade wenn der Patient aus Deutschland stammt, gut als Erklärungsansatz bieten.

Ein Hinweis auf dermatologische Effloreszenzen im Sinne einer PXE-like Disorder ließ sich hier nicht finden.

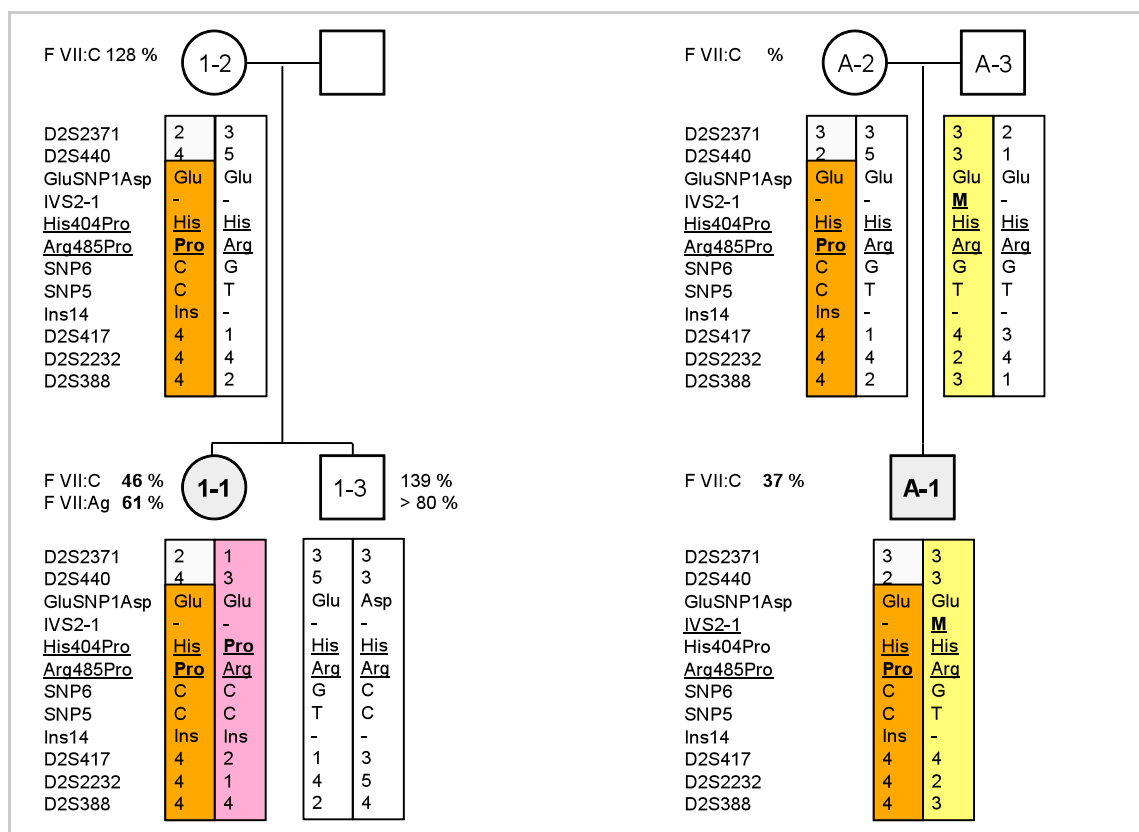


Abb. 20 **Haplotypeanalyse in Familie1 und in einer zweiten Familie (A).**
 In der zweiten Familie A war die Mutation p.Arg485Pro erstmals beschrieben worden (Rost et al. 2004b). Orange dargestellt ist der gemeinsame Haplotyp der Träger der Mutation p.Arg485Pro. Somit lässt sich hier ein Founder-Effekt nachweisen.

Patient 2

Patientin Nr. 2 ist eine junge Frau aus Berlin, die Vitamin-K-substitutionspflichtig ist, um Blutungskomplikationen zu vermeiden (Tabelle 11). Klinisch bestand außerdem der Phänotyp einer Chondrodysplasia punctata vom Typ Conradi-Hünerman, eine hämodynamisch nicht relevante Pulmonalarterienstenose sowie eine mittelgradige Innenohrschwerhörigkeit, die ein Tragen eines Hörgerätes erfordert. Nach Analyse ihrer Proben ergab sich eine heterozygote Stopp-Mutation in Exon 8 (c.944G>A, p.Trp315X) sowie eine heterozygote Missense-Mutation in Exon 11 (c.1454G>C, p.Arg485Pro). Die Untersuchung der Eltern ergab, dass von der Mutter der Patientin die heterozygote Stopp-Mutation in Exon 8 weitergegeben wurde, während beim Vater die Mutation in Exon 11 nachgewiesen werden konnte. Bei der Patientin bestand somit eine „compound heterozygote“ Konstellation. Beide Mutationen sind als Ursache für den γ -Carboxylase-Mangel anzusehen. Hinzu kommt bei dieser Patientin zusätzlich der Aspekt der Chondrodysplasia punctata. Die Chondrodysplasia punctata, Typ Conradi-Hünerman, ist eine X-chromosomal vererbte Krankheit mit punktförmigen Kalzifizierungen von Knorpelgewebe an Gelenken, Larynx und Trachea. Weitere Symptome sind disproportionierter Minderwuchs mit verkürzten Extremitäten, Verhornungsstörung der Haut, grauer Star und Dysmorphien. Normalerweise ist sie bedingt durch Mutationen im Emopamil-Bindungs-Protein (EBP), einem Enzym, das eine Rolle als Isomerase am Ende der Cholesterin-Biosynthese hat (Ausavarat et al. 2008, Has et al. 2000, Matsuo 1996, Steijlen et al. 2007, Traupe und Has 2000, Williams und Elias 1987). Bei dieser Patientin könnte der Phänotyp der Chondrodysplasia punctata mit den oben genannten Mutationen im GGCX-Gen im Zusammenhang stehen, und ließe sich eventuell durch eine pränatal starke Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Proteine erklären. Eine Mutationsdiagnostik im EBP-Gen ist bis jetzt noch nicht durchgeführt worden. Die Missense-Mutation in Exon 11, die sowohl von Rost 2004, als auch bei Patientin 1 gefunden worden ist, ließ sich bei diesen Patienten auf einen „Founder-Effekt“ zurückführen, welches sich bei dieser Patientin bzw. ihrem Vater, der die heterozygote Mutation weitergegeben hat, nicht nachweisen ließ. Auch fand sich kein Hinweis auf eine PXE-like Disorder.

