

Zur Kontrolle der Amplifikation wurde mit 5µl des Amplifikats auf 3%igem Agarose-Gel (*NuSieve*TM), das durch Zugabe von Ethidiumbromid (Konzentration 0,5 µg/ml) angefärbt wurde, eine Elektrophorese bei 65-70 mA durchgeführt.

Das jeweilige Amplifikationsprodukt wurde mit den Restriktionsenzymen XmnI, TaqI bzw. HhaI unter den in Tabelle 2.1 beschriebenen Bedingungen gespalten. Im Falle des Amplifikationsproduktes für DdeI ist keine Spaltung nötig, da es sich hierbei um einen 50bp Insertions-/Deletions-Polymorphismus handelt, der bereits bei der Amplifikation unterschiedlich große Fragmente erzeugt.

Zum Nachweis der Spaltprodukte wurde eine erneute Elektrophorese durchgeführt. Langsamere größere Fragmente wurden mit Allel 1 bezeichnet, schnellere kleinere Fragmente, die durch die Spaltung am polymorphen Restriktionsort entstanden, als Allel 2.

Die Anfertigung eines DNA-freien Blindwertes diente der Aufdeckung einer eventuellen Verunreinigung.

Zur Kontrolle des Restriktionsverdaus wurde eine bekannte heterozygote Probe mitgeführt, da bei den von uns verwendeten PCR-Primern keine konstante Spaltstelle zur Kontrolle des Verdaus vorlag.

Der im Kodon 148 (Exon 6) gelegene MnlI Polymorphismus (Nukleotid 20422 A→G; Thr→Ala) wurde im Rahmen der Sequenzanalyse ermittelt. Er kann auch durch die PCR-Methode bestimmt werden [Graham et al. 1989].

2.2.4 Heteroduplexmethode

Der zeitliche und materielle Aufwand für die Mutationsanalyse kann mit Hilfe der Heteroduplexanalyse wesentlich verringert werden [White et al. 1992]. Hier werden zunächst mittels PCR einzelne Genabschnitte (Exons) amplifiziert. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA und anschließender Renaturierung kann es beim heterozygoten Vorliegen einer Mutation sowohl zur Bildung von Homoduplices (Wildtyp/Wildtyp und Mutant/Mutant) als auch von Heteroduplices (Wildtyp/Mutant) kommen, die

bei der Elektrophorese ein unterschiedliches Wanderungsverhalten aufweisen können.

Die Heteroduplexmethode wurde nach Wulff et al. [1997] im IHG durchgeführt und die Ergebnisse zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Automatische Sequenzierung

Zum Mutationsnachweis wurden anhand der Sequenzdaten für das FIX Gen [Yoshitake et al. 1985] exonflankierende Primerpaare abgeleitet und mit Hilfe der PCR-Technik diese Bereiche amplifiziert [Wulff et al. 1995]. Doppelsträngige PCR-Produkte aller acht Exons des FIX-Gens einschließlich der Exon-Intron-Übergänge wurden mittels *Microcon 30-* bzw. *Microcon 100-Konzentratoren* (*Amicon GmbH, Germany*) gereinigt und konzentriert. Die Direktsequenzierung erfolgte nach dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. [1977]. Die PCR-Produkte der selektierten Exonregionen wurden mit dem *Sequenzer 373 A* und den Sequenzierungsreagentien des *Dye Terminator Sequencing FS Kit* der Firma *ABI* analysiert. [Wulff et al. 1996]

Die Ergebnisse dieser im IHG durchgeführten Untersuchungen wurden übernommen.

2.3 Mathematische und statistische Verfahren

Die Heterozygotenfrequenz für einen diallelen Polymorphismus ergibt sich in Gleichgewichtspopulationen aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz [Peake et al. 1993]:

$$1 = p^2 + 2pq + q^2$$

p^2 - Frequenz der Homozygoten für Allel 1

q^2 - Frequenz der Homozygoten für Allel 2

$2pq$ - Heterozygotenfrequenz

Signifikante Unterschiede zwischen den beobachteten und erwarteten Allel- bzw. Haplotypfrequenzen wurden mit dem χ^2 -Test abgesichert [Glantz 1992].

Als Nullhypothese wurde angenommen, dass erwartete und beobachtete Heterozygoten- und Haplotypfrequenzen gleich sind.

Die Prüfgröße wurde wie folgt berechnet:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(\text{beobachteter} - \text{erwarteter Wert})^2}{\text{erwarteter Wert}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Erfassung und Charakterisierung der zur genomischen Diagnostik anstehenden Familien

Im Untersuchungszeitraum Januar 1988-September 1999 wurden insgesamt 359 Indexpatienten und Familienangehörige erfasst (Tab. 3.1). In 58 Fällen wurden die Indexpatienten zusammen mit weiteren Familienangehörigen überwiesen. Dazu kommen 67 Einzelpatienten

Nach Stammbaumanalyse finden sich 37 obligate und 131 mögliche Konduktorinnen.

Im Rahmen der indirekten Diagnostik wurden zusätzlich 66 Familienangehörige untersucht.

Tabelle 3.1: Aufschlüsselung der 359 überwiesenen Personen

Untersuchte Personen	Anzahl	Gesamt
Indexpatienten	Familiendiagnostik 58	125
	Einzelpatienten 67	
Konduktorinnen nach Stammbaum	Obligate 37	168
	Mögliche 131	
Familienangehörige^a	66	66
Gesamt		359

^a Familienmitglieder, die keiner der o.g. Kategorien entsprechen. Diese wurden im Rahmen der indirekten Diagnostik mituntersucht.

Angaben zum Phänotyp der HB bei 103 Patienten (bei 22 Patienten findet sich hierzu keine Angabe) finden sich in Tabelle 3.2. Gesondert aufgeführt werden 5 Patienten mit einer Hemmkörper Anamnese und 2 Patienten mit der Sonderform HB Leyden (s. 1.1.4, S. 6).

Tabelle 3.2: Verteilung der Patienten in Bezug auf den Phänotyp (insofern dieser bekannt ist)

Klinischer Schweregrad (FIX:C) ^a	Anzahl Patienten	Prozent
Schwer (<1)	44	43
Schwer + Hemmkörper	5	5
Moderat (1-5)	31	30
Leicht (>5)	21	20
Leyden ^b	2	2
Total	103	100

^a Teilweise nur Angabe von Schweregrad oder FIX:C-Wert (in IU/ml = %)

^b FIX:C-Werte variieren in Abhängigkeit vom Lebensalter und steigen nach der Pubertät an

Angaben zur Familienanamnese der HB liegen bei 46 (37%) der Indexpatienten vor: von diesen sind 29 (63%) Patienten sporadische Fälle und bei 17 Patienten (37%) ist die HB in der Familie bekannt.

3.2 Indirekte genomische Diagnostik

3.2.1 Allelfrequenzen/Heterozygotenrate

Um den Wert der mit der Mutation eng gekoppelten intra- und intergenen Marker für die Segregationsanalyse einschätzen zu können, werden die Allelfrequenzen in der hier untersuchten deutschen Population bestimmt und daraus die Heterozygotenfrequenzen ermittelt (s. Tabelle 3.3, S. 26). Die Heterozygotenfrequenz ist ein Maß für die zu erwartende Informativität, d.h. wie häufig können bei den Probanden beide Allele eines bestimmten Markers unterschieden werden. Nur dann kann eine Aussage zur Kosegregation der HB mit einem bestimmten Marker getroffen werden. Zur Ermittlung der Allelfrequenzen dürfen nur nichtverwandte Personen herangezogen werden. In diese Untersuchung wird aus jeder Familie jeweils die Mutter eines Hämophilen einbezogen. Steht von der Mutter keine DNA zur Verfügung, so

erfolgt die Untersuchung des Patienten und, falls vorhanden, einer als Nicht-Konduktorin diagnostizierten Schwester. Außerdem werden alle angeheirateten Familienmitglieder eingeschlossen.

Tabelle 3.3: Allelfrequenzen intragener und extragener polymorpher Spaltorte im *FIX*-Gen und die daraus zu erwartende Heterozygotenfrequenz sowie die unter den weiblichen Personen beobachtete Heterozygotenfrequenz (unabhängige Allele)

RFLP	Allelfrequenzen	Heterozygotenfrequenz (2pq)		
		erwartet ^a	erwartet nach Literatur ^d	beobachtet (Anzahl untersuchte Frauen)
DdeI		0,44	0,36	0,33 (73) ^b
untersuchte Allele	247			
Allel 1	0,32			
Allel 2	0,68			
XmnI		0,32	0,41	0,42 (72) ^c
untersuchte Allele	246			
Allel 1	0,80			
Allel 2	0,20			
TaqI		0,42	0,45	0,41 (75)
untersuchte Allele	253			
Allel 1	0,70			
Allel 2	0,30			
HhaI		0,50	0,48	0,48 (73)
untersuchte Allele	247			
Allel 1	0,49			
Allel 2	0,51			
SacI		0,50	0,49	0,40 (42)
untersuchte Allele	111			
Allel 1	0,50			
Allel 2	0,50			
MnII		0,40	0,45	0,42 (19)
untersuchte Allele	64			
Allel 1	0,72			
Allel 2	0,28			

^a errechnet aus Allelfrequenzen der Allele 1 und 2 der vorhergehenden Spalte ($2pq=1-p^2-q^2$)

^b signifikante Abweichung erwartet/beobachtet ($p<0,005$)

^c signifikante Abweichung erwartet/beobachtet ($p<0,025$)

^d [Peake 1992; Peake et al. 1993; Peake 1995]

Aus der Allelverteilung der einzelnen RFLP errechnet sich eine hohe erwartete Heterozygotenfrequenz zwischen 0,40 und 0,50 für die Marker TaqI, DdeI, HhaI, SacI und MnII (Berechnung nach 2.3, S. 23f.). Die errechneten Erwartungswerte stimmen mit den bekannten Literaturdaten überein [Peake et al., 1993], Abweichungen gibt es lediglich bei Dde I und XmnI.

Die beobachteten und erwarteten Heterozygotenfrequenzen bei den Markern DdeI und XmnI sind signifikant verschieden (Berechnung nach 2.3, S. 23f.). Die beobachteten Werte entsprechen jedoch den aus der Literatur bekannten Daten für beobachtete Heterozygotenfrequenzen. Der Vergleich der

beobachteten und erwarteten Heterozygotenfrequenzen bei den übrigen Markern entspricht der Nullhypothese ($p > 0,1$).

3.2.2 Haplotypfrequenzen/Kopplungsungleichgewicht

Die Haplotypfrequenzen werden für die vier Polymorphismen TaqI, XmnI, DdeI und HhaI bestimmt. In diese Untersuchung wird aus jeder Familie jeweils die Mutter eines Hämophilen einbezogen. Steht von der Mutter keine DNA zur Verfügung, so erfolgt die Untersuchung des Patienten und, falls vorhanden, einer als Nicht-Konduktorin diagnostizierten Schwester. Außerdem werden alle angeheirateten Familienmitglieder eingeschlossen. Nicht eingeschlossen werden Frauen ohne Familienuntersuchung, da hier die Haplotypen nicht sicher definiert werden können.

Bei 226 Personen werden alle vier genannten Polymorphismen bestimmt. Es können 8 polymorphe Haplotypen definiert werden (d.h. ein Haplotyp hat eine Frequenz von mind. 1%). Keiner der Haplotypen hat eine Frequenz von mehr als 20%. Die übrigen theoretisch möglichen Allelkombinationen werden bei keinem der Untersuchten beobachtet.

Tabelle 3.4: Haplotypfrequenzen bei 226 vollständig (TaqI, XmnI, DdeI und HhaI) untersuchten nicht verwandten Personen

RFLP Allel				Prozent
TaqI	XmnI	DdeI	HhaI	
1	1	1	1	14
1	1	1	2	17
1	1	2	1	20
1	1	2	2	20
2	1	2	1	8
2	1	2	2	3
2	2	2	1	7
2	2	2	2	11
				100

Wird zusätzlich der SacI Polymorphismus herangezogen, so verteilen sich die o.g. Haplotypen ungefähr zu gleichen Teilen auf den SacI-Polymorphismus 1 bzw. 2.

Zur Einschätzung eines evtl. vorhandenen Kopplungsungleichgewichtes werden die Häufigkeiten der beobachteten Haplotypen bei jeweils zwei untersuchten Polymorphismen untersucht und mit den, aus den Allelfrequenzen ermittelten, erwarteten Haplotypfrequenzen verglichen. Die ermittelten

beobachteten und erwarteten Haplotypfrequenzen werden durch Anwendung des χ^2 -Tests verglichen.

Es kommt zu signifikanten Abweichungen bei den Kombinationen der RFLP TaqI/XmnI und TaqI/DdeI (s. Tabelle 7.1 im Anhang). Hier kann das aus der Literatur bekannte Kopplungsungleichgewicht nachgewiesen werden [Winship et al., 1984], [Arveiler et al., 1988]. Der Vergleich der übrigen beobachteten und erwarteten Haplotypen für intra- und extragenen Marker entspricht der Nullhypothese eines bestehenden Kopplungsgleichgewichtes.

3.2.3 RFLP-Analyse und Konduktorinnendiagnostik

131 mögliche Konduktorinnen für HB wurden im IHG hinsichtlich des Genotyps folgender Polymorphismen untersucht: DdeI, XmnI, TaqI und HhaI (bei allen Frauen charakterisiert), SacI (bei 56 Frauen) und MnlI (bei 12 Frauen). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1, S. 29 zusammengefasst.

Bei der Untersuchung nur eines inter- oder intragenen Polymorphismus kann für 25-36% aller untersuchten Frauen Heterozygotie nachgewiesen werden (Pinke Balken). Dabei sind TaqI und HhaI die Marker mit der höchsten Aussagekraft. Werden zwei Polymorphismen untersucht, sind, abhängig von den untersuchten Markern, 38-55% der untersuchten Frauen für mindestens einen der Polymorphismen heterozygot. Die Untersuchung von insgesamt drei Markern deutet auf Heterozygotie bei 52 bis 71% der Konduktorinnen. Der Anteil nachgewiesener Heterozygotie lässt sich durch die Untersuchung eines weiteren Polymorphismus auf 71-77% steigern. Bei 56 Frauen konnten fünf Polymorphismen charakterisiert werden. Hier sind 84% der untersuchten Frauen für wenigstens einen Polymorphismus heterozygot. Wird MnlI einbezogen, erhöht sich die Aussagekraft auf 88%, da 2 untersuchte Frauen nur für diesen Marker heterozygot sind.

Insgesamt weisen somit 115 der 131 untersuchten Frauen (88%) Heterozygotie für mindestens einen der untersuchten Marker auf. Hierbei handelt es sich bei 105 (80%) der möglichen Konduktorinnen um einen intragenen Marker, bei 10 Frauen um einen extragenen Marker (diagnostisches Risiko der extragenen Marker: HhaI ca. 99% (7 der Frauen), SacI 93-95% (3 Frauen)).