Tabelle 11 **Gerinnungswerte Patientin 2** vor und nach Vitamin-K-Gabe.

	vor Vitamin-K-Gabe	nach Vitamin-K-Gabe
Vitamin K1	7,36 µg/l	1940 µg/l
Faktor II	30%	34%
Faktor VII	37%	53%
Faktor IX	53%	63%
Faktor X	29%	39%
INR	1,57	1,36
Quick	47%	56%

Patient 3

Diese Patientin kommt aus Portugal und wurde schon 1982 in der dortigen Universitätsklinik untersucht, da sie durch mehrere hämorrhagische Episoden mit multiplen Verletzungen und ausgedehnten Hämatomen seit der Geburt auffällig wurde. Im Alter von 9 Monaten litt sie unter einer 8-tägigen Blutung nach Einriss des Zungenbändchens und mit 12 Monaten hatte sie einen großen Bluterguss an der Kopfhaut infolge eines Unfalls. Nach routinemäßiger Gerinnungstestung fiel eine verlängerte Prothrombinzeit und aPTT auf, sowie wegweisend eine Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren. In der Familienanamnese gab es bisher keine hämorrhagischen Diathesen. Die Patientin zeigte einen normalen Ernährungszustand und keinen Hinweis auf eine Leberfunktionsstörung (Vicente et al. 1984).

Nach Gabe von hochdosiertem Vitamin K erfolgte keine Besserung der Symptomatik. Erst die Gabe von 120 ml FFP zusammen mit Vitamin K führte zu einer signifikanten Verbesserung.

Wie bereits erwähnt stellte sich bei der Patientin nach Sequenzierung des γ -Carboxylase-Gens eine homozygote Missense-Mutation in Exon 5 (p.Arg204Cys) heraus, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen wurde. Zwischenzeitlich wurde diese Mutation bei zwei weiteren Patienten in einem Abstract von Watzka erwähnt (Watzka et al. 2008). Die Lokalisation von Arg204 als Teil einer Propeptid-Bindungsstelle, die verantwortlich für die Affinität der γ -Carboxylase zu

Vitamin K ist, erklärt das Ansprechen auf die Therapie. Die Patientin zeigte keine Besserung nach Gabe von Vitamin K (Abb. 21). Durch eine vermutlich sehr starke verminderte Affinität zu Vitamin K, aufgrund des Aminosäureaustauschs von Arginin zu Cystein in Exon 5, helfen somit auch keine erhöhten Dosen des Substrates, um eine normale Syntheseleistung des Enzyms herzustellen.

Erst die zusätzliche Gabe von FFP mit Vitamin K, also die Gabe von Gerinnungsfaktoren zusammen mit Vitamin K (Abb. 22), ermöglicht eine Besserung der Gerinnungswerte. Auch hier gab es keinen Anhalt für eine PXE-like Disorder.

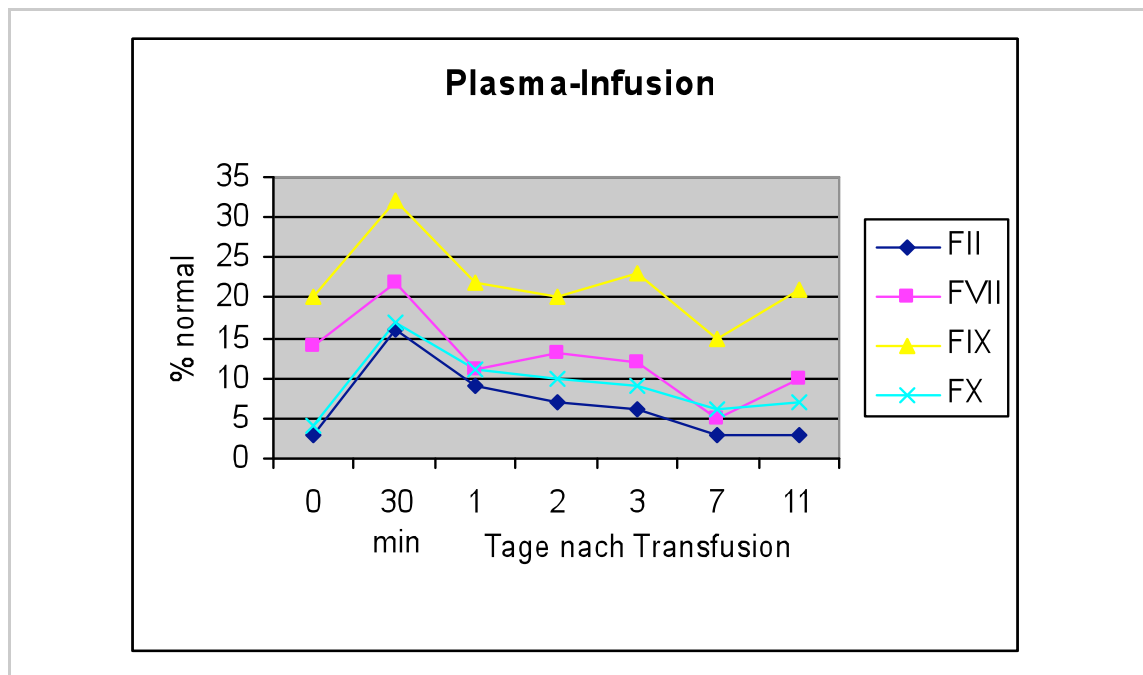


Abb. 21 **Aktivitäten der Vitamin-K-abhängigen Faktoren nach FFP-Gabe.**

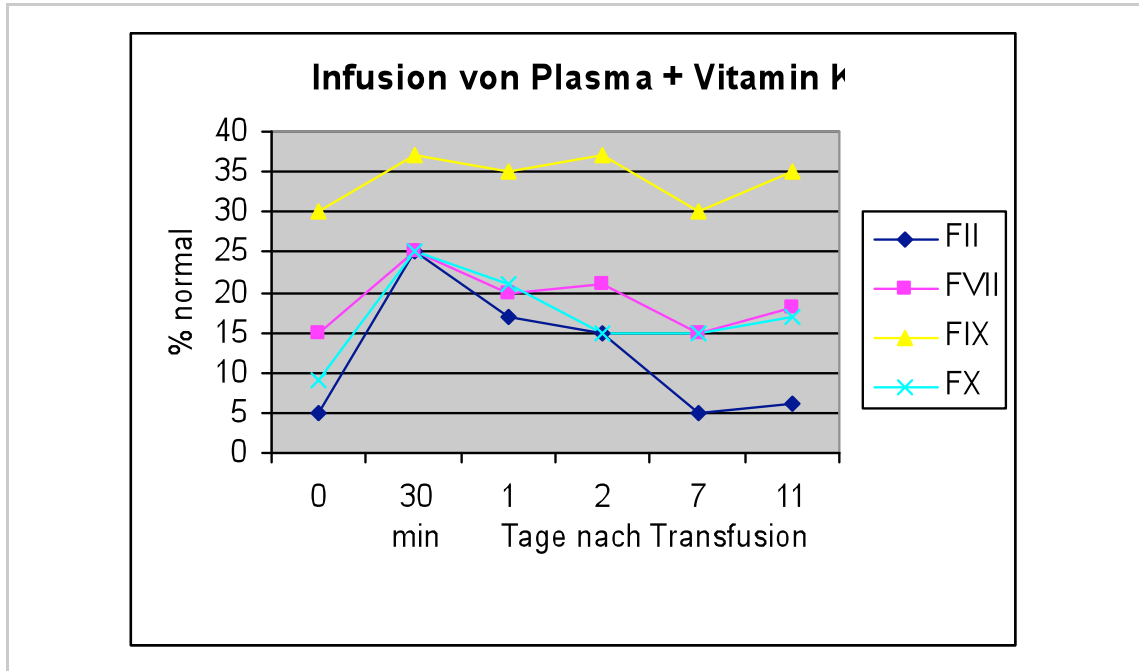


Abb. 22 **Aktivitäten der Vitamin-K-abhängigen Faktoren nach FFP-Gabe + Vitamin K.**
Deutlich zu sehen ist der Unterschied in der Restaktivität 11 Tage nach Transfusion.

Patient 4

Der vierte Patient stammt aus Indien und zeigte phänotypisch eine schwerwiegende Form der VKCFD. Bei ihm wurde eine homozygote Missense-Mutation in der codierenden Region in Exon 8 gefunden. Die bei ihm mutierte Region liegt in einer zytoplasmatischen Schleife und spielt eine Rolle im Erhalt der Struktur als katalytisch aktives Enzym. In einer Studie von Li et al. (Li et al. 2009a), die schon in der Einleitung zitiert wurde, wurde ebenfalls bei einem Probanden eine Mutation in Exon 8 gefunden, ebenso in der Studie von Vanakker et al. (Vanakker et al. 2007), beide mit sowohl PXE-ähnlichen Effloreszenzen als auch zusätzlich der Verminderung der Vitamin-K-abhängigen Faktoren. Bei diesem Patienten fand sich allerdings kein Hinweis auf dermatologische Veränderung die im Zusammenhang mit der GGCX-Mutation stehen könnten.

5.6 Polymorphismen im γ -Carboxylase-Gen in der Allgemeinbevölkerung

Im nachfolgenden Abschnitt sollen die im Kollektiv von 200 Blutspendern nachgewiesenen Genveränderungen diskutiert werden. Im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen sind Polymorphismen mit Angabe einer Häufigkeit in den Exonen 2, 8, 9, 14 und 15 bekannt, sowie Polymorphismen ohne angegebene Häufigkeiten in den Exonen 2, 3, 7, 8, 11, 13, 14.

Tabelle 12 zeigt die in der internetbasierten Datenbank dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?locusId=2677) angegebenen Lokalisationen (entsprechend g.DNA U65896) und Häufigkeiten (nach HapMap-CEU). Die von uns ermittelten Polymorphismen mit Häufigkeiten sind eingefügt:

Tabelle 12: **Publizierte und ermittelte Polymorphismen** mit Lokalisation und Häufigkeit.

Exon/ Intron	Genort	Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Allelhäufigkeit (nach HapMap-CEU)	Allelhäufigkeit (eigene Daten)
Intron 1	g.807	c.43+33T>A			T 96,5% A 3,5%
Exon 2	g.1303	c.159C>A	p.(=)		
Exon 2	g.1333	c.189C>T	p.(=)		
Exon 3	g.3223	c.339C>T	p.(=)		C 98,25% T 1,75%
Exon 7	g.7980	c.837C>A	p.(=)		
Intron 8	g.8663	c.890-15T>C			
Exon 8	g.8762	c.974G>A	p.Arg325Gln	G 57,5% A 42,5%	G 64,75% A 35,25%
Exon 9	g.9167	c.1218C>T	p.(=)	C 61,7% T 38,3%	C 73,25% T 26,75%
Exon 9	g.9191	c.1242C>T	p.(=)	C 88,1% T 11,9%	C 91% T 9%
Intron 10	g.9570	c.1288-38T>C			T 99,25% C 0,75%
Exon 11	g.10248	c.1494C>T	p.(=)		C 99,5% T 0,5%
Exon 13	g.11105	c.1743G>A	p.(=)		

Exon/ Intron	Genort	Basen-austausch	Aminosäure-austausch	Allelhäufigkeit (nach HapMap-CEU)	Allelhäufigkeit (eigene Daten)
Exon 14	g.11437	c.1901T>C	p.Leu634Pro		
Exon 14	g.11573	c.2037G>A	p.(=)		
Intron 14	g.11665	c.2084+45G>C		G 88,3% C 11,7%	
Intron 15	g.12028	c.2085-21C>T		C 61,7% T 38,3%	C 79,5% T 20,5%

5.6.1 Polymorphismen in nicht codierenden Abschnitten

Genveränderungen, die außerhalb eines codierenden Bereiches gefunden werden, haben in der Regel keine Konsequenz für mögliche phänotypische Erscheinungen. Sie ziehen keinen Aminosäureaustausch nach sich und sind daher für die Struktur und Funktion eines Proteins nicht relevant. Aus diesem Grund sind die nachfolgend aufgeführten gefundenen Variationen als Polymorphismen und nicht als Mutationen zu charakterisieren.

- Intron 1: g.807T>A, c.43+33T>A
- Intron 10: g.9570T>C, c.1288-38T>C
- Intron 15: g.12028C>T, c.2085-21C>T

5.6.2 Polymorphismen in codierenden Abschnitten ohne Aminosäureaustausch

Als nächstes können solche Genvariationen als Polymorphismen und nicht als Mutationen beschrieben werden, die zwar in einem codierenden Abschnitt liegen, aber nicht zu einem AS-Austausch führen. Da auch solche Veränderungen für die Struktur und Funktion des Proteins keine Bedeutung haben, können sie als nicht krank machende Veränderung gesehen werden.

Bei den 200 gesunden Blutspendern fanden sich folgende Veränderungen:

- Exon 3: g.3233C>T, c.339C>T, p.(=)
Dieser Polymorphismus zieht eine Veränderung der Basenabfolge nach sich. Da aber sowohl GAC sowie GAT für die Asparaginsäure codieren, kommt es zu keiner Konsequenz für die Aminosäuresequenz.

- Exon 9: g.9167C>T, c.1218C>T, p.(=)
Auch dieser Polymorphismus zieht nur eine Veränderung der Basenabfolge nach sich. CGC sowie CGT codieren beide für Arginin.
- Exon 9: g.9191C>T, c.1242C>T, p.(=)
Hier erfolgt ebenfalls nur eine Veränderung der Basenabfolge ohne eine Veränderung für die daraus entstehende Aminosäuresequenz. ACC und ACT codieren beide für Threonin.
- Exon 11: g.10248C>T, c.1494C>T, p.(=)
Der letzte in den 200 Probanden gefundene Polymorphismus innerhalb der codierenden Abschnitte verändert auch nur die Basenabfolge und nicht die Aminosäuresequenz (Arginin bleibt gleich) und hat somit auch keine Folge.

5.6.3 Genvarianten mit Auswirkungen auf die AS-Sequenz

Bei unseren Untersuchungen fand sich bei den gesunden Probanden eine Variante mit Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. In der Datenbank ist diese ebenso aufgeführt.