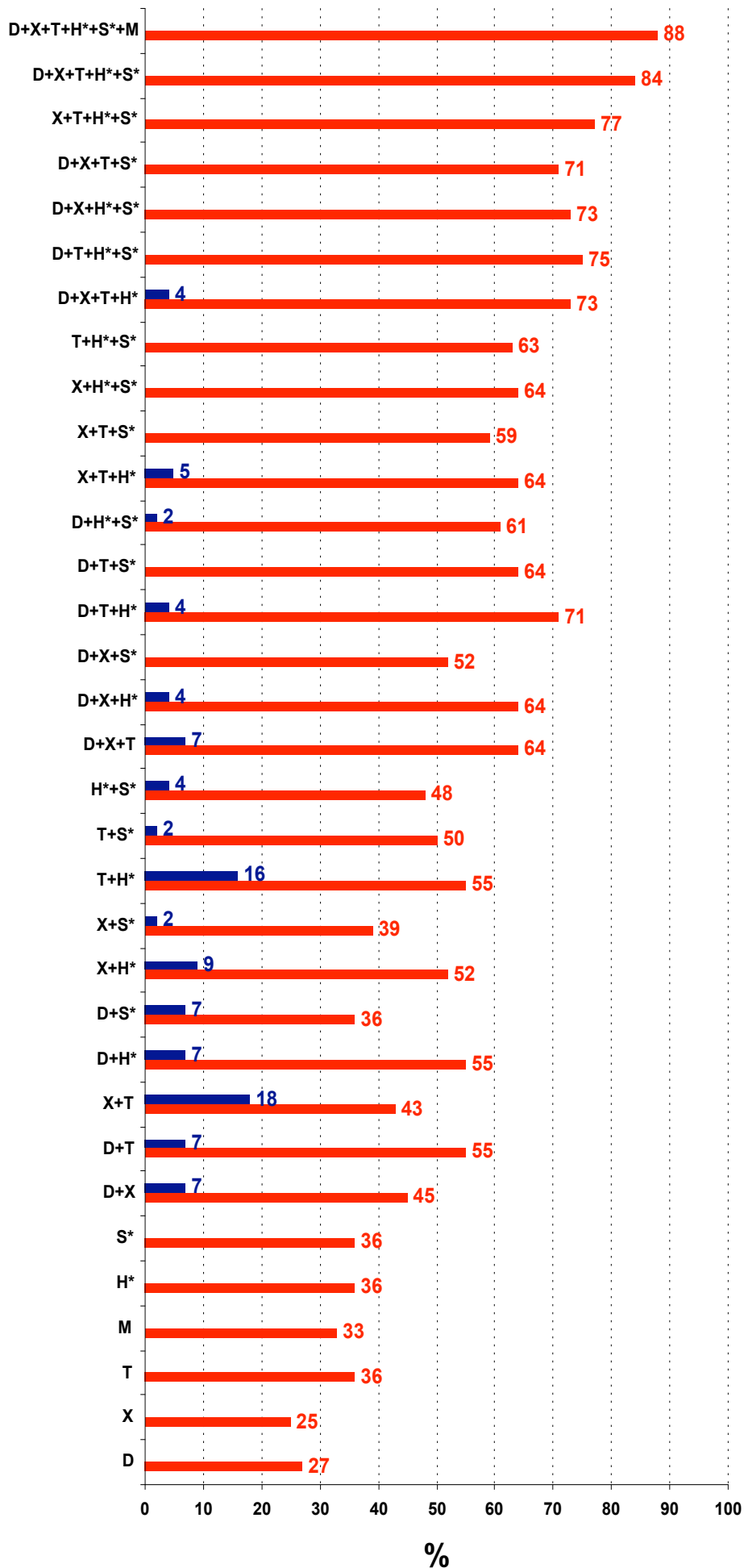


Abb. 3.1.: RFLP-Analyse: Pinke Balken: Anteil der Frauen der im aufgeführten Polymorphismus (D=DdeI, X=XmnI, T=TaqI, H=HhaI, S=SacI, M=MnII) informativ ist. Bei den Kombinationen sind die Frauen für mindestens einen der Marker informativ. (SacI wurde bei 35 und MnII bei 12 Frauen untersucht). Violette Balken: Anteil der Frauen, die in allen aufgeführten Markern informativ sind (* intergene Marker)

Von den 131 möglichen Konduktorinnen kann bei 72 über eine Familiendiagnostik keine Aussage zum Konduktorinnenstatus gemacht werden, da sich erwies, dass für die Haplotypanalyse wichtige Familienangehörige nicht zur Untersuchung zur Verfügung standen.

Ein weiteres Problem für die indirekte Diagnostik besteht darin, dass nur bei einem Teil der untersuchten Familien Angaben zur Familienanamnese vorliegen, oder diese sporadisch ist (s. 3.1, S. 24f.). Bei 12 möglichen Konduktorinnen dieser Familien findet sich zwar ein mit der HB gekoppelter Genotyp, eine Neumutation kann bei den Patienten aber nicht ausgeschlossen werden. Allerdings kann bei einer p.D. eine fetale Erkrankung mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden (abhängig von der Informativität des RFLP: 93-99,98%).

Somit erfolgte eine indirekte Konduktorinnendiagnostik für 47 der 131 möglichen Konduktorinnen (s. Tabelle 3.5). Bei 40 Ratsuchenden kann der Konduktorinnenstatus auf der Basis der indirekten genomischen Diagnostik bestätigt bzw. ausgeschlossen werden.

Bei 7 untersuchten Frauen ist keine informative Aussage, da die Mutter des Patienten für alle untersuchten Marker homozygot ist, so dass sich die Weitergabe des mutierten Gens nicht verfolgen lässt.

Tabelle 3.5 Indirekte genomische Diagnostik bei 55 möglichen Konduktorinnen

Konduktorinnendiagnostik	Anzahl mögliche Konduktorinnen (%)
Untersuchte mögliche Konduktorinnen	47 (100)
informatives Ergebnis:	40 (85)
-Konduktorinnenstatus bestätigt-Sicherheit 93-99,98%	7
-Konduktorinnenstatus ausgeschlossen-Sicherheit 93-99,98%	33
nicht informatives Ergebnis:	7(15)
-Mutter nicht informativ	7

Für 32 (80%) der untersuchten Frauen mit informativem Ergebnis kann diese Aussage mit einer diagnostischen Sicherheit von 99,98% getroffen werden (intragene Marker informativ), bei 5 Frauen (13%) wurde eine maximale diagnostische Sicherheit von 99% (HhaI-Polymorphismus) und bei 3 (7%) eine Sicherheit von höchstens 93-95% (SacI-RFLP) erzielt.

In Abb. 3.2 wird ein Beispiel für die indirekte Konduktorinnendiagnostik gegeben: Die Mutter des untersuchten Patienten hat den Gendefekt von ihrem Großvater geerbt (für den eine HB in der Familienanamnese angegeben wurde) und ist als obligate Konduktorin zu betrachten. Das die Mutation tragende X-Chromosom hat sie an ihren Sohn vererbt. So findet sich bei dem Patienten der Haplotyp 2/2/2/1; dieser ist mit der Mutation gekoppelt. Die Schwester des Patienten hat von ihrem Vater das den Haplotyp 1/1/1/2 tragende X-Chromosom erhalten. Somit hat sie von ihrer Mutter das X-Chromosom mit dem Haplotyp 1/1/1/2 geerbt, welcher in dieser Familie nicht mit der Hämophilie gekoppelt ist. Sie kann deshalb mit einer Sicherheit von 99,98% als Konduktorin ausgeschlossen werden. Der Mutter des Patienten kann im Falle einer Schwangerschaft eine p.D. (Sicherheit 99,98%) angeboten werden, da sie für alle untersuchten Marker heterozygot ist.

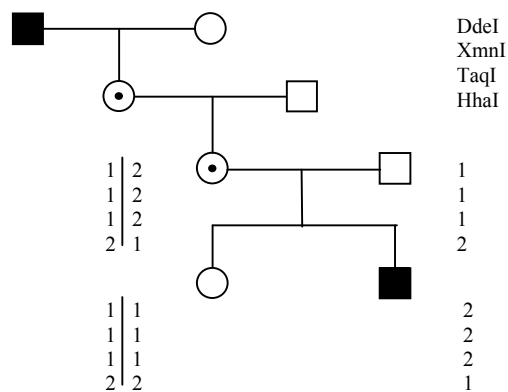


Abb. 3.2: RFLP-Analyse in der Risikofamilie F-HB-8: Die neben den Familienmitgliedern schematisch dargestellten X-Chromosomen zeigen den Genotyp der untersuchten diallelen Polymorphismen (DdeI, XmnI, TaqI und HhaI)

3.2.4 Einschränkungen der indirekten Diagnostik

3.2.4.1 Paternität

Ist die angegebene Paternität nicht korrekt, kann die indirekte Diagnostik eingeschränkt sein. In zwei Familien (R-HB-1, E-HB-9) ist nach RFLP-Analyse der angegebene Vater wahrscheinlich nicht der biologische Vater.

Am Beispiel der Familie R-HB-1 (s. Abb. 3.3, S. 32) wird dieses deutlich: Die Schwester des Patienten trägt homozygot das Allel 1 des Polymorphismus HhaI (Rote Zahlen). Ihr Vater weist das Allel 2 auf, so dass hier eine Vaterschaft unwahrscheinlich ist. Da die Mutter des Patienten aber heterozygot

ist und der Patient das Allel 1 hat, kann die Schwester trotzdem als Konduktorin identifiziert werden (Sicherheit 99%). In dieser Familie konnte bei Patient, Mutter und Schwester eine Mutation in Exon 6 nachgewiesen werden (s. Patient Nr. 856, Tabelle 7.4, S. 92ff.)

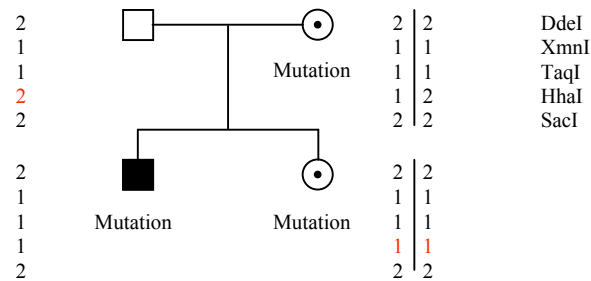


Abb. 3.3: Unwahrscheinliche Paternität bei Familie R-HB-1

3.2.4.2 Deletion

Eine Deletion im Bereich des FIX-Gens kann die indirekte Diagnostik beeinträchtigen. Am Beispiel der Familie Wü-HB-2 (s. Abb. 3.4) kann dieses veranschaulicht werden:

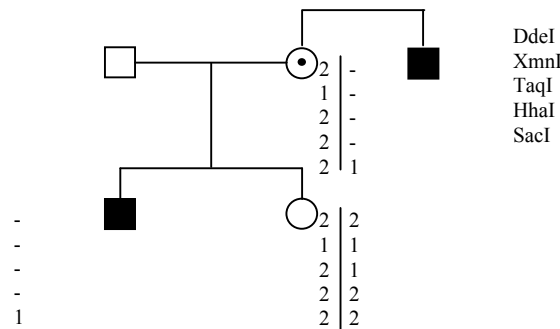


Abb. 3.4: Deletion: Stammbaum der Familie Wü-HB-2 (Ausschnitt). Bei dem Patienten findet sich eine Deletion des gesamten FIX-Gens

Die HB tritt familiär auf; der Patient trägt eine Deletion des gesamten FIX-Gens, die im Southern Blot (s. 3.3.1, S. 35ff.) nachgewiesen werden kann. Die Mutter ist anamnestisch eine obligate Konduktorin, sie sollte nur eine Kopie des Gens haben und ist deshalb wahrscheinlich hemizygot für die Marker DdeI, XmnI, TaqI und HhaI. Da die Deletion nicht den Locus DXS99 betrifft, findet sich bei ihr der Polymorphismus SacI heterozygot. Die Schwester des Patienten kann trotz der durch die Deletion bedingten Hemizygotie der Mutter als Konduktorin ausgeschlossen werden (Sicherheit 93-95%): Sie trägt im SacI-RFLP homozygot das Allel 2, hat also nicht das Allel 1 des Patienten geerbt; außerdem ist sie für den Polymorphismus TaqI heterozygot; es sind folglich zwei Kopien des Gens vorhanden.

Bei einer weiteren Familie (Bsw-HB-2) kann die Schwester eines Deletionspatienten über den extragenen, außerhalb der deletierten Bereiche liegenden Polymorphismus SacI als Konduktorin identifiziert werden. In den anderen Deletionsfamilien finden sich nur Mütter von Patienten, bei denen die RFLP-Analyse im Bereich der Deletion des Patienten scheinbar homozygote Ergebnisse erbringt (s. 1.1.1.1, S. 38).

3.2.4.3 Crossing over

In Familie D-HB-1 (s. Abb. 3.5) ist I-2 eine genealogisch sichere Konduktorin. Der mit der HB gekoppelte Haplotyp ist 2/1/1/2/2. Eine Tochter (II-2) hat von der Mutter den nicht mit der Hämophilie assoziierten Haplotyp 2/1/1/1/1 erhalten, und ist demnach mit einer Sicherheit von ca. 99% (aussagekräftige Marker: HhaI, SacI) als Konduktorin auszuschließen. Die andere Tochter (II-3) muss den Haplotyp 2/1/1/2/1 (pink markiert) von ihrer Mutter erhalten haben (dieses setzt voraus, dass beide Töchter denselben biologischen Vater haben). Dann ist eine Rekombination (pinkes Kreuz) während der mütterlichen Meiose im Bereich von mindestens DXS99 (Polymorphismus SacI) oder einer größeren Region des FIX-Gens (intragene Marker) wahrscheinlich. Unter der Annahme, dass eine Rekombination zwischen HhaI und SacI stattgefunden hat, ist nach Auswertung von HhaI (dieser Marker liegt dichter am Gen als SacI (s. Abb. 2.1, S. 19)) die Tochter mit hoher Wahrscheinlichkeit als Konduktorin zu betrachten.

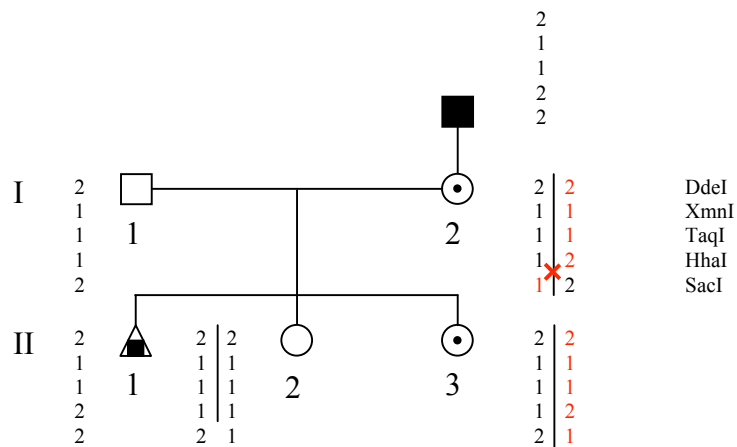


Abb. 3.5: Crossing over: Stammbaum Familie D-HB-1 (Ausschnitt)

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte nur dieses eine Rekombinationsereignis unter 101 informativen Meiosen beobachtet werden. Das entspricht einer Rekombinationsrate für den SacI-RFLP von 1 % (Rekombinationsereignisse/informative Meiosen).

3.3 Direkte Diagnostik

3.3.1 Southern Blotting

3.3.1.1 Größere Strukturgenaberrationen

Bei fünf unserer Patienten finden sich nach Southern Blotting Diagnostik größere Strukturgenaberrationen (s. Tabelle 3.6, S.38).

In Abb. 3.6 (S. 36) ist die Southern Blotting-Analyse bei Familie Del-HB-1 schematisch dargestellt. Nach Spaltung mit SacI bzw. EcoRI und Hybridisierung mit einer FIX cDNA fehlen die die Exons 6-8 repräsentierenden Banden von 6,8 (Exon 6) und 5,5 kb (Exons 7-8). Zusätzlich tritt eine aberrante Bande (junction fragment) mit einer Größe von ca. 7,5 kb auf. Außerdem lassen sich die Exons 7-8 der Patienten-DNA nicht amplifizieren, was auf eine Deletion in diesem Bereich hinweist. Bei der Mutter finden sich als Hinweise auf einen Konduktorinnenstatus dort schwächere Banden, wo die Banden des Patienten fehlen und zusätzlich das junction fragment. Der Patient weist somit eine Deletion im FIX-Gen mit vermutlichem Bruchpunkt im Bereich von Exon 6 auf, die wahrscheinlich auch bei der Mutter vorliegt. Da die Mutter für den Polymorphismus MnlI heterozygot ist, muss sich der Bruchpunkt distal dieses Restriktionsortes befinden. Bei einer pränatalen Diagnostik kann die Deletion bei männlichen Feten sicher nachgewiesen oder ausgeschlossen werden (Sicherheit 100%). Bei weiblichen Feten kann eine Konduktorin in dieser Familie relativ sicher mit Hilfe des junction Fragmentes diagnostiziert werden. Der mit der Hämophilie gekoppelte Polymorphismus „G“ des Markers MnlI führt unter der Voraussetzung, dass die Mutter Konduktorin ist, zu einer informativen indirekten pränatalen Diagnostik.