- Exon 8: g.8762G>A, c.>G, c.974G>A, p.Arg325Gln
Dieser Polymorphismus wird mit einer Häufigkeit von 42,5% angegeben. Der Austausch c.974G>A in Exon 8 zieht einen AS-Austausch p.Arg325Gln nach sich. Dies könnte zu einer Veränderung in der Proteinstruktur führen. Aufgrund des sehr breiten Vorkommens in der gesunden Allgemeinbevölkerung (42,5%) ist allerdings eher auszuschließen, dass diese Veränderung krank machende Eigenschaften besitzt. Auffällig ist jedoch, dass bei einem unserer VKCFD-Patienten, Patient Nr. 3, eine Missense-Mutation in unmittelbarer Umgebung gefunden wurde. Dort kam es zu einem Austausch von Glutamin zu Lysin (g.8770C>A, c.982C>A, p.Gln328Lys). Dieser Patient litt unter einer schwerwiegenden Form der VKCFD, da die Mutation jedoch homozygot bei ihm nachgewiesen wurde, lässt sich vermuten, dass eine heterozygote Veränderung, auch in der unmittelbaren Umgebung keine phänotypischen Konsequenzen hat.

5.7 Vergleich der dHPLC und der Sequenzierung als Mutationsanalysemethoden

In dieser Arbeit wurden Polymorphismen bzw. Mutationen im GGCX-Gen untersucht. Zur Identifizierung der Genveränderungen wurde die dHPLC und ein Sequenziersystem verwendet. Nach Abschluss der Untersuchungen ist es möglich abzuwägen, welches Verfahren das geeignetere für die Mutationssuche ist. Bei einem Vergleich der beiden Methoden sollen vor allem die Kriterien Arbeitsaufwand, Kosten und Sensitivität berücksichtigt werden.

Zunächst lässt sich sagen, dass das Wave-System einen sehr viel geringeren Arbeitsaufwand erfordert als die Kompletsequenzierung. Mittels der dHPLC kann ein hohes Probenaufkommen in kurzer Zeit mit vergleichsweise geringem Aufwand bewältigt werden. Auch die Auswertung der Proben erfolgt durch die weitgehend automatisierte Bearbeitung der Proben und die EDV-gestützte Befunddokumentation in wesentlich kürzerer Zeit als nach der Sequenzierung. Hier muss nämlich die komplette Sequenz gelesen und geprüft werden, da die alleinige softwaregesteuerte Auswertung der digital vorliegenden Daten noch zu unsicher ist.

Das Auffinden von Mutationen durch die dHPLC wird allerdings dann ineffektiv, wenn es sich um Genabschnitte mit vielen oder sehr häufigen Polymorphismen handelt.

Gibt es mehr als einen relativ häufigen Polymorphismus in einem Abschnitt, kann durch die dHPLC alleine nicht aufgezeigt werden um welchen es sich handelt. Lediglich das Vorhandensein einer Veränderung kann detektiert werden. Auch bei dem Vorhandensein von nur einem aber sehr häufigen Polymorphismus ist das Wave-System alleine nicht ausreichend. Das Peak-Muster ist für eine Probe mit einem homozygoten Polymorphismus nahezu identisch mit dem Peak-Muster einer Probe ohne Mutation. In solchen Fällen ist die Sensitivität bei der Kompletsequenzierung entsprechend höher.

Letztlich spielen auch die Kosten einer Mutationsanalysemethode eine wichtige Rolle, vor allem wenn es sich um ein hohes Probenaufkommen handelt. Für die komplette Untersuchung eines Gens belaufen sich die reinen Materialkosten bei

der dHPLC-Methode auf ca. 30 Euro gegenüber ca. 300 Euro bei der Komplettssequenzierung. Die Systempreise sind in etwa vergleichbar.

Vor den Gesichtspunkten der Qualität der Ergebnisse und dem dafür aufzubringenden zeitlichen und finanziellen Aufwand empfiehlt es sich, beide Methoden zu kombinieren. Für große Genabschnitte mit nur wenigen und/oder seltenen bekannten Polymorphismen ist die dHPLC die Methode der ersten Wahl aufgrund der geringeren Untersuchungskosten. Für Bereiche mit verschiedenen und/oder häufigen Genveränderungen lohnt sich der höhere Aufwand der Sequenzierung für ein gesichertes Untersuchungsergebnis.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beide Systeme unterschiedliche Vorteile aufweisen. Die Kombination beider Untersuchungsmethoden stellte sich als rationellste Vorgehensweise heraus.

6 Zusammenfassung

Die γ -Glutamyl-Carboxylase spielt eine Schlüsselrolle im menschlichen Organismus, da sie für die posttranslationale Modifikation sämtlicher Vitamin-K-abhängiger Proteine verantwortlich ist. Ein hereditärer Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Faktoren aufgrund eines Defekts in der γ -Glutamyl-Carboxylase (VKCFD1) ist sehr selten und geht mit einer gesteigerten Blutungsneigung einher.

Aktuelle Arbeiten zeigen eine weitere Manifestation von Mutationen im γ -Glutamyl-Carboxylase-Gen, die ein dermatologisches Krankheitsbild, ähnlich der Pseudoxanthoma elasticum, darstellt. In diesen Fällen zeigen die Patienten sowohl dermatologische Effloreszenzen im Sinne der PXE als auch eine Verminderung der Vitamin-K-abhängigen Faktoren. Es wird vermutet, dass die PXE-ähnlichen Hautveränderungen auf eine Funktionsstörung des Matrix-Gla-Proteins zurückzuführen sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationsdiagnostik bei vier Patienten mit kongenitalem Mangel aller Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren durchgeführt. Insgesamt wurden dabei fünf Mutationen nachgewiesen, davon vier Missense-Mutationen und eine Stopp-Mutation. Zwei der Patienten wiesen eine „compound Heterozygotie“ auf. Bei den gefunden Mutationen wurden drei im Rahmen dieser Arbeit erstmals aufgezeigt, die anderen zwei waren in der Literatur bereits beschrieben. Bei einer der Mutationen konnte ein „Founder“-Effekt in Bezug auf einen anderen Patienten aus der Literatur nachgewiesen werden. Sollte zukünftig diese Mutation in Deutschland vorkommen und sich auch auf die „Founder“-Mutation zurückführen lassen, böte sich dieser Mechanismus als eine Erklärung für das gehäufte Vorkommen der VKCFD Typ 1 in Deutschland an. Ein Hinweis auf eine PXE-like Disorder konnte bei keinem der Patienten nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde die genetische Variabilität des γ -Glutamyl-Carboxylase-Gens in der Normalbevölkerung untersucht. Für die Untersuchungen wurde zunächst die DNA einer phänotypisch unauffälligen Kontrollgruppe, bestehend aus 200 gesunden Blutspendern, auf Genvariationen im GGCX-Gen analysiert. Nach der Isolierung und der Amplifikation der DNA wurde mit sämtlichen Proben zunächst ein Mutati-

ons-Screening mittels dHPLC durchgeführt. Auffällige Abschnitte und solche, bei denen häufige und/oder mehrere Polymorphismen bereits bekannt waren, wurden sequenziert. Auf diese Weise wurden acht Polymorphismen in den codierenden bzw. die Exone flankierenden Genabschnitten nachgewiesen. Davon wurden zwei erstmals beschrieben (c.43+33T>A; c.1288-38T>C).