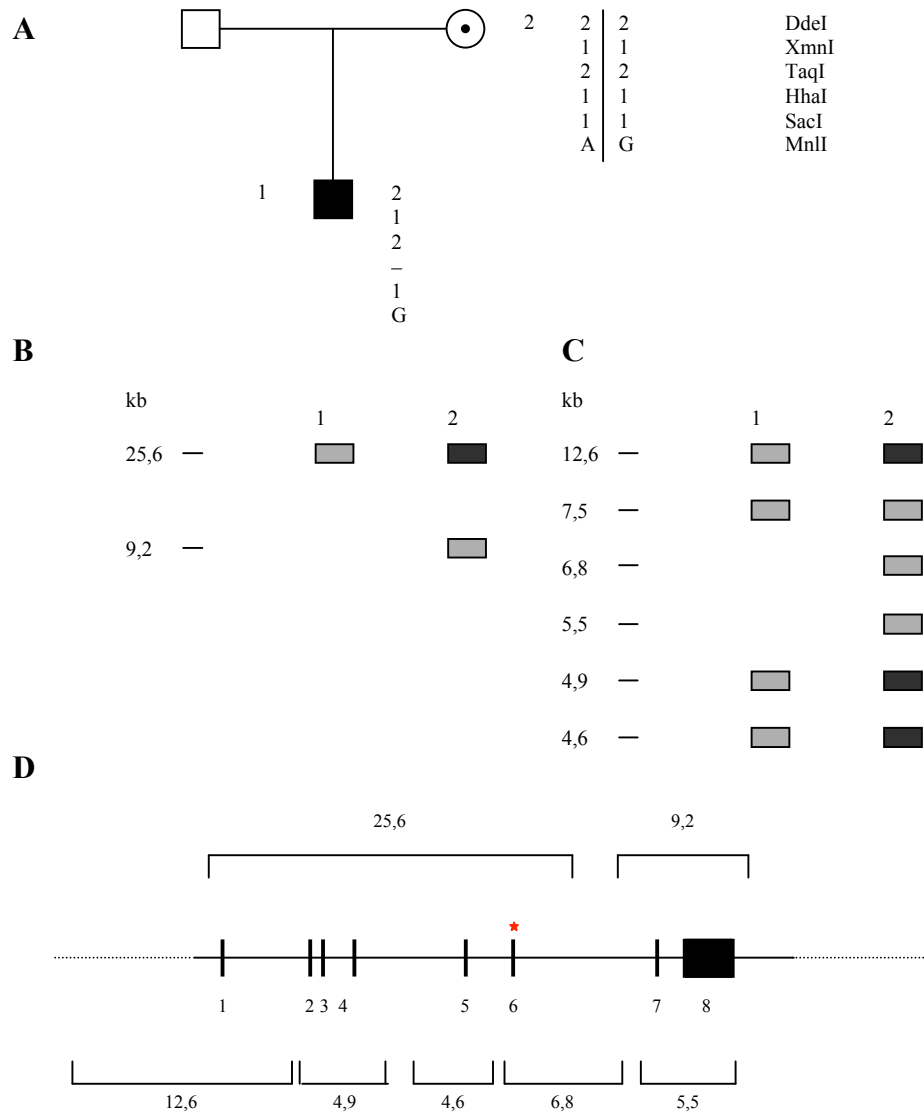


Abb. 3.6: Southern Blotting: **(A)** Bei Familie Del-HB-1 hat der Patient (1) eine sporadische HB. Die Mutter (2) ist nur für den Polymorphismus MnlI heterozygot. **(B)** Nach Spaltung mit SacI und Hybridisierung mit einer FIX cDNA fehlt bei dem Patienten die 9,2 kb Bande, welche die Exons 7-8 repräsentiert, bei der Mutter scheint diese Bande schwächer als die 25,6 kb Bande. Hier liegt die Deletion offenbar heterozygot vor. **(C)** Nach Spaltung mit EcoRI und Hybridisierung mit einer FIX cDNA tritt bei der Mutter (2) eine zusätzliche Bande (7,5 kb) auf, die auch bei dem Patienten (1) zu beobachten ist. Bei dem Patienten fehlen die das Exon 6 bzw. 7-8 repräsentierende Bande völlig. **(D)** FIX-Gen; die Exons 1-8 sind als vertikale Balken dargestellt. Oberhalb und unterhalb davon sind die Restriktionsfragmente nach Spaltung mit SacI (oben) bzw. EcoRI (unten) dargestellt, die Zahlen geben die ungefähre Länge in Kilobasenpaaren an. Der rote Stern bezeichnet die Lage des Polymorphismus MnlI. Distal davon liegt der vermutliche Bruchpunkt.

3.3.1.2 Punktmutationen/ kleine Deletionen

Bei Familie D-HB-5 weisen zwei Brüder eine schwere Hämophilie auf (s. Tabelle 3.6, S. 38). Nach Spaltung der Patienten-DNA mit SacI und Hybridisierung mit einer FIX cDNA, tritt eine aberrante Bande auf. Ursächlich für diese könnte eine Punktmutation sein, die zu einer zusätzlichen Spaltstelle für SacI in der 5'-Region des Gens führt, oder auch eine kleine Deletion. Die Mutation konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Dieses aberrante Fragment kosegregiert in der Familie mit der HB und kann daher als Marker genutzt werden. Es kann bei drei möglichen Konduktorinnen dieser Familie ein solches aberrantes Fragment nachgewiesen werden, somit sind sie als Konduktorinnen zu betrachten (Sicherheit 100%).

3.3.1.3 Konduktorinnen- und pränatale Diagnostik mit Southern Blotting

4 der 9 möglichen Konduktorinnen der oben beschriebenen Familien weisen eine verringerte Bandenintensität auf, was allein keine sichere Aussage bezüglich eines Konduktorinnenstatus erlaubt (s. Tabelle 3.6). Bei 4 möglichen Konduktorinnen findet sich eine auch beim Patienten nachweisbare aberrante Bande; diese ermöglicht eine sichere Aussage bei der Konduktorinnen- und der pränatalen Diagnostik. Eine mögliche Konduktorin (Wü-HB-2) kann ausgeschlossen werden, da sie im Bereich der Deletion des Patienten heterozygot für einen untersuchten Polymorphismus ist, also zwei intakte Kopien des Gens besitzen muss (s. Abb. 3.4, S. 33). Die im Vergleich zur Mutter (mit 99% Sicherheit identifizierte Konduktorin) beobachtete normale Bandenintensität spricht nur im Zusammenhang mit dem heterozygoten RFLP gegen einen Konduktorinnenstatus. Bei einer Mutter eines Patienten (Mün-HB-1) kann weder mit Southern Blot oder RFLP-Analyse eine Aussage zum Konduktorinnenstatus gemacht werden.

Tabelle 3.6: Southern Blotting bei fünf Familien mit Deletion und einer Familie mit Punktmutation zur Konduktorinnen- und pränatalen Diagnostik

Mutation (Familie)	Southern bei Mutter (m) und Schwester (s)	Konduktorinnenstatus/Sicherheit p.D.
Deletion Exon 2-8 (Bsw-HB-2) ^a	Signal schwächer (m,s)	Wahrscheinlich Konduktorinnen (m,s) p.D: RFLP-Analyse SacI (m), Deletionsausschluß (m,s)
Punktmutation (D-HB-5) ^a	aberrante Bande (m,s)	Sichere Konduktorinnen (m,s) p.D.: Ausschluss/Bestätigung (100%) (Nachweis aberrante Bande)
Deletion Exon 7-8 (Del-HB-1)	Signal schwächer zusätzliche Bande (m)	Sichere Konduktorin (aberrante Bande) p.D.: Ausschluss/Bestätigung (100%)
Deletion Exon 1-8 (Mün-HB-1) ^a	k.A.(m)	p.D.: Deletionsausschluß
Deletion Exon 1-5 (Wü-HB-1) ^a	aberrante Bande (m)	Sichere Konduktorin (aberrante Bande) ^b p.D.: Ausschluss/Bestätigung (100%)
Deletion Exon 1-8 (Wü-HB-2)	Signal schwächer(m) normales Signal (s)	Konduktorin (98%)(m); keine Konduktorin (99,98%) (s) p.D: RFLP-Analyse SacI, Deletionsausschluß (m)

^a Patient hat Hemmkörper

^b FIX:C-Wert von 60% ist als zusätzlicher Hinweis für Konduktorinnenstatus zu werten

3.3.2 Sequenzanalyse

3.3.2.1 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Eine Sequenzanalyse des FIX-Gens wurde bei 132 Indexfällen durchgeführt. Darunter finden sich 125 männliche Patienten sowie 9 Frauen, in deren Familien kein Patient untersucht werden konnte (s. Kapitel 3.7, S. 50). Von diesen 9 Frauen haben zwei so stark erniedrigte FIX:C-Werte, dass sie substituiert werden müssen und sie werden deshalb hier gesondert als weibliche Patienten aufgeführt.

Bei 109 der männlichen Indexpatienten läßt sich eine Mutation nachweisen. Außerdem lassen sich in 7 Fällen bei den untersuchten Frauen Mutationen nachweisen. Bei 16 der sicheren männlichen Patienten kann keine Mutation gefunden werden (15%).(s. Tabelle 3.7)

Tabelle 3.7: Direkte Diagnostik bei sicheren und möglichen Patienten und Konduktorinnen

Überwiesene Personen	Anzahl der Probanden	nachgewiesene Mutationen
Gesamt:	134	116
-männliche Patienten	125	109
-weibliche Patienten ^a	2	2
-mögliche oder obligate Konduktorinnen ^b	7	5

^a obligate Konduktorinnen die nach Blutgerinnungsdiagnostik FIX:C Werte von <1 bzw.2 aufwiesen substituiert werden müssen, keine männlicher Patient kann in diesen Familien untersucht werden

^b hier ist eine HB familiär bekannt, es kann aber kein Patient untersucht werden

Mittels Haplotypanalyse (s. 3.4, S. 44) kann ermittelt werden, ob gleiche Mutationen bei familienanamnestisch nicht verwandten Patienten unabhängig voneinander sind. Es können somit 105 der 116 nachgewiesenen Mutationen als unabhängig klassifiziert werden (91%).

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse hinsichtlich Art und Lokalisation der gefundenen Mutationen sind in den Tabellen 3.8 und 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der Mutationsanalyse – unabhängige Mutationen

	Anzahl	%
1. unabhängige Mutationen ^a	105	100
2. Doppelmutation ^b	1	1
3. Art der unabhängigen Mutation:		
Transition an CpG-Dinukleotid	25	24
Transition nicht an CpG-Dinukleotid	30	28
Transversion an CpG-Dinukleotid	2	2
Transversion nicht an CpG-Dinukleotid	36	34
kleine Deletion (<30 bp)	7	7
große Deletion (>30 bp)	5	5
4. Lokalisierung/Art:		
kodierende Sequenz	90	85
Missense	68	65
Nonsense	14	13
Deletion (<30 bp)	7	7
(frame shift)	(4)	(4)
(in frame)	(3)	(3)
Promotor	4	4
Spleißmutationen	6	6
acceptor	1	1
donor	3	3
kryptisch	2	2
große Deletionen (>30bp)	5	5

^a s. 3.4, S. 44

^b 17784, TGT→TTT(124, Cys→Phe); zweite Mutation stumm: 17782, TCC→TCT (123, Ser→Ser)

Tabelle 3.9: Verteilung der unabhängigen Mutationen in Bezug auf die Domänen des FIX-Moleküls (nicht berücksichtigt sind hier Spleißmutationen, Promotormutationen und große Deletionen)

Domäne	Kodon	Anzahl Mutationen
Signalpeptid	-46 bis -19	1
Propeptidregion	-18 bis -1	6
Gla-Domäne ^a	1 bis 46	11
EGF-1, EGF-2 ^b	EGF-1: 47 bis 84	2
	EGF-2: 85 bis 144	13
Aktivierungspeptid	145 bis 180	11
Katalytische Domäne	181 bis 415	51

^a γ -Carboxy-Glutaminsäure-Domäne

^b epidermal-growth-factor-like Domäne 1 und 2

3.3.2.2 Art der Mutationen

In Tabelle 7.4, S. 92 im Anhang findet sich eine Gesamtdarstellung der nachgewiesenen Mutationen.

Bei *Missense-Mutationen* kann neben der Aminosäuresequenz auch die Struktur des Proteins verändert werden. Mutationen, die die Aminosäure Cystein betreffen, können die für die Tertiärstruktur wichtigen 11 *Disulfidbrücken* des FIX-Proteins beeinträchtigen. Bei 12 Patienten (10 verschiedene Cysteinmoleküle, die an 7 Disulfidbrücken beteiligt sind) führt eine Mutation zum Austausch eines Cysteins. Die klinische Konsequenz ist in 7 Fällen eine schwere HB (Patienten-Nummer 3017, 2796, 8032, 8070, 2276, 965, 2248) und in einem Fall ein moderater Schweregrad (3282). Bei 4 Patienten liegt hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung keine Angabe vor (2518, 389, 8135, 8832).

Unter den hier untersuchten unabhängigen Patienten finden sich 14 Personen (Patienten-Nummer 3168, 9084, 2254, 8389, 8459, 8948, 3146, 9056, 8506, 8471, 3549, 8472, 3299, 8712) die an 11 unterschiedlichen Lokalisationen des FIX-Gens eine *Nonsense-Mutation* aufweisen. Bei einer solchen wird durch die Substitution einer Aminosäure ein Stop-Kodon gebildet, und somit wird i.R. kein funktionelles Genprodukt kodiert. Klinisch weisen 8 der Patienten eine schwere Hämophilie auf (3168, 2254, 8459, 8948, 3146, 8506, 3549, 3299) von diesen bilden 2 Hemmkörper (3168, 3146) und einer (3146) zeigt zusätzlich allergische Reaktionen auf die Gabe von Gerinnungspräparaten. Zwei Patienten (8389, 8472) haben eine moderate HB und bei den Übrigen findet sich keine Angabe zur Verlaufsform.

Von Spleißmutationen spricht man, wenn sich Fehler in den Exon-Intron-Übergangssequenzen finden. Durch eine Mutation kann das Herausschneiden des Introns beeinträchtigt werden. Drei Patienten haben eine *Donorspleißmutation*. Bei einem Patienten findet sich diese in Intron 1 (Patient-Nummer 3691), bei einem Patienten mit moderater HB in Intron 5 (8743) und bei einem Patienten mit schwerer HB in Intron 6 (2352). Ein Patient mit schwerer HB weist eine *Akzeptorspleißmutation* im Intron 5 auf (2489). Bei zwei unabhängigen Patienten (3590, 8650) wird die Aktivierung

einer kryptischen Spleißstelle vermutet. Bei einem dieser Patienten (3590) findet sich eine Angabe zu einer moderaten Verlaufsform der Erkrankung.

Vier Patienten haben Mutationen im Bereich des *Promotors*. Der Promotor ist ein Abschnitt der DNA, der den Beginn der Transkription steuert. Eine (Patient-Nummer 3792) betrifft HNF-4 („hepatic nuclear factor 4“ (Nukleotidposition -36 bis -27) und drei (8945, 9069, 3587) C/EBP („CCAAT/enhancer binding protein“ (Nukleotidposition +1 bis +18) [Picketts et al. 1994]. Mutationen im Bereich -23 bis 13 führen zum sog. Phänotyp „Leyden“ der HB. Bei zwei Patienten (3792, 3587) liegen Angaben zu steigenden FIX-Werten vor. Ein Patient (9069) befindet sich noch im Kindesalter, so dass eine Steigerung des bisher niedrigen Wertes noch zu erwarten ist.

Kleine Deletionen können zur Verschiebung des Leserasters führen, wenn nur Teile eines Kodons fehlen. Kleine „*In frame*“-*Deletionen* (<30 bp) ohne Verschiebung des Leserasters führen bei einem Patienten (Patient-Nummer 2705) zum Fehlen von zwei Kodons im Exon 2 (del6420-25); bei zwei unabhängigen Patienten (2244, 2260) fehlt ein Kodon im Exon 8 (del30839-41). Diese Patienten haben klinisch eine schwere HB.

Zu einer „*frame-shift*“-Mutation kommt es bei drei Patienten durch die Deletion eines Nukleotids (Exon 2/del6370 bei Patient mit Nummer 2269 und Exon 8/del30986 bei den unabhängigen Patienten 2266 und 8839). Bei einem Patienten (8511) fehlen zwei Nukleotide (Exon 8/del31196-7). Alle drei Patienten mit kleine „*frame-shift*“ Deletionen (<30 bp) haben klinisch eine schwere Ausprägung der Hämophilie.

Fünf Patienten (Patienten-Nummer 3206, 8982, 3821, 3667, 8998) weisen *größere Deletionen* auf, die genauen Bruchpunkte sind bisher nicht ermittelt (s. Tabelle 3.6, S. 38). Alle Patienten haben eine schwere Hämophilie, drei bilden Hemmkörper (8982, 3821, 3667).

3.3.2.3 Transitionen an CpG-Dinukleotiden: Mutations- „hotspots“

Das Dinukleotid CpG gilt als Transitions-hotspot. Man nimmt an, dass bei einer Methylierung des Cytosins 5' zum Guanin eine spontane Desaminierung des Methyl-Cytosins zum Thymin erfolgt. Abhängig davon, ob diese Veränderung im sense- oder antisense-Strang erfolgt, kommt es zu C→T bzw. G→A Transitionen.

In unserem Datenmaterial finden sich 25 unabhängige Transitionen an 18 CpG-Dinukleotiden im FIX-Gen. (Insgesamt sind 20 CpG-Dinukleotide bekannt, aber nur bei 18 wurde bisher eine HB beobachtet.) Daraus errechnet sich (nach Bottema et al. 1993) ein 20-fach gesteigertes Auftreten von Transitionen an CpG-Dinukleotiden gegenüber nicht-CpG Dinukleotiden.

3.3.2.4 Mutationsanalyse zur Konduktorinnendiagnostik

In den Familien, wo bei dem Patienten eine Mutation bekannt ist, kann bei allen 94 untersuchten möglichen Überträgerinnen ein sicherer Konduktorinnenstatus bestimmt werden. Keine sichere Aussage kann bei 2 möglichen Konduktorinnen getroffen werden, weil innerhalb dieser Familien kein Patient zur Untersuchung zur Verfügung steht (3.7, S. 50). Bei weiteren 35 möglichen Konduktorinnen aus Familien in denen bei dem Patienten keine Mutation bei der Sequenzanalyse identifiziert werden kann, ist eine Mutationsanalyse nicht sinnvoll (s. 3.3.2.1, S. 39 ff.).

3.3.2.5 Vorselektion durch Heteroduplex

Die Heteroduplexanalyse wird zum Vorscreening genutzt um eine schnelle genomische Diagnostik in HB-Familien durchzuführen. Diese kann ausgelassen werden, wenn direkt eine Sequenzierung erfolgt. Zur Konduktorinnendiagnostik eignet sich die Methode zur Absicherung der Ergebnisse aus der Sequenzierung, da das heterozygote Vorliegen der Mutation bei Konduktorinnen teilweise schwieriger in der Sequenzierung auszuwerten ist.

In den Fällen wo bei Patienten sowohl eine Heteroduplexanalyse als auch eine Sequenzierung erfolgen, können die Exonbereiche, die eine HB Mutation enthalten, zunächst über die Heteroduplexmethode erfaßt werden (s. Tabelle 3.10).

Bei allen untersuchten Patienten mit einer durch Sequenzierung charakterisierten Mutation im Bereich der Exons 2,4,5,6 und 7, ist auch ein Heteroduplex nachweisbar. Patienten mit einer Mutation im Bereich der Exons 1 und 8 weisen nur teilweise auch Heteroduplexe in diesen Regionen auf.

Tabelle 3.10: Heteroduplexanalyse zur Konduktorinnendiagnostik bei Frauen in deren Familie bei dem Patienten eine Mutation nachgewiesen wurde

Patient	Konduktorin ^a			Nicht-Konduktorin ^a	
	Mutation in Exon	Heteroduplex (Ja/ Nein)	Heteroduplex (Ja/ Nein)	Mutationsnachweis durch Sequenzierung	Heteroduplex (Ja/ Nein)
1	J:2(67%) N:1(33%)	J:4 N:1	4 1	- -	- -
2	J:10	J:10	10	N:2	2
3	-	-	-	-	-
4	J:1	-	-	N:2	2
5	J:9	J:7	3	N:6	5
6	J:4	J:8	7	N:5	3
7	J:1	-	-	-	-
8	J:11(55%) N:9(44%)	J:14 N:3	14 3	N:1 N:8	1 4

^a Konduktorinnenstatus durch indirekte Diagnostik oder Sequenzierung bestimmt

Kann bei einem Patienten im mutierten Exon ein Heteroduplex nachgewiesen werden, so findet sich auch bei einer Konduktorin dieser Familie ein Heteroduplex.

Kann bei einem durch Sequenzanalyse gesicherten Patienten kein Heteroduplex nachgewiesen werden, so weist auch keine (durch indirekte Diagnostik oder Sequenzanalyse diagnostizierte) Konduktorin einen solchen auf.

Bei keiner der durch RFLP oder Sequenzierung als Konduktorin ausgeschlossenen Frauen kann ein Heteroduplex nachgewiesen werden.

3.4 Unabhängige Mutationen

Die gleiche Mutation kann an bestimmten Genorten bei familienanamnestisch nicht verwandten Patienten beobachtet werden (s. Tabelle 7.2 im Anhang). Diese Wiederholungen können durch unabhängige Mutationsereignisse entstehen oder sie weisen auf einen gemeinsamen Verwandten dieser Patienten hin. Um erkennen zu können ob ein solcher Gründereffekt zum häufigeren

Auftreten wiederholt beobachteter Mutationen beigetragen hat, wurde bei 56 familienanamnestisch nicht verwandten Hämophilen eine Haplotypanalyse durchgeführt.

Um eine Mutation als unabhängig zu klassifizieren, muss mindestens eines der folgenden Kriterien zutreffen: 1) Eine Neumutation kann nachgewiesen werden (s. 3.5, S. 46ff.). 2) Der Haplotyp ist verschieden. 3) Die Familie hat eine andere ethnische Zugehörigkeit als die deutsche. 4) Bei ungenügenden Angaben (weniger als vier analysierte Polymorphismen) und schwer bis moderatem Phänotyp wird die Mutation als unabhängig eingestuft. (Nach Knobloch und Ludwig 1998)

Wie aus Tabelle 7.2 S. 90 ersichtlich, finden sich insgesamt 20 Genlokalisationen, an denen mehr als ein Patient mit einer Mutation bekannt ist.

33 der Patienten haben, verglichen mit anderen Patienten mit der gleichen Mutation, einen verschiedenen Haplotyp, welches für die Unabhängigkeit der Mutationen spricht. Die Stopmutation Arg29Stop findet sich bei 2 Patienten. Einer dieser Patienten (Nr. 9048) hat nach Stammbaumanalyse (s. 3.5, S. 46 f.) wahrscheinlich eine de novo Mutation, was, ebenso wie der vom anderen Patienten verschiedene Haplotyp, auf eine Unabhängigkeit der Mutation hindeutet.

Bei 8 Patienten stimmt der Haplotyp mit dem der/des anderen Patienten mit dergleichen Mutation überein; diese Mutationen werden als nicht voneinander unabhängig gewertet.

An Lokalisation Thr296Met haben 4 Patienten dergleichen Haplotyp, nur ein Patient hat einen abweichenden Haplotyp. Dahingegen erfolgte bei 3 Patienten mit leichter HB mit dieser Mutation keine Haplotypisierung; diese werden nach Knobloch und Ludwig [1998] als nicht unabhängig definiert.

Zwei Patienten (Nr. 9227, 8720) haben eine andere ethnische Zugehörigkeit, so dass sie als unabhängig klassifiziert werden können.

Bei 9 Patienten ist die Haplotypisierung unzureichend, da aber ein moderat bis schwerer Phänotyp vorliegt, werden sie als unabhängig klassifiziert (s.o.).

Obwohl ein gemeinsamer Vorfahre nicht in allen Wiederholungen ausgeschlossen werden kann, so kann doch der Großteil 45/56 (80%) der beobachteten identischen Mutationen als unabhängig betrachtet werden.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die gleiche Mutation und zufällig der gleiche Haplotyp ohne Verwandtschaft zusammentreffen, lässt sich am Beispiel der Mutation 296, Thr→Met folgendermaßen errechnen: Der bei 4 dieser Patienten vorhandene Haplotyp (TaqI-1/XmnI-1/DdeI-2/HhaI-1) hat in der untersuchten Population eine Frequenz von 20% (s.3.2.2, S. 27). Die Wahrscheinlichkeit, dass einer dieser Patienten nicht mit den drei anderen verwandt ist, beträgt 0,5% (Rechnung: $4 \times (0,20^4) \times (0,80)^1 = 0,005$) [nach Ketterling et al. 1991a].

3.5 Neumutationen

3.5.1 Nachweis von Neumutationen

Bei 7 Familien der 37 sporadischen HB-Patienten ist eine Aussage zum wahrscheinlichen Mutationsursprung möglich. (s. Tabelle 7.3 im Anhang).

Bei 2 Familien (B-HB-6 (s. Abb. 3.7), Nbg-HB-1) finden sich vermutliche Neumutationen in der mütterlichen Keimbahn (wahre de novo Mutationen).

Der Patient in Familie B-HB-6 hat eine Mutation, die sich bei Mutter und Schwester nicht nachweisen lässt. Da ein mütterliches Mosaik nicht ausgeschlossen werden kann, besteht für weitere Kinder dennoch ein Risiko die Mutation zu erben.

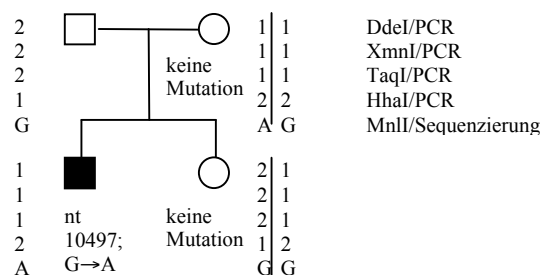


Abb. 3.7: Stammbaum der Familie B-HB-6, bei der eine Neumutation in der Keimbahn der Mutter neu auftrat.

Bei 2 Familien (K-HB-1 (s. Abb. 3.8, S. 48) und F-HB-1) entstand die Mutation wahrscheinlich in der Keimbahn des Großvaters.

Bei Familie K-HB-1 kann eine Mutation bei Patient (2705) und Mutter (2704) nachgewiesen werden. Mit Hilfe der indirekten Diagnostik kann die Kopplung

der Mutation mit den Allelen „1“ aller untersuchten RFLPs festgestellt werden. Dieser Haplotyp tritt auch bei dem gesunden Großvater mütterlicherseits (2708) auf. Die Mutation entstand wahrscheinlich während der großväterlichen Spermatogenese. Vorausgesetzt, dass dieser kein Mosaik ist, hat seine andere Tochter (2706) kein Risiko, die Mutation geerbt zu haben. Bei der Sequenzierung kann keine Mutation bei ihr festgestellt werden.

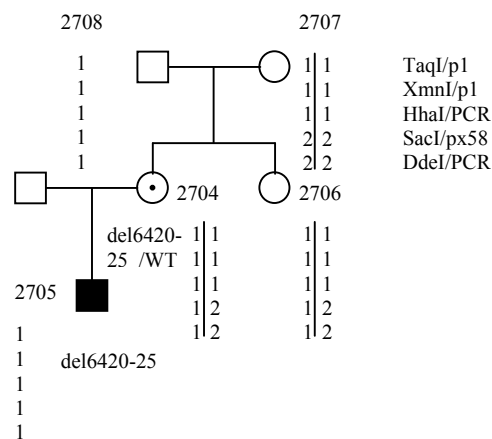


Abb. 3.8: Stammbaum der Familie K-HB-1: Der Ursprung der Neumutation liegt in der Keimbahn des Großvaters mütterlicherseits

Bei Familie D-HB-4 (s. Abb. 3.9, S. 48) kann die Mutation bei Patient und Mutter nachgewiesen werden. Die Großmutter mütterlicherseits kann nach Heteroduplexanalyse als Konduktorin ausgeschlossen werden. Der Patient trägt Polymorphismus „1“ des Markers HhaI, der auch bei seiner Großmutter nachweisbar ist. Somit entstand die Mutation wahrscheinlich in ihrer Keimbahn; das Risiko für eventuell vorhandene weitere Töchter Konduktorin zu sein, entspricht der Wahrscheinlichkeit eines Mosaiks bei der Großmutter. Bei einer durchgeführten pränatalen Diagnostik, fand sich bei dem weiblichen Feten der mit der Hämophilie assoziierte Haplotyp. Durch Sequenzierung konnte die Mutation nachgewiesen und damit auch die indirekte Diagnostik bestätigt werden.

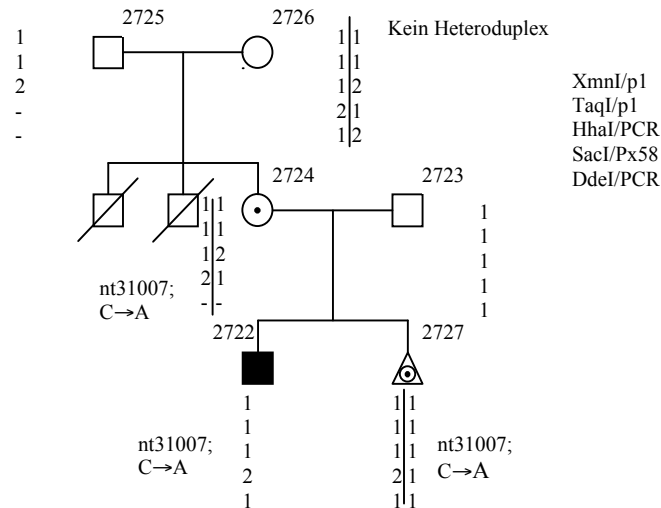


Abb. 3.8: Bei Familie D-HB-4 findet sich eine Neumutation, die in der Keimbahn der Großmutter mütterlicherseits auftrat.

Bei Familie B-HB-4 findet sich bei der Mutter eine Mutation, bei der Großmutter dagegen nicht. Da hier der Haplotyp des anamnestisch gesunden Großvaters nicht untersucht werden kann, ist nur eine Aussage auf die wahrscheinliche Entstehung der Neumutation in der Keimbahn einer der Großeltern möglich. Bei einer weiteren Familie (M-HB-1) konnte bei dem Patienten bisher keine Mutation durch Sequenzierung nachgewiesen werden. Der Patient trägt den Haplotyp seines gesunden Großvaters. Hier entstand die Neumutation mit hoher Wahrscheinlichkeit entweder in der Keimbahn des Großvaters oder in der der Mutter.

Das Alter bei Konzeption des die Mutation tragenden Kindes war bei keinem der Mütter oder Großeltern größer als 30 Jahre (19-29 Jahre).