Schließlich sollte mit dieser Arbeit versucht werden zu klären, wie eine möglichst effiziente Diagnostik von Mutationen bzw. Polymorphismen des GGCX-Gens möglich ist. In unseren Untersuchungen wurde sowohl mit der dHPLC (Wave-System) als Screening-Methode gearbeitet als auch Genabschnitte sequenziert. Mittels der dHPLC kann ein hohes Probenaufkommen in kurzer Zeit mit vergleichsweise geringem Aufwand und vergleichsweise geringeren Kosten (ca. 30 € pro Genuntersuchung vs. Komplettssequenzierung ca. 300 €) bewältigt werden. Bei Genabschnitten mit vielen oder häufigen Polymorphismen ist dies ineffektiv, weil es nur das Vorhandensein einer Veränderung, nicht jedoch die Veränderung selbst beschreiben kann. Daher empfiehlt es sich, beide Methoden zu kombinieren, welches sich als die effizienteste und rationalste Methode für die Mutationsdiagnostik darstellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind von grundsätzlichem Interesse für die biomedizinische Forschung. Eventuell wird es damit dann möglich sein, Krankheitsentstehungen und ihre Verläufe bei Mutationen der γ -Glutamyl-Carboxylase besser zu verstehen und damit eine noch effektivere und nebenwirkungsärmere Therapie einzusetzen.

7 Summary

The γ -glutamyl-carboxylase plays a key role in the human organism, as it is responsible for posttranslational modification of all vitamin-K-dependant proteins. A hereditary deficiency of all vitamin-K-dependant factors based on a defect of the γ -glutamyl-carboxylase (VKCFD 1) is rare and corresponds with an increased tendency to bleeding complications.

Recent studies show an additional clinical manifestation of the GGCX gene, which seems to be a dermatological disease pattern similar to Pseudoxanthoma Elasticum. In these cases patients show dermatological efflorescences as well as a decrease of all vitamin-K-dependant factors. It is assumed, that the cutaneous changes could be attributed to a disfunction of matrix-gla-protein.

In this thesis a mutation diagnosis on four patients with congenital deficiency of all vitamin-K-dependent clotting factors have been undertaken. In total, five mutations have been detected – four missense mutations and one stop-mutation. Two of the patients exhibited „compound heterozygosity“. In this study, two of the detected mutations have been documented for the first time; the other three have already been described in literature before. At one of the mutations a „founder effect“ in connection with another patients could be found. If this mutation should occur in Germany again and be traced back to this „founder mutation“, this mechanism would be an explanation for an accumulation of VKCFD Typ 1 in Germany. A sign for PXE-like disorder could not be detected in any of the patients.

In addition the genetic variability of the γ -glutamyl-carboxylase-gene in the overall population has been researched. For the examinations, DNA of a control group (200 healthy blood donors) without pathological phenotypical findings have been analysed for gene variations on the GGCX-gene. After the isolation and amplification all DNA samples have been analysed with mutations screening by dHPLC. Noticeable parts and those, for which frequent and/or prevalent polymorphisms have been stated before, were sequenced. Eight polymorphisms in the coding and exon-flanking regions have been detected by applying this method, two of them for the first time (c.43+33T>A; c.1288-38T>C).

Additionally, the thesis tried to clarify how efficient diagnostic of mutations and polymorphisms of the GGCX-gene could be undertaken. In our research we applied dHPLC (WAVE-system) as well as gene sequencing. By applying the dHPLC-method a larger batch of samples can be analysed in a short-time span with comparable less effort and, even more important, comparably at lower costs (approximately €30 per gene analysis vs. complete sequencing at € 300). When applied at gene parts with numerous or frequent polymorphisms, the method is ineffective, as only the existence of alteration per se is marked, but not the alteration type. Looking at the quality of the results, it is recommendable to combine the two methods, which results in the most efficient and most rational method for mutation diagnosis.

The results of this thesis bear fundamental interest for the biomedical sciences & research. There might be options, for better understanding pathogeneses and their characteristics in γ -glutamyl-carboxylase-gene defects and therefore develop a therapy which will be more effective and with few side effects.

8 Literaturverzeichnis

- Ausavarat S, Tanpaiboon P, Tongkobpetch S, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V (2008) Two novel EBP mutations in Conradi-Hunermann-Happle syndrome. *Eur J Dermatol* 18:391-393
- Begent LA, Hill AP, Steventon GB, Hutt AJ, Pallister CJ, Cowell DC (2001) Characterization and purification of the vitamin K1 2,3 epoxide reductases system from rat liver. *J Pharm Pharmacol* 53:481-486
- Bercovitch L, Terry P (2004) Pseudoxanthoma elasticum 2004. *J Am Acad Dermatol* 51:S13-S14
- Berkner KL, Pudota BN (1998) Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:466-471
- Boneh A, Bar-Ziv J (1996) Hereditary deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors with skeletal abnormalities. *Am J Med Genet* 65:241-243
- Borowski M, Furie BC, Bauminger S, Furie B (1986) Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation-specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *J Biol Chem* 261:14969-14975
- Brenner B, Sanchez-Vega B, Wu SM, Lanir N, Stafford DW, Solera J (1998) A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood* 92:4554-4559
- Brenner B, Tavori S, Zivelin A, Keller CB, Suttie JW, Tatarsky I, Seligsohn U (1990) Hereditary deficiency of all vitamin K-dependent procoagulants and anticoagulants. *Br J Haematol* 75:537-542
- Chassaing N, Martin L, Calvas P, Le BM, Hovnanian A (2005) Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet* 42:881-892
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497-3500
- Cochrane CG, Revak SD (1980) The participation of high molecular weight kininogen in hypotensive shock and intravascular coagulation. *Clin Immunol Immunopathol* 15:367-374
- Dahlback B (2000) Blood coagulation. *Lancet* 355:1627-1632

- Dam H (1935) The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J* 29:1273-1285
- Darghouth D, Hallgren KW, Shtofman RL, Mrad A, Gharbi Y, Maherzi A, Kastally R, LeRicousse S, Berkner KL, Rosa JP (2006) Compound heterozygosity of novel missense mutations in the gamma-glutamyl-carboxylase gene causes hereditary combined vitamin K-dependent coagulation factor deficiency. *Blood* 108:1925-1931
- Ekelund H, Lindeberg L, Wranne L (1986) Combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX, and X: a case of probable congenital origin. *Pediatr Hematol Oncol* 3:187-193
- Finger RP, Charbel IP, Ladewig MS, Gotting C, Szliska C, Scholl HP, Holz FG (2009) Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol* 54:272-285
- Furie B, Furie BC (1992) Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 326:800-806
- Furie B, Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359:938-949
- Goldsmith GH, Jr., Pence RE, Ratnoff OD, Adelstein DJ, Furie B (1982) Studies on a family with combined functional deficiencies of vitamin K-dependent coagulation factors. *J Clin Invest* 69:1253-1260
- Has C, Bruckner-Tuderman L, Muller D, Floeth M, Folkers E, Donnai D, Traupe H (2000) The Conradi-Hunermann-Happle syndrome (CDPX2) and emopamil binding protein: novel mutations, and somatic and gonadal mosaicism. *Hum Mol Genet* 9:1951-1955
- Hojima Y, Cochrane CG, Wiggins RC, Austen KF, Stevens RL (1984) In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood* 63:1453-1459
- Hu X, Plomp A, Wijnholds J, Ten B, van SS, van den Born LI, Leys A, Peek R, de Jong PT, Bergen AA (2003) ABCC6/MRP6 mutations: further insight into the molecular pathology of pseudoxanthoma elasticum. *Eur J Hum Genet* 11:215-224
- Jesty J, Rodriguez J, Beltrami E (2005) Demonstration of a threshold response in a proteolytic feedback system: control of the autoactivation of factor XII. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34:71-79
- Johnson CA, Chung KS, McGrath KM, Bean PE, Roberts HR (1980) Characterization of a variant prothrombin in a patient congenitally deficient in factors II, VII, IX and X. *Br J Haematol* 44:461-469