3.5.2 Risiko für Mütter sporadischer Fälle

In 15 Familien mit sporadischer HB kann bei dem Patienten und bei seiner Mutter eine Mutation nachgewiesen werden. Bei 2 Familien kann bei der Mutter keine Mutation charakterisiert werden (s. Tabelle 7.3 im Anhang). Das errechnete Risiko aus diesen Daten beträgt 88% (15/17) für die Mutter eines sporadischen Patienten selbst Konduktorin zu sein.

3.6 HB-Konduktorinnen mit klinischer Symptomatologie

Drei der hier untersuchten obligaten Konduktorinnen weisen nach Angabe des überweisenden Arztes so stark erniedrigte FIX:C-Werte auf, dass sie zeitweise substituiert werden müssen. In einer Familie handelt es sich um monozygote Zwillinge, die klinisch (nach Angaben des behandelnden Arztes) durch eine verlängerte aPTT nach Blutentnahmen und durch Hämatome nach i.m. Injektionen auffielen. Die FIX:C-Werte betragen 1-2% bzw. 2-4%. Ihr verstorbener Vater hatte eine schwere HB, die Mutter hat normale Blutgerinnungswerte. Bei der RFLP-Analyse sind beide für die Polymorphismen TaqI und XmnI heterozygot, woraus gefolgert werden kann, dass ein väterliches Allel präsent ist und eine uniparentale Disomie des defekten väterlichen X-Chromosoms ausgeschlossen werden kann. Im Bereich des Exons 8 findet sich bei den Zwillingen ein Heteroduplex, welcher durch eine bei der Sequenzierung nachgewiesene Mutation bestätigt wird. Es kann keine zweite Mutation im FIX-Gen gefunden werden, auch die Mutter weist keine Mutation auf. Somit kann eine Compound Heterozygotie für die HB ausgeschlossen werden. Eine ungleiche X-Inaktivierung kann durch Methylierungs-Analyse nachgewiesen werden. Die Methylierungs-Analysen des Lokus DXS255 ergeben für die Patientinnen die vornehmliche Aktivierung des väterlichen X-Chromosoms in den somatischen Zellen. Eine extreme Lyonisierung ist wahrscheinlich für die phänotypische Expression der HB verantwortlich. Die Ursache für die ungleiche Inaktivierung ist nicht bekannt. [Schröder et al. 1997]

Die dritte Patientin hat FIX:C-Werte von <1%. Eine HB ist in der Familie nicht bekannt. Die RFLP-Analyse ergibt einen heterozygoten Polymorphismus XmnI. Im Southern blot findet man nach Restriktion mit Sac I und Hybridisierung mit einer FIX cDNA-Sonde anstelle des normalen Fragmentes für die Exons A-F ein kürzeres junction Fragment. Zytogenetisch kann bei der Patientin eine de novo eine Translokation 46,X,t(X;15) mit einem Bruchpunkt im Bereich des FIX-Gens nachgewiesen werden. Untersuchungen des Methylierungsstatus zeigen, dass praktisch nur das aberrante X-Chromosome mit dem defektem FIX-Gen aktiv ist. [Schröder et al. 1993].

3.7 Mutationsnachweis bei obligaten/möglichen

Konduktorinnen mit familiärer HB in deren Familien kein Patient untersucht werden konnte

In 12 Fällen suchten Frauen eine Konduktorinnen und/oder eine pränatale Diagnostik, in deren Familien mit anamnestisch gesicherter HB der Patient nicht in die Untersuchung einbezogen werden konnte (s. Tabelle 3.12). In 6 Familien ist der Patient verstorben. Im Fall einer anamnestisch obligaten Konduktorin (9058), gibt die Ratsuchende an, dass kein Kontakt zum Patienten bestehe. Mit Hilfe der Datenbank, in die im Rahmen dieser Arbeit erfassten Daten eingegeben wurden, konnte festgestellt werden, dass dieser Patient bekannt ist.

Tabelle 3.12: 12 mögliche und sichere Konduktorinnen aus 9 Familien, in denen eine HB bekannt ist, der Patient aber zu einer Untersuchung nicht zur Verfügung steht (inkl. der drei weiblichen Patienten). Soweit vorhanden, Angabe des FIX:C-Wertes.

PIN	Konduktorinnenstatus (FIX:C)	Diagnostik		Diagnose
		RFLP	direkt	
3452	Möglich ^a (100%)	-	Keine Mutation	keine sichere Aussage möglich ^b
9058	Obligat ^c	informativ ^e	Mutation	(obligate Konduktorin)
9063	Möglich (56%)	-	Mutation	Konduktorin
3590	Obligat ^a	informativ ^d	Mutation	(obligate Konduktorin)
2552	Obligat ^a	informativ ^d	Mutation, Heterod.	(obligate Konduktorin)
2513	Möglich ^a	informativ	Mutation, Heterod.	Konduktorin
2514	Möglich ^a (Ho-HB-1)	informativ	Kein Heteroduplex	keine Konduktorin
9112	Möglich ^a	-	Keine Mutation	keine sichere Aussage möglich ^b
8832	Möglich ^a	-	Mutation	Konduktorin
3691	Obligat (<1%)	-	Mutation	(obligate Konduktorin)
2796	Obligat ^a (1-5%)	-	Mutation	(obligate Konduktorin)
2798	Obligat ^a (1-2%) (J-HB-1)	-	Mutation	(obligate Konduktorin)

^a Patient verstorben

^b Restrisiko durch Nichterkennung der Mutation durch direkte Diagnostik

^c kein Kontakt zu Patient. Mit Hilfe der Datenbank konnte im Nachhinein festgestellt werden, daß eine Mutation beim Patienten bereits bekannt war. Somit ist auch die indirekte Diagnostik informativ bei einer p.D.

^d durch Untersuchung der Mutter Ableitung des Haplotyps des verstorbenen Vaters

^e da bei der obligaten Konduktorin eine Mutation nachgewiesen werden kann, sind die RFLP der möglichen Konduktorinnen informativ für eine p.D.

Durch eine Stammbaum-Analyse können 6 der Ratsuchenden als mögliche und 6 als obligate Konduktorinnen klassifiziert werden.

Als Überträgerinnen diagnostiziert oder ausgeschlossen werden können 4 der 6 möglichen Konduktorinnen. Bei 2 dieser Frauen findet sich bei der Sequenzierung keine Mutation. Da bei Heterozygoten etwa 10% der Mutationen durch Sequenzierung nicht sicher nachgewiesen werden können (s. 3.3.2.1, S. 39ff.), kann der Konduktorinnenausschluss nicht sicher erfolgen.

Alle obligaten und diagnostizierten Konduktorinnen sind für eine p.D. informativ.

3.8 Pränatale Diagnostik

3.8.1 Angebot einer pränatalen Diagnostik

Von 118 Überträgerinnen (81 mittels indirekter oder direkter Diagnostik identifizierte mögliche Konduktorinnen und 37 obligate Konduktorinnen) befinden sich 78 im bzw. vor dem reproduktiven Alter (zum Zeitpunkt der Auswertung <40 Jahre). Diesen kann eine p.D. auf der Basis der Sequenzanalyse, durch Nachweis von Deletionen/aberranten Banden im Southern Blotting oder der RFLP-Analyse angeboten werden.

Tabelle 3.13: *Informative p.D. bei 78 Konduktorinnen vor oder im gebärfähigen Alter*

Diagnostik (Sicherheit der Aussage)	Anzahl informative Konduktorinnen für p.D. (%)
Sequenzierung/Heteroduplex (100%)	56 (72)
Nachweis aberrante Bande (100%)	3 (4)
Nachweis Deletion (100%)	4 (5)
nur RFLP (93-99,98%)	13 (17)
keine Diagnostik informativ	2 (2)

Auf dieser diagnostischen Basis kann 76 der 78 Konduktorinnen eine p.D. angeboten werden (97%). (s. Tabelle 3.13)

Zwei Frauen sind weder informativ für eine RFLP-Diagnostik (alle untersuchten Marker liegen homozygot vor) noch kann eine Mutation in dieser Familie bei der Sequenzierung nachgewiesen werden. Hier kann zum Zeitpunkt des Abschlusses der Arbeit eine p.D. nur über Geschlechtsbestimmung und (bei männlichen Feten) fetale Blutgerinnungsdiagnostik angeboten werden.

3.8.2 Durchgeführte pränatale Diagnosen

Im Untersuchungszeitraum wurde bei 10 Konduktorinnen eine pränatale Diagnose durchgeführt (s. Tabelle 3.14.). Nur in einem Fall wurde die Diagnostik auf RFLP-Basis durchgeführt (Aussagesicherheit ca. 99%), in allen anderen Fällen konnte eine Diagnostik mit Sequenzanalyse bzw. Deletionsnachweis/Ausschluss angeboten werden (Aussagesicherheit nahezu 100%). Insgesamt wurden zwei weibliche und 9 männliche Feten diagnostiziert, davon ein Zwillingpaar. Bei zwei männlichen Feten konnte eine Mutation im FIX-Gen nachgewiesen werden. Von den 2 diagnostizierten weiblichen Feten, ist einer nach dem Ergebnis der Sequenzanalyse eine Konduktorin, bei dem anderen Feten wurde nach Geschlechtsbestimmung auf eine weitere Diagnostik verzichtet.

Bei einer Familie konnte der Patient nicht in die Untersuchung einbezogen werden. Hier konnte weder in der DNA der Mutter noch in der fetalen DNA eine Mutation nachgewiesen werden. Die Hämophilie B kann hier nur mit einem Restrisiko von ca. 10% ausgeschlossen werden, da in ca. 10% aller Patienten mit unserer Methode die der Hämophilie zugrunde liegende Mutation nicht nachweisbar ist (s. 3.3.2.1, S. 39ff). (Die Höhe des Risikos bezieht sich auf die Sicherheit der Methode zum Zeitpunkt der Untersuchung.)

Tabelle 3.14: Durchgeführte p.D.; Angabe des Materials, der Informativität der Mutter für direkte und/oder indirekte Diagnostik und deren maximale Sicherheit sowie der Diagnose

Familie	Material (SSW) ^a	Informativ indirekt/direkt (maximale Sicherheit in %)	Diagnose (Geschlecht)
B-HB-3	A	Indirekt/direkt(100)	Gesund(m)
B-HB-8	A(17)	Indirekt/direkt(100)	Gesunde Zwillinge(m)
Bsw-HB-2	C(12)	Direkt(100)	Gesund(m)
D-HB-1	C	Indirekt(99,989)	Krank(m)
D-HB-4	C(11)	Direkte(100)	Konduktorin(w)
Del-HB-1	A	(direkt) ^b nach Geschlechtsbestimmung weiblich	(w) auf Konduktorinnen-diagnostik verzichtet
Han-HB-1	C	Indirekt/direkt(100)	Gesund(m)
J-HB-1	C	Direkt(100)	Gesund(m)
Me-HB-1	A(16)	Direkt(90) ^c	Gesund(m)
R-HB-5	C	Indirekt/direkt(100)	Krank(m)

^a Biopsie von A=Amnionflüssigkeit oder C=Chorionzotten; in Klammern: SSW=Schwangerschaftswoche der Entnahme

^b da die beim Patienten vorliegende Deletion schwer bei Mutter und weiblichen Feten nachweisbar ist, wäre nur bei männlichen Feten eine sichere Aussage in Bezug auf die Diagnose zu treffen

^c Patient stand zu einer Untersuchung nicht zur Verfügung; bei der Mutter kann keine Mutation nachgewiesen werden; trotz fehlendem Mutationsnachweis bei dem Feten besteht Restrisiko von ca. 10% (Sicherheit der Methode zum Zeitpunkt der Untersuchung)

4 Diskussion

4.1 Analyse der zur Untersuchung vorliegenden Familien

Im Untersuchungszeitraum 1988 bis September 1999 wurden 125 Indexpatienten mit HB an das Humangenetische Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität überwiesen (s. Tabelle 3.1, S. 24). Seit der Realisierung eines sog. „Nationalen Programms zur genomischen Diagnostik der Hämophilie A und B“ in der DDR 1989, konnte bei einem Großteil der Patienten und ihren Familien aus den neuen Bundesländern eine genomische Diagnostik durchgeführt werden. Seit 1990 werden auch zunehmend Familien aus den alten Bundesländern überwiesen [Herrmann et al. 1994; Wehnert 1990].

Der klinische Schweregrad der HB der bei uns erfassten Patienten verteilte sich folgendermaßen: schwer 48% / moderat 30% / leicht 20% (s. Tabelle 3.2, S. 25). Die aus epidemiologischen Untersuchungen gewonnene Verteilung wich hier v.a. bei leichter Hämophilie ab: schwer 42-45% / moderat 25-26% / leicht 29-33% [Soucie et al. 1998; Eyster et al. 1980]. Bei einer leichten Hämophilie B besteht keine Indikation für eine p.D, so dass eine Familienberatung weniger häufig in Anspruch genommen wird [Saad et al. 1994]. Außerdem stellten Soucie et al. 1998 fest, dass 53% der Patienten mit leichter Hämophilie über viele Jahre keinen ärztlichen Kontakt hatten, so dass sie seltener in Studien aufgenommen werden konnten.

Bei 46 der uns überwiesenen 125 Patienten liegen Angaben zur Familienanamnese von den überweisenden Zentren vor. In den Familien von 17 (37%) der 46 Patienten ist die HB bekannt. Bei 29 Familien (63%) trat die Hämophilie erstmals auf. Der bei uns gefundene Wert von 63% der Familien mit einer erstmalig beschriebenen Mutation liegt relativ hoch im Vergleich zu Literaturdaten. Die Rate von Neumutationen in der Population bei X-chromosomalen Erkrankungen wird auf 30% geschätzt [Haldane 1935]), bei

anderen Autoren wird ein Wert von ca. 50% für das erstmalige Auftreten einer HB angegeben [Montandon et al. 1992; Saad et al. 1994].

Eine Ursache für den relativ hohen Anteil an Familien mit erstmalig beschriebener HB ist wahrscheinlich in den für einen großen Teil (63%) unserer Familien fehlenden Daten zur Familienanamnese zu suchen, zum anderen können durch die geringe Nachkommenzahl moderner westeuropäischer Familien Konduktorinnen für einige Generationen unbemerkt bleiben, ein Patient tritt u.U. erst Generationen nach der Mutationsentstehung auf [Saad et al. 1994].

4.2 Indirekte genomische Diagnostik

4.2.1 Informativität der untersuchten RFLP/Heterozygotenrate

Die von uns für die Diagnostik genutzten RFLP stellen Variationen der Sequenz ohne pathologische Signifikanz dar, die zur Entstehung oder Zerstörung einer enzymatischen Schnittstelle führen. Bei der Segregationsanalyse zur Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen kann die enge Kopplung eines Polymorphismus mit der zur Krankheit führenden Mutation als indirekter Marker genutzt werden [Bowen 2002; Goodeve 1998a]. Die diagnostische Sicherheit ist dabei abhängig von der Distanz zwischen Mutationsort und Polymorphismus. Geht man von einer intragenen Rekombinationsfrequenz von 0,01 je 1000kb aus, lässt sich bei der ca. 33,5 kb betragenden Größe des FIX-Gens eine diagnostische Präzision von 99,98% für intragene Marker errechnen. Die Polymorphismen für die extragenen Marker HhaI und SacI liegen in größerem Abstand zur Mutation, so dass durch häufiger mögliche Rekombinationsereignisse die Sicherheit geringer ist. Bei HhaI (Position: ca. 8kb 3' vom FIX-Gen) beträgt die Sicherheit ca. 99% und bei SacI (DXS99) 93-95% [Wehnert 1990].

Die Informationen über eine Kopplung eines charakterisierten Polymorphismus mit dem FIX-Defekt können in der Regel nur erhalten werden, wenn der Patient selber untersucht werden kann. In seltenen Fällen kann die Kopplung auch über eine Segregationsanalyse anderer Familienmitglieder abgeleitet werden. Eine Information über die Weitergabe des mit der Mutation gekoppelten Allels bei Frauen kann nur erhalten werden, wenn die zwei

verschiedenen Allele des Markers vorliegen (Heterozygotie). Daher korreliert die zu erwartende Informativität eines Markers stark mit seiner Heterozygotenfrequenz in einer Population. [Wehnert 1990]

Die für die HB verantwortliche Mutation kann mit jedem der Allele eines Markers gekoppelt sein. Entsprechend muss für jede Familie die Kopplung neu ermittelt werden.

Die Allelfrequenzen von 6 polymorphen Restriktionsorten im Bereich des FIX-Lokus wurden bestimmt (s. Tabelle 3.3, S. 26). Bei allen Markern, außer SacI, konnten Frequenzunterschiede der Allele festgestellt werden. Diese können darauf beruhen, dass seit der Entstehung des Polymorphismus die Anzahl der Generationen noch nicht ausreichte, um diesen in der Population gleichmäßig zu verteilen [Wehnert 1990].

Wenn die Häufigkeit zweier Allele eines diallelen Polymorphismus in einer Population im Gleichgewicht ist, beträgt nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz die Heterozygotenfrequenz $2pq$. Es können maximal 50% der Konduktorinnen einer gegebenen X-chromosomalen Erkrankung heterozygot, d. h. informativ für diesen RFLP sein. Bedingt durch die Unterschiede in den Allelfrequenzen betragen die erwarteten Heterozygotenfrequenzen der einzelnen diallelen RFLP in der hier untersuchten deutschen Population 32-50% (s. Tabelle 3.3, S. 26). Die beobachteten und erwarteten Heterozygotenfrequenzen waren bei den Markern XmnI und DdeI signifikant verschieden. Ursächlich sind wahrscheinlich Kopplungsungleichgewichte (s. u.).

Betrachtet man die Aussagekraft eines einzelnen Markers bei den 131 untersuchten Frauen (s. Abb. 3.1, S. 29), so war dieser nur bei 27-36% der Frauen (je nach Marker) für die Diagnose eines Konduktorinnenstatus informativ. Diese Zahl ist bei sämtlichen Polymorphismen geringer als beobachtete und erwartete Heterozygotenfrequenzen (unabhängige Allele) (s. Tabelle 3.3, S. 26). Diese Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass bei den für diese Auswertung herangezogenen Konduktorinnen auch mehrere Frauen einer Familie zugelassen waren.

Vergleicht man die in großen Studien anderer kaukasischer Populationen beschriebenen Heterozygotenfrequenzen mit den bei uns beobachteten (s.

Tabelle 3.3, S. 26), so ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Abweichungen in der Allelverteilung traten dagegen für die meisten der hier untersuchten RFLP zwischen Kaukasiern und denen anderer Populationen auf [Bowen 2002; Peake et al. 1993; Peake 1995; Knobloch und Ludwig 1998].

Eine Erklärung dieser Unterschiede könnte das parallele Auftreten der zu den Polymorphismen führenden Mutationen in den jeweiligen Populationen zu unterschiedlichen Zeiten und der damit verbundenen unterschiedlichen Durchmischung sein [Wehnert 1990].

Praktisch bedeutet dies, dass in einem Land wie der BRD, in dem viele ethnische Populationen vertreten sind, bei der indirekten humangenetischen Diagnostik für Menschen anderer ethnischer Herkunft Marker mit publizierter hoher Heterozygotenrate verwendet werden müssen. [Goodeve et al. 1998a]

4.2.2 Kopplungsungleichgewichte

Bei der Untersuchung von vier diallelen Polymorphismen wäre theoretisch eine Informativität für wenigstens einen der verwendeten RFLP bei 93,75% der Konduktorinnen zu erwarten [Wehnert 1990]. Bei der hier durchgeführten Untersuchung waren nur 71-77% bei der Untersuchung von vier Markern informativ. Wurden fünf Marker untersucht, waren 84% informativ und bei der Untersuchung von sechs Markern 88% (s. Abb. 3.1, S. 29).

Es konnte beobachtet werden, dass nur 8 der 16 theoretisch möglichen Haplotypen der Marker TaqI, XmnI, DdeI und HhaI auftraten (s. Tabelle 3.4, S. 27). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Autoren für die kaukasische Population [Ketterling et al. 1991b; Graham et al. 1991]. Diese signifikanten Unterschiede zwischen erwarteten und beobachteten Haplotypfrequenzen konnten als Kopplungsungleichgewichte zwischen den untersuchten Polymorphismen in der deutschen Population gewertet werden [Wehnert 1990]. Das Vorhandensein dieser Ungleichgewichte kann zur Erklärung der beobachteten Differenzen der Informativität bei Kombination mehrerer Marker in Theorie und Praxis beitragen.

Offensichtlich sind Kopplungsungleichgewichte zwischen eng benachbarten Polymorphismen weit verbreitet. Eine zu einem bestimmten Polymorphismus führende Mutation ist ein sehr seltenes Ereignis. Sie ist bei der Entstehung an

ein Allel eines anderen Polymorphismus gebunden. Die Kombination mit anderen Allelen dieses Polymorphismus erfolgt in der Population anschließend nahezu ausschließlich über die Rekombination. Da die Rekombinationshäufigkeit zwischen eng benachbarten Genorten sehr gering ist, stellt sich das Gleichgewicht erst über viele Generationen ein, so dass die jeweiligen Kopplungsungleichgewichte sehr lange in der Population erhalten bleiben [Wehnert 1990].

Bei der Betrachtung der Kopplung von jeweils zwei Markern (s. Tabelle 7.1, S. 88) konnte ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den intragenen Markern TaqI und XmnI sowie Taq I und DdeI festgestellt werden. In der Literatur wird bei Kaukasiern ein Kopplungsungleichgewicht der TaqI-, XmnI- und MnlI-RFLP gefunden. Bei den untersuchten Haplotypverteilungen der Kombinationen der Polymorphismen TaqI/XmnI und TaqI/DdeI kommt einer der vier erwarteten Haplotypen nur einmal vor (s. Tabelle 7.1, S. 88). Trotz des Kopplungsungleichgewichtes sollten beide Polymorphismen bestimmt werden weil Homozygote für das TaqI-Allel 2 in etwa 50% der Fälle heterozygot und damit informativ für den XmnI-RFLP sein können. Übereinstimmend mit dieser Erwartung wurden unter 10 für das TaqI-Allel 2 homozygoten Probandinnen 5, d.h. 50% Heterozygote für den XmnI-RFLP gefunden. Dasselbe gilt für die Kombination der RFLP für Taq I und DdeI.

Bei der indirekten Diagnostik innerhalb der kaukasischen Population sind bei der Verwendung von fünf intragenen Markern (RFLP für TaqI, XmnI, DdeI, MnlI, MseI) etwa 90% der untersuchten Frauen informativ [Goodeve et al. 1998b; Peake 1998; Knobloch und Ludwig 1998]. Die extragenen RFLP für SacI und HhaI, die nicht im Kopplungsungleichgewicht mit den intragenen Markern im FIX-Gen stehen, können die diagnostische Effizienz auf über 90% steigern [Knobloch und Ludwig 1998; Peake et al. 1993]. Die bei uns beobachtete maximale Informativitätsrate von nur 88% (s.o.) kann darauf beruhen, dass der RFLP für MnlI nur teilweise und der MseI-RFLP, welcher in den o.g. Studien charakterisiert wurde, nicht untersucht wurden.

4.2.3 Grenzen der indirekten Diagnostik

Außer durch den oben beschriebenen Anteil von etwa 10% nicht informativer Frauen, kann durch weitere Faktoren die Aussagekraft der indirekten Diagnostik eingeschränkt werden:

- 29 unserer HB Patienten waren sporadische Fälle, und bei 79 aller Patienten war keine Angabe zur Familienanamnese vorhanden (s. Kapitel 3.1, S. 24f.), so dass auch dort eine sporadischen Hämophilie B nicht ausgeschlossen werden kann. Bei den möglichen Konduktorinnen dieser Familien kann daher nur ein Konduktorinnenausschluss erfolgen. 12 hier aufgezeigte Konduktorinnen dieser Familien sind nach Kopplungsanalyse Überträgerinnen der HB. Da aber ca. 30-50% der Patienten eine Neumutation haben ist somit das Risiko einer falsch-positiven Diagnose relativ groß [Haldane 1935, Montandon et al. 1992, Saad et al.1994].
- Durch fehlende Angehörige, sei es den Patienten selbst oder auch andere relevante Familienmitglieder, kann die Vererbung des Gendefekts im FIX-Gen nicht verfolgt werden. Bei 72 der hier untersuchten 131 möglichen Konduktorinnen (55%) konnte deshalb keine Aussage durch die indirekte Diagnostik erfolgen (s. 3.2.3, S.30). Hier müsste durch entsprechende Beratung versucht werden, eine bessere Kooperativität der Familienmitglieder zu erreichen. In vergleichbaren Untersuchungen wird ein nicht-informativer Anteil von 6%, bedingt durch einen fehlenden Patienten, angegeben [Saad et al. 1994].
- Eine nicht korrekt angegebene Paternität kann sich wie ein fehlender Angehöriger auswirken (s. 3.2.4.1, S. 31) oder im ungünstigsten Fall zu einer falschen Diagnose führen. In zwei unserer Familien war aufgrund der Ergebnisse der RFLP-Analyse die angegebene Paternität anzuzweifeln, dennoch konnte aber eine Diagnose gestellt werden (s. 3.2.4.1, S. 31), da die Segregationsanalyse ohne paternale Daten möglich war.
- Konduktorinnen in Deletionsfamilien weisen Polymorphismen im Bereich der Deletion hemizygot auf, welches von einer Homozygotie im Southern blot bzw. PCR-Analyse nicht sicher unterschieden werden kann (s. 3.3.1, S. 35ff.). Liegt ein Marker außerhalb des Deletionsbereiches heterozygot vor, liegen zwei Allele vor und es kann eine indirekte Diagnostik erfolgen. Zwei

Konduktorinnen aus Deletionsfamilien konnten auf diese Art diagnostiziert werden (s. 3.2.4.2, S. 33). (s.a. 4.3.1 Mutationsnachweis durch Southern Blotting, S. 60)

- Auch die Methode der PCR birgt Fehlerquellen in sich: Es fiel auf, dass verschiedene Allele unter bestimmten Umständen ungleich amplifiziert werden [Liu et al. 1997; Barnard et al. 1998]. Die Autoren zeigten, dass bestimmte Mutationen die Amplifikation inhibieren können, wiederholt und unabhängig von den gewählten Amplifikations-Bedingungen. Auf diese Weise kann die Diagnostik zu einem falschen Ergebnis führen. Auch ein unvollständiger Verdau der Amplifikate durch die Restriktionsenzyme kann falsche Diagnosen bedingen [Winship et al. 1989]. Die Verwendung von Kontrollen und eine unabhängige Doppelbestimmung sollten in unseren Untersuchungen letztgenanntes Problem minimieren.
- Die indirekte Diagnostik kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wenn Patient oder Konduktorin ein Mosaik tragen (s. 1.1.3.1; S. 2) [Knobloch und Ludwig 1998]. Da Mosaik nur in wenigen informativen Stammbäumen nachgewiesen werden können, ist deren Anteil in den sporadischen Familien schwer einschätzbar [Gitschier et al. 1989] (s. a. 4.4, S. 67f.).
- Die Segregationsanalyse kann nie eine 100% sichere Diagnose stellen, da Rekombinationsereignisse zwischen der Mutation und dem Marker möglich sind. Im Fall der intragenen Marker ist diese Wahrscheinlichkeit sehr gering; weder im Rahmen dieser Arbeit noch in der Literatur, wurde bisher ein Crossing over-Ereignis beschrieben [Goodeve 1998a]. Werden intergene RFLP verwendet, muss je nach Abstand des Markers vom untersuchten Gen mit einer höheren Anzahl von Rekombinationsereignissen gerechnet werden. Bei den hier untersuchten Familien konnte ein solches Rekombinationsereignis zwischen der Mutation und dem extragenen Marker SacI nachgewiesen werden (s. 3.2.4.3, S. 34). Die von uns beobachtete Rekombinationsfrequenz von 1% liegt niedriger, als die in der Literatur mit 3-7% angegebene Rekombinationsfrequenz des Markers, die sich aus dem vermutlichen Abstand zwischen dem SacI-Lokus DXS99 und dem FIX-Gen errechnet [Wehnert 1990].

4.3 Direkte genomische Diagnostik

4.3.1 Mutationsnachweis durch Southern Blotting

In wenigen Fällen kann die Southern Blotting Methode einen Gendefekt direkt identifizieren, indem der Verlust von Genfragmenten (Deletionen) und/oder das Auftreten von atypischen Restriktionsmustern (junction Fragmente) dargestellt wird [Knobloch und Ludwig 1997].

Bei 5 nicht verwandten Patienten (5% aller unabhängigen Mutationen) konnte eine große Deletion (>30bp) nachgewiesen werden. Dies entspricht etwa der in der Literatur angegebenen Häufigkeit von größeren Aberrationen mit 6% [Lillicrap 1998]. Ein weiterer Patient wies ein verändertes Bandenmuster auf, welches durch eine Punktmutation oder eine kleinere Deletion verursacht wurde (s. Tabelle 3.6, S. 38).

Führen Deletionen oder Punktmutationen zum Auftreten von aberranten Banden (junction Fragmenten) beim Southern Blot, so kann eine sichere Konduktorinnendiagnostik durchgeführt werden, wenn diese junction Fragmente mit der Mutation gekoppelt sind. Bei 4 Konduktorinnen aus 2 Deletionsfamilien und einer Familie mit einem Patienten mit wahrscheinlicher Punktmutation oder kleinerer Deletion, konnte so der Konduktorinnenstatus bestimmt werden.

Der Nachweis von durch Deletionen hervorgerufenen abgeschwächten Banden im Southern Blot (Hemizygotie) eignet sich nur bedingt zur Konduktorinnendiagnostik (s. Abb. 3.6, S. 36), eine densitometrische Bestimmung der Bandenstärke müsste dann erfolgen. Voraussetzung für einen solchen Gen-Dosis-Effekt ist das Auftragen gleicher Mengen DNA. Eine nur optisch wahrnehmbare unterschiedliche Bandenintensität erlaubt keine sichere Aussage. Bei 3 möglichen Konduktorinnen aus zwei Familien, wo bei dem Patienten eine Deletion nachgewiesen werden konnte, wurde zwar eine verringerte Bandenintensität beobachtet, dies war jedoch nur im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen als Hinweis auf das Vorliegen eines Überträgerstatus zu werten. In diesen beiden Familien ist durch den Nachweis oder den Ausschluss der Deletion bei männliche Feten dennoch eine sichere p.D. möglich.

Eine weitere Konsequenz dieser Erwägungen ist die Wichtigkeit in alle Familienuntersuchungen einen Patienten einzubeziehen, da häufig nur bei diesem eine Deletion nachgewiesen werden kann, die bei der alleinigen Untersuchung von Konduktorinnen häufig nicht erkannt wird.

4.3.2 Mutationsnachweis durch Sequenzanalyse

4.3.2.1 Informativität der direkten Diagnostik

Nach Sequenzierung aller FIX-Regionen von wahrscheinlicher funktioneller Signifikanz (d.h. Promotor, Exons 1-8, splice sites) konnten bei 116 nicht verwandten Personen Mutationen identifiziert werden. 16 Patienten wiesen keine Abweichung in den analysierten Regionen auf (15%) (s. Tabelle 3.7, S. 37) [Herrmann et al. 1997; Wulff et al. 1996; Wulff et al. 1995].

Die 16 Patienten, bei denen keine Mutation charakterisiert werden konnte, wurden in den Jahren 1987-96 überwiesen und untersucht. Seit 1996 bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes konnte bei allen zur direkten Diagnostik überwiesenen Patienten mit Hilfe der automatischen Sequenzierung eine Mutation charakterisiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, mit der Sequenzanalyse die für die HB verantwortliche Mutation zu entdecken, beträgt seit 1990 94% und seit 1996 99%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Werten großer Untersuchungen: 1992 veröffentlichten Sommer et al. eine Informativitätsrate von 95% und 1999 wurde von Ketterling et al. eine Rate von 97% angegeben.