- Knobloch JE, Suttie JW (1987) Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X. *J Biol Chem* 262:15334-15337
- Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P (1997) Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet Test* 1:201-206
- Kuo WL, Stafford DW, Cruces J, Gray J, Solera J (1995) Chromosomal localization of the gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12. *Genomics* 25:746-748
- Kurachi K, Davie EW (1977) Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry* 16:5831-5839
- Le Corvaisier-Pieto C, Joly P, Thomine E, Lair G, Lauret P (1996) [Generalized pseudoxanthoma elasticum combined with vitamin K dependent clotting factors deficiency]. *Ann Dermatol Venereol* 123:555-558
- Li Q, Grange DK, Armstrong NL, Whelan AJ, Hurley MY, Rishavy MA, Hallgren KW, Berkner KL, Schurgers LJ, Jiang Q, Uitto J (2009a) Mutations in the GGCX and ABCC6 genes in a family with pseudoxanthoma elasticum-like phenotypes. *J Invest Dermatol* 129:553-563
- Li Q, Jiang Q, Pfindner E, Varadi A, Uitto J (2009b) Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Exp Dermatol* 18:1-11
- Li Q, Schurgers LJ, Smith AC, Tsokos M, Uitto J, Cowen EW (2009c) Co-existent pseudoxanthoma elasticum and vitamin K-dependent coagulation factor deficiency: compound heterozygosity for mutations in the GGCX gene. *Am J Pathol* 174:534-540
- Macmillan DC, Vickers HR (1971) Pseudoxanthoma elasticum and a coagulation defect. *Br J Dermatol* 84:182
- Marchetti G, Caruso P, Lunghi B, Pinotti M, Lapecorella M, Napolitano M, Canella A, Mariani G, Bernardi F (2008) Vitamin K-induced modification of coagulation phenotype in VKORC1 homozygous deficiency. *J Thromb Haemost* 6:797-803
- Matsuo K (1996) [Conradi-Hunermann syndrome]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* 253-254
- McMillan CW, Roberts HR (1966) Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. Report of a case. *N Engl J Med* 274:1313-1315

- Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 127:1529-1537
- Morris DP, Stevens RD, Wright DJ, Stafford DW (1995) Processive post-translational modification. Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. *J Biol Chem* 270:30491-30498
- Mousallem M, Spronk HM, Sacy R, Hakime N, Soute BA (2001) Congenital combined deficiencies of all vitamin K-dependent coagulation factors. *Thromb Haemost* 86:1334-1336
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Murray CJ, Lopez AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1269-1276
- Mutucumarana VP, Acher F, Straight DL, Jin DY, Stafford DW (2003) A conserved region of human vitamin K-dependent carboxylase between residues 393 and 404 is important for its interaction with the glutamate substrate. *J Biol Chem* 278:46488-46493
- Mutucumarana VP, Stafford DW, Stanley TB, Jin DY, Solera J, Brenner B, Azerad R, Wu SM (2000) Expression and characterization of the naturally occurring mutation L394R in human gamma-glutamyl carboxylase. *J Biol Chem* 275:32572-32577
- Neldner KH (1988) Pseudoxanthoma elasticum. *Int J Dermatol* 27:98-100
- Oldenburg J, Marinova M, Muller-Reible C, Watzka M (2008) The vitamin K cycle. *Vitam Horm* 78:35-62
- Oldenburg J, von BB, Fregin A, Rost S, Wolz W, Eberl W, Eber S, Lenz E, Schwaab R, Brackmann HH, Effenberger W, Harbrecht U, Schurgers LJ, Vermeer C, Muller CR (2000) Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex. *Thromb Haemost* 84:937-941
- Orbak Z, Selimoglu A, Doneray H (2003) Inherited vitamin K deficiency: case report and review of literature. *Yonsei Med J* 44:923-927
- Pauli RM, Lian JB, Mosher DF, Suttie JW (1987) Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin embryopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives. *Am J Hum Genet* 41:566-583

- Pechlaner C, Vogel W, Erhart R, Pumpel E, Kunz F (1992) A new case of combined deficiency of vitamin K dependent coagulation factors. *Thromb Haemost* 68:617
- Price PA, Faus SA, Williamson MK (1998) Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1400-1407
- Ratnoff OD, Saito H (1979) Interactions among Hageman factor, plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen, and plasma thromboplastin antecedent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:958-961
- Rongioletti F, Bertamino R, Rebora A (1989) Generalized pseudoxanthoma elasticum with deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. *J Am Acad Dermatol* 21:1150-1152
- Rost S (2005) Molekulare Ursachen Vitamin K-abhängiger Gerinnungsstörungen. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J (2004a) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427:537-541
- Rost S, Fregin A, Koch D, Compes M, Muller CR, Oldenburg J (2004b) Compound heterozygous mutations in the gamma-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Br J Haematol* 126:546-549
- Rost S, Geisen C, Fregin A, Seifried E, Muller CR, Oldenburg J (2006) Founder mutation Arg485Pro led to recurrent compound heterozygous GGcX genotypes in two German patients with VKCFD type 1. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17:503-507
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Shearer MJ (2000) Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3:433-438