Als Ursache dafür, dass die für die Erkrankung verantwortliche Mutation nicht gefunden werden konnte, wird die Lokalisation der Mutation in nicht von der Methode untersuchten Regionen des Gens vermutet. Diese Fälle könnten Folge einer zusätzlichen Intron Spleißstelle, einer Mutation in bis heute unbekanntem cis-acting oder trans-acting Elementen sein [Knobloch et al. 1993] oder im Zusammenhang mit der posttranslationalen Prozessierung stehen [Knobloch und Ludwig 1998]. Trotz intensiver Suche, konnte außer dem FIX-Gen kein zusätzlicher Genort gefunden werden, der für die FIX Synthese zuständig wäre [Ketterling et al. 1999].

Nachdem bei einem Patienten eine Nukleotidveränderung durch die Sequenzierung festgestellt wird, muss entschieden werden, ob diese eine für die HB verantwortliche Mutation darstellt. Haben weitere betroffene Familienmitglieder die gleiche Alteration, oder führt die Mutation zu einer Spleißmutation, einer Deletion oder einem Kettenabbruch bei der Proteinsynthese, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine kausative Mutation handelt [Bowen 2002; Bottema et al. 1991a]. Bei Missense-Mutationen kann die Entscheidung, ob es sich bei der gefundenen Nukleotid-Alteration um eine Mutation oder um eine polymorphe Variation handelt, erschwert sein.

Wenn in der FIX-Databse [Green et al. 2003] weitere nicht verwandte Patienten mit der gleichen Mutation publiziert sind, ist die Kausalität wahrscheinlich.

Bei bisher nicht publizierten Mutationen kann der Einfluss auf die Funktion des FIX-Proteins nicht sicher erklärt werden. Deshalb sollten möglichst mehr als fünfzig nicht verwandte, nicht betroffene Individuen aus der gleichen Population untersucht werden um das Vorliegen eines die Funktion des FIX-Proteins nicht beeinflussenden Polymorphismus auszuschließen. [Goodeve 1998a]

23 der bei uns untersuchten Patienten hatten große Deletionen, Nonsense-Mutationen oder frame-shift-Mutationen, die zu einem funktionsuntüchtigen Genprodukt führen. Von den 68 Missense-Mutationen waren 13 erstmalig nachgewiesen worden. Da bei all diesen Patienten in den übrigen Genabschnitten (Promotor, Exons 1-8, Spleißjunctions) keine weiteren Veränderungen gefunden werden konnten, können die Nukleotid-Alterationen als die wahrscheinliche Ursache für die HB betrachtet werden. Außerdem konnte bei keiner anderen untersuchten Person (Hämophile; Konduktorinnen und gesunde Individuen) eine solche Veränderung festgestellt werden.

4.3.2.2 Unabhängige Mutationen

Gleiche Mutationen können bei Patienten, bei denen eine Verwandtschaft nicht bekannt ist, auftreten, wenn (a) die Mutation über viele Generationen von einer Person ausgehend weitergegeben wurde (Foundereffekt) oder (b) die Mutation an der gleichen Position gehäuft spontan auftritt [Peake 1995]. Gehen gleiche

Mutationen bei nicht offensichtlich miteinander verwandten Patienten dennoch auf einen gemeinsamen Gründer zurück, so tragen diese identische Haplotypen.

56 der HB Patienten die nach unseren Kenntnissen nicht verwandt sind, hatten wiederholt auftretende Mutationen (s. Tabelle 7.4, S. 92). Um eine Unabhängigkeit nachweisen zu können, wurde der Haplotyp analysiert. (Definition der Unabhängigkeit nach Knobloch und Ludwig 1998). Es konnte geschlussfolgert werden, dass die Mehrheit (80%) der identischen Mutationen in der deutschen HB Population wahrscheinlich unabhängiger Herkunft ist. Eine Rate von 77% konnte 1993 durch Knobloch et al. bei einer Untersuchung von 114 nicht verwandten Patienten aus den alten Bundesländern gefunden werden. Somit sind in der deutschen HB Population mehr Mutationen unabhängiger Herkunft, als in den USA; hier wird eine Rate von ca. 50% gefunden. Durch die Einwanderung von drei Familien mit leichter Hämophilie und einer starken Verbreitung der Mutation spielt in den USA ein ausgeprägter Foundereffekt eine Rolle [Ketterling et al. 1991b; Bottema et al. 1990; Knobloch et al. 1993].

8 Patienten mit leichter HB haben die Mutation 296, Thr→Met, die weltweit eine der am häufigsten publizierten Mutationen ist [Green et al. 2003]. Bei der Haplotypanalyse (diese erfolgte bei 5 der Patienten) fanden sich 2 verschiedene Haplotypen. 4 der Patienten hatten einen Haplotyp (TaqI:1, XmnI:1, DdeI:2, HhaI:1, MnlI:1), der auch bei der Mehrheit der US-amerikanischen Patienten mit dieser Mutation vorhanden ist [Ketterling et al. 1991a]. Dort konnte durch große Stammbaumanalysen die Mutation bis 1789 auf einen amisch/protestantischen Vorfahr deutscher Herkunft zurückverfolgt werden. Obwohl die Mutation 296, Thr→Met eine Transition an einem CpG-Dinukleotid mit erhöhter Mutationsrate (s. Ketterling et al. 1991a) ist, indiziert der gleiche Haplotyp einen Gründereffekt. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Mutationen unabhängig in dem identischen Haplotyp entstanden sein könnten, beträgt 0,5% (s. 3.4, S. 44f). Ein Patient weist einen abweichenden Haplotyp auf, was auf eine unabhängige Herkunft hindeutet. Dieses ist durch die erhöhte

Mutationsrate an dem CpG-Dinukleotid erklärbar [Ketterling et al. 1991a] (s.u.).

4.3.2.3 Art der Mutationen

Nach der Haplotypanalyse von 116 mutanten FIX-Allelen nicht verwandter Patienten und von Konduktorinnen, in deren Familie kein Patient untersucht werden konnte, ließen sich 105 (91%) als unabhängig bestimmen (s. Tabelle 3.8, S. 38 und Tabelle 7.4, S. 92):

Es konnten 5 (5%) große Deletionen (>30 bp), 7 (7%) kleine Deletionen, 4 (4%) Promotor Mutationen, 6 (6%) Spleißmutationen, 14 (13%) Nonsense- und 68 (65%) Missense-Mutationen unter den 105 unabhängigen Mutationen beobachtet werden. Somit hatten 95% aller Patienten Mutationen in den kodierenden Sequenzen, der Promotorregion oder den Spleißjunctions. Ein Patient (8070) hatte eine Doppelmutation (17784, TGT→TTT(124, Cys→Phe) und 17782 TCC→TCT (123, Ser→Ser). Die stumme Mutation an Kodon 123 wurde bisher noch nicht beschrieben und beeinflusst die FIX-Aktivität wahrscheinlich nicht.

In der Literatur wird die Frequenz großer Deletionen mit 6%, kleiner Deletionen mit 8%, Promotor Mutationen mit 3-4%, Spleißmutationen mit 6-7%, Nonsense Mutationen mit 18% und Missense Mutationen mit 62-63% [Lillicrap 1998, Knobloch et al. 1993; Sommer 1992] angegeben. In diesen Studien fanden sich 90% bzw. 96% aller Mutationen im Bereich von kodierender Sequenz, Promotor oder Spleißjunctions. Das gefundene Mutationsmuster wich somit nicht von den publizierten ab, von denen etwa 1/3 in Studien kompletter Populationen gefunden wurden.

In diesen Untersuchungen konnten keine Unterschiede des Mutationsmusters zwischen verschiedenen Populationen unterschiedlicher geographischer Regionen der Erde gefunden werden. Dieses stabile Muster deutet auf eine Mutationsentstehung als Folge eines universellen Geschehens hin. Obwohl ein ubiquitäres exogenes Mutagen nicht ausgeschlossen werden kann, so kann die Mutationsentstehung bei der HB wohl als Folge eines endogenen Geschehens, wie beispielsweise Desaminierung, Fehler bei Replikation, DNA-Reparatur etc., verstanden werden [Liu et al. 2000; Sommer et al. 2001; Li et al. 2000]

4.3.2.4 CpG-Dinukleotide

54 der von uns beobachteten Mutationen sind in der Database [Green et al. 2003] bereits bekannt. Davon sind 25 Mutationen Transitionen an CpG-Dinukleotiden. Die am häufigsten publizierte Mutation 296,Thr→Met wurde auch bei uns mit 8 Fällen als die häufigste Mutation beobachtet (dieses wurde in Abschnitt 4.3.2.2 diskutiert). Diese Mutation ist einerseits das Ergebnis eines Foundereffektes, andererseits deuten eine große Zahl verschiedener Haplotypen auf häufige de novo Mutationen an dem CpG hotspot hin [Mukherjee et al. 2003]. Alle weiteren mehrmals beschriebenen Transitionen an CpG-Dinukleotiden konnten auf eine unabhängige Entstehung zurückgeführt werden (s. Tabelle 7.4 und Tabelle 7.2 im Anhang).

Das Dinukleotid CpG gilt als Mutations-hotspot, CpG-Mutationen sind als die häufigsten Mutationen im menschlichen Genom bekannt [Mukherjee et al. 2003; Peake 1995]. So findet sich in unseren Untersuchungen eine 20-fach gesteigerte Transitionsneigung (s. 3.3.2.3, S. 43), die auch in der Literatur bekannt ist [Bottema et al. 1993]. Die beschriebene 8-fach gesteigerte Mutationsrate für Transversion [Bottema et al. 1991b; Ketterling et al. 1994] konnte aufgrund der zu kleinen Datenmenge bei uns nicht untersucht werden.

Im gesamten exonischen Bereich des FIX-Gens, kommen nur 20 CpG-Dinukleotide vor, weit weniger als statistisch zu erwarten wären. Diese Unterrepräsentation impliziert, dass diese der unabdingbar konservierte Rest einer ursprünglich größeren Anzahl sind [Koeberl et al. 1989]. An 18 dieser Dinukleotide sind bisher zu HB führende Mutationen beschrieben [Green et al. 2003]. Als Ausdruck der erhöhten Mutationsneigung ist der hohe Anteil diese Nukleotide betreffende Mutationen unter den HB Patienten zu verstehen [Knobloch und Ludwig 1997].

4.3.3 Mutationsscreening durch Heteroduplex

4.3.3.1 Möglichkeit und Grenzen der Heteroduplexanalyse

Die Sequenzanalyse aller wichtigen Bereiche des FIX-Gens (Promotor, Exons 1-8 und Spleißjunctions) ist eine langwierige und kostspielige Prozedur. Durch Screeningmethoden kann häufig eine Mutation in einem bestimmten Genabschnitt lokalisiert werden, um diesen Abschnitt dann gezielt

sequenzieren zu können. Im IHG wird für die Vorselektion die Heteroduplexmethode verwendet [White et al. 1992]. Mit Hilfe dieser Methode kann in den meisten Fällen das die Mutation enthaltende Exon vorselektiert werden.

Bei FIX konnten wir bei allen untersuchten Patienten in den Exons 2,4,5,6 und 7 sowohl Heteroduplex und Mutation nach Sequenzierung nachweisen. In den Exons 1 und 8 konnten ein Teil (33-44%) der Mutationen durch Heteroduplex nicht erfasst werden (s. Tabelle 3.10, S. 42).

Dies bedeutet, dass in diesen Fällen zum Mutationsnachweis das FIX-Gen mittels Sequenzanalyse auf das Vorliegen einer entsprechenden Mutation kontrolliert werden muss.

Auch andere Autoren beschreiben Schwierigkeiten mit der Heteroduplex-Methode gewisse Genvariationen aufzuzeigen [Espinosa et al. 2003]. Als Ursachen für die unterschiedliche Präzision der Methode werden die Art der Mutation, die Länge des PCR-Amplifikats und die Struktur des Heteroduplex diskutiert [White et al. 1992].

4.3.3.2 Heteroduplex zur Konduktorinnendiagnostik

Um die Sicherheit der Heteroduplexmethode bei der Konduktorinnendiagnostik zu bewerten, wurden mögliche Konduktorinnen untersucht, in deren Familien bei dem Patienten eine Mutation charakterisiert und eine Heteroduplexanalyse durchgeführt worden war.

In den 38 Familien, in denen die Patienten Mutation und Heteroduplex in den Exons 1,2,4-6 und 8 aufwiesen, konnte bei 43 möglichen Konduktorinnen ein Heteroduplex nachgewiesen und bei 24 Frauen ein solcher nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse standen im Einklang mit denen der Konduktorinnendiagnostik durch Sequenzierung oder RFLP-Analyse (s. Tabelle 3.11, S. 43).

Kann im FIX-Gen eines Patienten ein Heteroduplex nachgewiesen und durch Sequenzanalyse bestätigt werden, so stellt die Methode für die genomische Familiendiagnostik eine preiswerte, rasche und sichere Möglichkeit zur Konduktorinnendiagnostik dar.

4.4 Sporadische Fälle

Durch die Anwendung molekulargenetischer Methoden ist es heute möglich den Ursprung der Mutation zu ermitteln, und aus diesen Daten zuverlässige Schätzungen der Mutationsrate, der Sexratio und eines eventuellen parentalen Alterseffekts bei der Mutationsentstehung zu erhalten. Hierdurch kann die von Haldane 1935 entwickelte indirekte Schätzung der Mutationsrate präzisiert werden. Aus dieser lässt sich ableiten, dass 1/3 der männlichen Träger eines X-chromosomal vererbten Letalgens Neumutationen sind. Aufgrund der Schwierigkeit, drei Generationen einer Familie untersuchen zu können, konnten bisher nur wenige Mutationsursprünge weltweit ermittelt werden.

Größere Untersuchungen fanden Schätzungen der Mutationsrate im FIX-Gen zwischen $0,03 \times 10^{-10}$ und 360×10^{-10} , je nach untersuchtem Mutationstyp [Giannelli und Green 2000; Sommer und Ketterling 1996].

In unseren Untersuchungen fanden sich 3 Mutationsentstehungen in weiblichen und 2 in männlichen Keimzellen. (Zweimal konnte der Ursprung der Mutation in den Keimzellen der Mutter des Patienten, zweimal in denen des Großvaters mütterlicherseits und einmal in denen der Großmutter mütterlicherseits. (s. 3.5, S. 46ff.) geschlussfolgert werden.) Diese Zahl ist für die Auswertung der relativen Sexratio zu gering. In der Literatur wird ein Sexratio von 3,75 für die Mutationsfrequenzen in männlichen/weiblichen Keimzellen beschrieben [Giannelli und Green 2000; Sommer und Ketterling 1996; Lillicrap 1998].

Die unterschiedliche Entwicklung männlicher und weiblicher Keimzellen bedingt, dass sich bei einem 30-jährigen Mann die Keimzellen 15-mal häufiger geteilt haben. So ergibt sich eine höhere Mutationsrate in der männlichen Keimbahn, wenn die Mutationsentstehung eine Folge der Zellteilung darstellt [Ketterling et al. 1993].

Die in der Spermatogenese erhöhte Mutationsrate bedeutet in Praxis, dass die Mutter eines sporadischen Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit als Konduktorin betrachtet wird [Wilcox 1997]. In unserem Familien ermittelten wir nach den Ergebnissen der Sequenzanalyse ein Risiko von 88%, dass die Mutter eines Patienten ebenfalls die Mutation trägt (3.5.2, S. 48). In einer

Untersuchung der deutschen Population fand Knobloch et al. 1993 eine Rate von 82%.