- Soute BA, Jin DY, Spronk HM, Mutucumarana VP, Lin PJ, Hackeng TM, Stafford DW, Vermeer C (2004) Characteristics of recombinant W501S mutated human gamma-glutamyl carboxylase. *J Thromb Haemost* 2:597-604
- Sperling R, Furie BC, Blumenstein M, Keyt B, Furie B (1978) Metal binding properties of gamma-carboxyglutamic acid. Implications for the vitamin K-dependent blood coagulation proteins. *J Biol Chem* 253:3898-3906
- Spronk HM, Farah RA, Buchanan GR, Vermeer C, Soute BA (2000) Novel mutation in the gamma-glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood* 96:3650-3652
- Spronk HM, Govers-Riemslog JW, ten CH (2003) The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays* 25:1220-1228
- Stanley TB, Stafford DW, Olivera BM, Bandyopadhyay PK (1997) Identification of a vitamin K-dependent carboxylase in the venom duct of a *Conus* snail. *FEBS Lett* 407:85-88
- Steijlen PM, van GM, Vreeburg M, Marcus-Soekarman D, Spaapen LJ, Castelijns FC, Willemsen M, van Steensel MA (2007) Novel EBP gene mutations in Conradi-Hunermann-Happle syndrome. *Br J Dermatol* 157:1225-1229
- Thomas A, Stirling D (2003) Four factor deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14 Suppl 1:S55-S57
- Tie J, Wu SM, Jin D, Nicchitta CV, Stafford DW (2000) A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 96:973-978
- Titapiwatanakun R, Rodriguez V, Middha S, Dukek BA, Pruthi RK (2009) Novel splice site mutations in the gamma glutamyl carboxylase gene in a child with congenital combined deficiency of the vitamin K-dependent coagulation factors (VKCFD). *Pediatr Blood Cancer* 53:92-95
- Traupe H, Has C (2000) The Conradi-Hunermann-Happle syndrome is caused by mutations in the gene that encodes a 8-7 sterol isomerase and is biochemically related to the CHILD syndrome. *Eur J Dermatol* 10:425-428
- Vanakker OM, Martin L, Gheduzzi D, Leroy BP, Loeys BL, Guerci VI, Matthys D, Terry SF, Coucke PJ, Pasquali-Ronchetti I, De PA (2007) Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity. *J Invest Dermatol* 127:581-587
- Vermeer C (1984) The vitamin K-dependent carboxylation reaction. *Mol Cell Biochem* 61:17-35

- Vicente V, Maia R, Alberca I, Tamagnini GP, Lopez BA (1984) Congenital deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors and protein C. *Thromb Haemost* 51:343-346
- Wallin R, Suttie JW (1982) Vitamin K-dependent carboxylase: evidence for cofractionation of carboxylase and epoxidase activities, and for carboxylation of a high-molecular-weight microsomal protein. *Arch Biochem Biophys* 214:155-163
- Watzka M, Scheer M, Wieland R, Oldenburg J (2008) Novel mutation in the gamma carboxylase gene resulting in VKCFD1. *Haemostaseologie* 28:A 34
- Weston BW, Monahan PE (2008) Familial deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. *Haemophilia* 14:1209-1213
- Williams ML, Elias PM (1987) Genetically transmitted, generalized disorders of cornification. The ichthyoses. *Dermatol Clin* 5:155-178
- Wu SM, Cheung WF, Frazier D, Stafford DW (1991) Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. *Science* 254:1634-1636
- Wu SM, Stafford DW, Frazier LD, Fu YY, High KA, Chu K, Sanchez-Vega B, Solera J (1997a) Genomic sequence and transcription start site for the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 89:4058-4062
- Wu SM, Stanley TB, Mutucumarana VP, Stafford DW (1997b) Characterization of the gamma-glutamyl carboxylase. *Thromb Haemost* 78:599-604
- Xi M, Beguin S, Hemker HC (1989) The relative importance of the factors II, VII, IX and X for the prothrombinase activity in plasma of orally anticoagulated patients. *Thromb Haemost* 62:788-791
- Xiao W, Oefner PJ (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 17:439-474

9 Anhang

Tabelle 13 **GGCX-Polymorphismenkarte. Genotyp in 200 Blutspendern.**

GGCX										
Nukleotid-Pos. (g)	807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028		
Nukleotid-Pos. (c)	43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21		
Exon/Intron	Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15		
Aminosäure		Ser>Ser	Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg			
Codon-Nr.		113	325	406	414		498			
Codon		GAC>GAT	CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT			
min Allel (dbSNP)		ND	0,425	0,38	0,11		ND	0,38		
rs-Nummer	neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898		
Austausch	T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T		
NO	SEX	AF F	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07	SNP 08
1	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
2	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
3	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
4	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
5	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
6	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/T	C/T
7	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T
8	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
9	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
10	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
11	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
12	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
13	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
14	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
15	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
16	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
17	1	1	T/T	C/C	G/G	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C
18	1	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
19	1	1	T/A	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
20	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
21	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
22	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
23	1	1	T/A	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
24	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
25	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
26	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
27	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
28	1	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C

GGCX										
Nukleotid-Pos. (g)		807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028	
Nukleotid-Pos. (c)		43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21	
Exon/Intron		Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15	
Aminosäure			Ser>Ser	Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg		
Codon-Nr.			113	325	406	414		498		
Codon			GAC>GAT	CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT		
min Allel (dbSNP)			ND	0,425	0,38	0,11		ND	0,38	
rs-Nummer		neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898	
Austausch		T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T	
NO	SEX	AF	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07	SNP 08
		F								
29	1	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/C
30	1	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/C	T/T	C/T	C/T
31	1	1	T/A	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T
32	1	1	T/A	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T
33	1	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
34	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
35	1	1	T/A	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
36	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
37	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
38	1	1	T/A	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
39	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
40	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
41	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
42	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
43	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
44	1	1	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
45	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
46	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
47	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
48	1	1	T/A	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
49	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
50	1	1	T/A	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
51	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
52	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
53	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
54	1	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
55	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
56	1	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
57	1	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
58	1	1	T/A	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
59	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
60	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
61	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
62	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
63	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C

GGCX										
Nukleotid-Pos. (g)		807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028	
Nukleotid-Pos. (c)		43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21	
Exon/Intron		Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15	
Aminosäure			Ser>Ser	Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg		
Codon-Nr.			113	325	406	414		498		
Codon			GAC>GAT	CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT		
min Allel (dbSNP)			ND	0,425	0,38	0,11		ND	0,38	
rs-Nummer		neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898	
Austausch		T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T	
NO	SEX	AF	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07	SNP 08
64	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
65	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
66	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
67	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
68	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
69	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
70	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
71	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
72	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
73	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
74	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
75	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
76	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
77	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
78	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
79	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
80	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
81	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
82	1	1	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
83	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
84	1	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
85	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
86	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
87	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
88	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
89	1	1	T/A	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
90	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
91	1	1	T/T	C/C	G/A	T/T	C/C	T/T	C/C	C/T
92	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
93	1	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
94	1	1	T/T	C/C	G/A	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C
95	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T
96	1	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T
97	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
98	1	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C

GGCX										
Nukleotid-Pos. (g)		807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028	
Nukleotid-Pos. (c)		43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21	
Exon/Intron		Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15	
Aminosäure		Ser>Ser		Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg		
Codon-Nr.		113		325	406	414		498		
Codon		GAC>GAT		CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT		
min Allel (dbSNP)		ND		0,425	0,38	0,11		ND		0,38
rs-Nummer		neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898	
Austausch		T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T	
NO	SEX	AF	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07	SNP 08
99	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
100	1	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
101	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
102	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
103	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
104	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
105	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
106	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
107	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
108	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
109	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
110	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
111	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
112	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
113	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
114	2	1	T/T	C/T	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
115	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
116	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
117	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
118	2	1	T/A	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
119	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/C	C/C	C/T
120	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
121	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
122	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
123	2	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
124	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
125	2	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/T	T/T	C/C	C>T
126	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
127	2	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
128	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
129	2	1	T/A	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
130	2	1	T/A	C/C	G/A	C/T	C/C	T/C	C/C	C/T
131	2	1	T/T	C/T	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
132	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
133	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C

GGCX										
Nukleotid-Pos. (g)		807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028	
Nukleotid-Pos. (c)		43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21	
Exon/Intron		Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15	
Aminosäure			Ser>Ser	Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg		
Codon-Nr.			113	325	406	414		498		
Codon			GAC>GAT	CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT		
min Allel (dbSNP)			ND	0,425	0,38	0,11		ND	0,38	
rs-Nummer		neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898	
Austausch		T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T	
NO	SEX	AF	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07	SNP 08
134	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
135	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
136	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
137	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
138	2	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
139	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/C
140	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
141	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
142	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
143	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
144	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
145	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
146	2	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
147	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T
148	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
149	2	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
150	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
151	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
152	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
153	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
154	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
155	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
156	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
157	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T
158	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
159	2	1	T/A	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
160	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T
161	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
162	2	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
163	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
164	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
165	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
166	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
167	2	1	T/T	C/C	G/G	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
168	2	1	T/T	C/C	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C

GGCX										
Nukleotid-Pos. (g)		807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028	
Nukleotid-Pos. (c)		43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21	
Exon/Intron		Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15	
Aminosäure			Ser>Ser	Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg		
Codon-Nr.			113	325	406	414		498		
Codon			GAC>GAT	CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT		
min Allel (dbSNP)			ND	0,425	0,38	0,11		ND	0,38	
rs-Nummer		neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898	
Austausch		T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T	
NO	SEX	AF	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07	SNP 08
169	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
170	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
171	2	1	T/T	C/T	A/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
172	2	1	T/T	C/C	G/A	T/T	C/C	T/C	C/C	C/T
173	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
174	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
175	2	1	T/T	C/C	G/A	T/T	C/C	T/T	C/C	C/T
176	2	1	T/T	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	C/C	C/T
177	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
178	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
179	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
180	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
181	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
182	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
183	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
184	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
185	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
186	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
187	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
188	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
189	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/T	T/T	C/C	C/T
190	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
191	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
192	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C
193	2	1	T/T	C/C	G/A	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
194	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
195	2	1	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
196	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/T
197	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
198	2	1	T/T	C/C	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C
199	2	1	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C
200	2	1	T/T	C/T	G/A	C/T	C/C	T/T	C/C	C/C

GGCX									
Nukleotid-Pos. (g)	807	3223	8762	9167	9191	9570	10248	12028	
Nukleotid-Pos. (c)	43+33	339	974	1218	1242	1288-38	1494	2085-21	
Exon/Intron	Intron 1	Exon 3	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Intron 10	Exon 11	Intron 15	
Aminosäure		Ser>Ser	Arg>Gln	Arg>Arg	Thr>Thr		Arg>Arg		
Codon-Nr.		113	325	406	414		498		
Codon		GAC>GAT	CGA>CAA	CGC>CGT	ACC>ACT		CGC>CGT		
min Allel (dbSNP)		ND	0,425	0,38	0,11		ND	0,38	
rs-Nummer	neu	rs6751560	rs699664	rs2592551	rs10179904	neu	rs41290033	rs2028898	
Austausch	T>A	C>T	G>A	C>T	C>T	T>C	C>T	C>T	
NO	SEX	AF	SNP 01	SNP 02	SNP 03	SNP 04	SNP 05	SNP 06	SNP 07
		F							SNP 08

Häufigkeiten

Codierung	1	T	C	G	C	C	T	C	C
	2	A	T	A	T	T	C	T	T
Genotyp	1/ 2	14	7	113	97	36	3	2	82
	1	186	193	73	98	164	197	198	118
	2	0	0	14	5	0	0	0	0
Allel	1	386	393	259	293	364	397	398	318
	2	14	7	141	107	36	3	2	82
Allelfre- quenz	1	0,9650	0,9825	0,6475	0,7325	0,91	0,9925	0,9950	0,7950
	2	0,0350	0,0175	0,3525	0,2675	0,09	0,0075	0,0050	0,2050

- Min Allel (dbS) = Frequenz des selteneren Allels nach Internet-Datenbank
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&go=Go&locusId=2677
- RS-Nummer = „Link“ und eindeutige Bezeichnung einer variablen Stelle innerhalb der Internet-Datenbank
- NO = Probandennummer (1–200)
- Sex = Geschlechtsangabe (1 = männlich, 2 = weiblich)
- Allel-Angabe: A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Professor Dr. med Dr. h.c. Erhard Seifried für die Annahme als Doktorandin, die Überlassung des Themas und die Möglichkeit den praktischen Teil dieser Arbeit im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Blutspendedienstes des Deutschen Roten Kreuzes Frankfurt am Main durchführen zu können. Ebenfalls großen Dank an Herrn Professor Dr. Oldenburg für die Betreuung zu Beginn der Arbeit.

Weiterhin vielen Dank an Herrn Dr. Christof Geisen für sein Engagement bei der Betreuung des praktischen und schriftlichen Teils dieser Arbeit, seiner konstruktiven Kritik und seinen zahlreichen Anregungen.

An die gesamte Arbeitsgruppe der Hämostaseologie meinen herzlichen Dank für die Hilfe bei dem experimentellen Teil dieser Arbeit.

Zuletzt mein größter Dank an meine Familie, besonders meinem Vater Dr. med Van Vinh Nguyen, der mich immer unterstützt hat, mir ein Vorbild war und dem ich alles was ich bin zu verdanken habe. Ihm widme ich diese Arbeit.

11 Lebenslauf

Name: Sa Lan Nguyen

Geburtsdatum: 20.11.1979

Geburtsort: Lebach

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1986–1990: Grundschule Bad Soden Salmünster

1990–1996: Gymnasium Bad Soden Salmünster

1996–1999 Ulrich von Hutten Gymnasium, Schlüchtern

Juni 1999: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung:

Oktober 1999 – Juni 2005: Studium der Zahnmedizin an der
Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt

August 2000: Naturwissenschaftliche Vorprüfung

September 2002: Zahnärztliche Vorprüfung

Juni 2005: Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin

Seit Juni 2005: Doktorandin im DRK Blutspendedienst
Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige
GmbH

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt

Oktober 2005 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Johann- Wolfgang- Goethe Universität, Frankfurt

März 2008 Ärztliche Vorprüfung

Berufliche Tätigkeit:

Oktober 2005 – Juli 2006: Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. Ali Daouk,
Obertshausen

August 2006 – März 2008: Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. Hager,
Wächtersbach

Seit Juni 2008: Angestellte Zahnärztin in der Praxis Dr. König,
Schlüchtern

Bad Soden Salmünster, den

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Die genetische Variabilität des
γ-Glutamyl-Carboxylase-Gens (GGCX)
bei Patienten mit angeborener Verminderung
der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren
und in der Allgemeinbevölkerung**

in dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erhard Seifried mit Unterstützung durch Dr. Christof Geisen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Bad Soden Salmünster, den

(Ort und Datum)

(Sa Lan Nguyen)