Bisher wurden keine signifikanten Unterschiede der Mutationsraten in verschiedenen Populationen gefunden, was auf endogene Prozesse, bei beispielsweise Deaminierung oder Depurinierung oder ein ubiquitäres exogenes Mutagen, als Ursache der Mutationsentstehung, hindeutet [Liu et al. 2000; Li et al. 2000; Sommer et al. 2002; Heit 1998].

Ein erhöhtes Alter bei Müttern oder Großeltern bei Entstehung der Mutation in den Keimzellen lag nach unseren Daten nicht vor. Ein erhöhtes paternales Zeugungsalter als Ursache von Mutationen im FIX-Gen konnte in der Literatur ebenfalls nicht festgestellt werden, was darauf hinweisen könnte, dass Replikationsfehler bei der Mutationsentstehung keine größere Rolle spielen [Sommer et al. 2001; Sommer und Ketterling 1996]. Allerdings fanden die Autoren eine Erhöhung des maternalen Zeugungsalters, was bei uns nicht festgestellt werden konnte.

Findet man bei der Mutter eines sporadischen Patienten die Mutation nicht, so kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass der Patient das Resultat einer de novo Mutation ist. Vielmehr ist es möglich, dass die Mutter ein chromosomales Mosaik ist. Die Inzidenz von Mosaiken bei der HB ist unbekannt; es wird eine Schätzung von ca. 10% angegeben [Lillicrap 1998; Sommer und Ketterling 1996]. Somit sollte auch diese Müttern bei einem weiteren Kinderwunsch über das Risiko informiert werden [Wehnert 1990; Gitschier et al. 1989].

4.5 Mutationsnachweis bei möglichen Konduktorinnen mit familiärer HB in deren Familien kein Patient untersucht werden konnte

12 Frauen aus 9 Familien, in deren Familien die Untersuchung eines Patienten nicht möglich war, ersuchten um eine Konduktorinnendiagnostik. Nach Stammbaumanalyse waren 6 der Frauen mögliche und 6 Frauen obligate Konduktorinnen. 3 der möglichen Überträgerinnen konnten durch Mutationsnachweis sicher als Konduktorinnen bestätigt werden. Eine mögliche Konduktorin konnte durch Sequenz- und Heteroduplexanalyse sicher

ausgeschlossen werden. Die bei Mutter und Schwester vorhandene Mutation konnte bei ihr nicht nachgewiesen werden.

Bei möglichen Konduktorinnen finden sich eventuell bei der klinischen Diagnostik stark erniedrigte FIX-Werte, so dass ein Konduktorinnenstatus wahrscheinlich ist (s. Tabelle 3.12, S. 50; Patient-Nr. 9063). Die indirekte Diagnostik kann in den meisten dieser Familien nicht weiterhelfen, da der Haplotyp des Patienten unbekannt ist. In einigen Fällen kann dieser über andere untersuchte Familienmitglieder hergeleitet werden. Die Heteroduplexmethode kann das Exon mit einer eventuellen Mutation vorselektieren. Gelingt dies nicht, müssen alle Exons sequenziert werden. Kann keine Mutation identifiziert werden, so bestehen drei Möglichkeiten: a) Die Frau ist keine Konduktorin. b) Die Frau ist eine Konduktorin, aber die Mutation gehört zu den mit der Sequenzanalyse nicht nachweisbaren Mutationen (s. 4.3.2.1). Gerade heterozygote Veränderungen sind oft schwerer mit der automatischen Sequenzierung zu erkennen [Goodeve 1998a]. c) Die Frau ist Konduktorin und hat eine große FIX-Gendeletion auf einem Allel.

Die Mutationsanalyse kann also prinzipiell für die Konduktorinnendiagnostik eingesetzt werden, es sollte jedoch nach Möglichkeit ein Patient aus der jeweiligen Familie mit untersucht werden, der die kausale Mutation, die zum FIX-Mangel führt, aufzeigt. Bei fehlendem Mutationsnachweis kann sonst kein sicherer Ausschluss als Konduktorin erfolgen.

Durch die immer noch hohe Mortalität von Hämophilen in einigen Regionen bzw. die mangelnde Kooperationsbereitschaft in einigen Familien, werden immer wieder Frauen Rat suchen, in deren Familie kein Patient untersucht werden kann. Die WHO empfiehlt daher, Blut oder DNA aller Patienten zu konservieren, um bei einer eventuell erforderlichen Diagnostik dieses zur Hand zu haben [Peake et al. 1998].

In einigen Ländern konnten komplette Datenbanken aufgebaut werden, die bereits gute Ergebnisse geliefert haben [Ivaskevicius V et al. 2001; Ljung R 2001; Saad et al. 1994]. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Datenbank konnte im Untersuchungszeitraum in einem Fall erprobt werden und der Aufwand der Mutationsanalyse konnte dadurch eingeschränkt werden.

4.6 Pränatale Diagnostik

Die Einstellung der Ratsuchenden und ihr Bestreben nach einer pränatalen Diagnostik in Verbindung mit einem Schwangerschaftsabbruch sind abhängig vom Schweregrad der Erkrankung beim Indexfall [Knobloch und Ludwig 1997]. Kann bei einer Frau eine Mutation nachgewiesen werden aber kein Patient dieser Familie untersucht werden, kann anhand der international publizierten Mutationen der vermutete Schweregrad bestimmt werden [Green et al. 2003]. So würde man, beispielsweise bei einem Fall von HB Leyden oder bei klinisch leichten bis moderaten Fällen, von einem Schwangerschaftsabbruch abraten.

Durch die Einführung molekulargenetischer Methoden, wurde eine p.D. im ersten Trimenon der Schwangerschaft möglich. Sollte die Schwangere sich aufgrund des Ergebnisses der p.D. zu einem Schwangerschaftsabbruch entscheiden, ist es zu diesem Zeitpunkt weniger psychisch belastend, als eine Unterbrechung zu einem späteren Zeitpunkt, wie sie vor Etablierung molekulargenetischer Untersuchungsmethoden üblich war [Tedgard et al. 1999a; Tedgard et al. 1999b].

In schwedischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass über 2/3 der Konduktorinnen sich durch das Wissen um eine Diagnostik im ersten Trimenon positiv in ihrer Familienplanung beeinflusst sahen und dass 1/3 vorher keine Kinder haben wollten [Tedgard et al. 1999a; Tedgard et al. 1999b].

Trotzdem stellt eine p.D. in Verbindung mit einem möglichen Schwangerschaftsabbruch eine große emotionale Herausforderung dar. Hier zeigt sich die Aufgabe des humangenetischen Beraters, d.h. auch ein psychologischer Betreuer zu sein. In den o.g. Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass 1/4 der betreuten Paare die erhaltenen Informationen als irreführend oder insuffizient bezeichneten.

Den betreuten Familien sollte unbedingt angeraten werden, eine genomische Diagnostik vor dem Eintritt einer Schwangerschaft abzuschließen. Die Paare können dann ohne Zeitdruck eine Schwangerschaft planen und sich auf

eventuelle Konsequenzen einstellen. Werden fetale Proben entnommen, kann der Zeitraum bis zum Vorliegen des Ergebnisses klein gehalten werden.

Abgesehen vom großen Zeitaufwand, verursacht die Anforderung einer pränatalen Diagnostik, ohne vorher erfolgte Familienuntersuchung sehr hohe Kosten. Alle anderen Arbeiten in einem Labor müssen zurückgestellt werden, um in kürzester Zeit ein Ergebnis zu erhalten. Eine solche Arbeitsweise ist für ein Labor kaum kostendeckend. Obwohl die Methoden der genomischen Diagnostik in jedem molekularbiologischen Labor Standard sind, sollte die Diagnostik in Deutschland auf möglichst wenige große Einrichtungen konzentriert werden. So kann die oben beschriebene kostenintensive Diagnostik unter Zeitdruck dennoch gewährleistet werden. Das IHG in Greifswald hat sich als eines der Zentren für die molekulare Diagnostik der HB in Deutschland etabliert.

Auch nach Erhalt der Untersuchungsergebnisse ist ein enger Kontakt zwischen Betreuer und Ratsuchender erforderlich. Ein niedriges Wiederholungsrisiko liegt für den Genetiker beispielsweise bei kleiner $1/20$ [Wilcox 1997]; für eine Ratsuchende kann schon ein Risiko von 3% zu groß sein, um eine Schwangerschaft auszutragen [Wehnert 1990].

Sind molekulargenetische Methoden nicht informativ (v.a. in Fällen eines möglichen Mosaiks oder bei familiär nicht untersuchbaren Patienten), so kann nur die im zweiten Trimenon durchführbare fetale Blutgerinnungsdiagnostik weiterhelfen.

Bedingt durch das bisher ungelöste Problem einer gentherapeutische Korrektur genetisch bedingter Defekte, die immer noch mit schweren Nebenwirkungen behafteten Behandlungsmethoden und ständige Neumutationen, wird die (v.a.) direkte genomische Diagnostik auch in naher Zukunft ein unverzichtbarer Bestandteil der humangenetischen Beratung bleiben. [Wehnert 1990].

4.7 Vergleich der direkten und der indirekten Diagnostik

Die Vorteile des direkten Mutationsnachweises sind [Goodeve und Peake 1997; Schwaab 1998]:

- die hohe Sicherheit der Diagnose – nur die Möglichkeit eines Mosaiks (s. 4.4, S. 67) kann in Familien mit sporadischen Fällen nicht ausgeschlossen werden
- die Durchführbarkeit der Methode auch in Familien mit sporadischen Fällen oder bei fehlender Angabe zur Familienanamnese, da hier eine Neumutation erkannt werden kann
- die Anwendbarkeit bei möglichen Konduktorinnen, in deren Familie kein Patient untersucht werden kann
- auch in Fällen unklarer Paternität kann eine sichere Diagnose erfolgen
- es müssen keine großen Familienuntersuchungen durchgeführt werden, die Proben von Patient und Ratsuchender/n sind ausreichend
- die Methode ist unabhängig von dem ethnischen Hintergrund der untersuchten Personen

Zu den Vorteilen der indirekten Diagnostik zählen:

- die technisch einfachere Durchführbarkeit selbst in kleinen Laboratorien und die damit verbundenen geringeren Kosten
- die Schnelligkeit der Untersuchung; die Mutationssuche kann, v.a. in Fällen eines negativen Screenings (s. 4.3.3, S. 65ff), sehr zeitintensiv sein; hier ist oft eine Vorabinformation der Familien möglich

Der direkte Mutationsnachweis ist die beste Methode, den zur Hämophilie führenden Defekt nachzuweisen und somit eine sichere Diagnose und Prophylaxe der HB durchzuführen. Bei Nichtinformativität oder in Ländern ohne die finanziellen Möglichkeiten eine direkte Diagnostik durchzuführen, sollten möglichst intragene Polymorphismen bei der indirekten Diagnostik verwendet werden [Peake 1995; Jones 1996]. Am IHG wurden seit 1992 bei Familienuntersuchungen meist beide Methoden angewendet. Die indirekte Diagnostik wurde im Laufe der Jahre doch zunehmend zugunsten der Sequenzanalyse eingeschränkt; diese wird heute für die Familiendiagnostik der HB im Prinzip ausschließlich angewendet.

Durch den Aufbau einer nationalen Datenbank, die Informationen zu Mutation, Stammbaum und hämatologischen Daten enthält, können Aussagen zum Schweregrad bestimmter FIX-Mutationen gemacht werden. Ist bei einer

familiären Hämophilie der Patient in der Datenbank bekannt, kann das in Frage kommende Exon sofort sequenziert oder durch eine Screening-Methode untersucht werden. Das Ergebnis liegt innerhalb weniger Tage vor und eine Aussage über den zu erwartenden Schweregrad der Erkrankung sowie das Risiko der Hemmkörperbildung ist möglich.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Ziel der Arbeit war die Vervollständigung der molekulargenetischen Untersuchungen der indirekten und direkten genomischen Diagnostik bei Familien mit Hämophilie B und das Erfassen der Daten. Aus den Daten sollte eine Darstellung der Informativität und Sicherheit der klinischen, indirekten und direkten Diagnostik bei der Konduktorinnen- und pränatalen Diagnostik erfolgen. Allel- und Heterozygotenfrequenzen, evtl. vorhandene Kopplungsungleichgewichte und Rekombinationsereignisse polymorpher Restriktionsorte sollten für die deutsche Population ermittelt werden. In diesem Rahmen sollten auch Möglichkeiten und Grenzen der Heteroduplexmethode als kostengünstige Methode zum Mutationsscreening bzw. zum Nachweis bekannter Mutationen aufgezeigt werden. In ausgewählten Familien sollte der Mutationsursprung bestimmt und eventuell vorhandene Foundereffekte nachgewiesen werden.
2. Für die Untersuchung standen 359 Probanden (hämostaseologisch bzw. klinisch voruntersuchte Indexpatienten mit HB sowie deren Familienangehörige) zur Verfügung. Die Patienten stammten aus der ganzen Bundesrepublik, der Großteil aus der nord-ost-deutschen Population. Die Überweisung der Probanden erfolgte in dem Zeitraum 1988 bis September 1999.
3. Mit Hilfe der PCR-Technik wurde die DNA der Patienten auf intra- und intergene RFLP untersucht. Proben von Patienten bzw. möglichen und sicheren Konduktorinnen mit fehlender Heteroduplexanalyse wurden für diese vorbereitet. Bereits vorhandene Daten einer Southern Blotting-Diagnostik (SacI-RFLP und Deletionsuche), Heteroduplexanalyse und Sequenzierung wurden in die Auswertung einbezogen.

4. Ausgehend von der Zielstellung ergaben sich folgende Resultate:

4.1 Nach Bestimmung von insgesamt 6 Polymorphismen im Bereich des FIX-Gens (DdeI, XmnI, TaqI, HhaI, SacI, MnlI – die beiden letztgenannten RFLP wurden nur bei einem Teil der Probanden bestimmt) waren 115 der untersuchten 131 möglichen Konduktorinnen (88%) heterozygot in mindestens einem der RFLP.

Nach indirekter Diagnostik bei 55 möglichen Konduktorinnen (nur in diesen Familien waren für die Untersuchung wichtige Familienmitglieder ebenfalls überwiesen worden) konnten 40 (85%) sicher als Konduktorinnen bestätigt oder ausgeschlossen werden. Bei 7 (15%) Frauen konnte keine Diagnose gestellt werden, da die Mutter des Patienten in allen untersuchten RFLP homozygot war

Durch einen großen Anteil an möglichen Konduktorinnen aus Familien mit sporadischer HB oder aus Familien wo zur Familienanamnese keine Angaben verzeichnet waren, konnte bei 12 der untersuchten Frauen zwar ein mit der HB gekoppelter Haplotyp ermittelt werden, da aber eine Neumutation bei dem Patienten nicht auszuschließen war, konnten diese nicht sicher als Konduktorinnen diagnostiziert werden.

In 3 Familien, in denen die HB mit dem auftreten eines junction Fragmentes im Southern blot gekoppelt ist, wurde durch den Nachweis bzw. Ausschluss aberranter Banden eine Aussage zum Konduktorinnenstatus getroffen.

Eine direkte genomische Diagnostik durch Sequenzierung bzw. Heteroduplexanalyse konnte für 94 der 131 möglichen Konduktorinnen durchgeführt werden. Bei 35 möglichen Konduktorinnen war eine direkte genomische Diagnostik nicht sicher möglich, da in der betreffenden Familie keine Mutation charakterisiert werden konnte. Bei 2 möglichen Konduktorinnen war der fehlende Nachweis nur bedingt als Hinweis auf einen negativen Konduktorinnenstatus zu werten, da in den Familien kein Patient in die Untersuchungen einbezogen werden konnte.

Insgesamt konnte für 122 der 131 (93%) möglichen Konduktorinnen durch Anwendung der indirekten bzw. direkten genomischen Diagnostik eine Aussage zum Konduktorinnenstatus gemacht werden.

4.2 Zum Untersuchungszeitpunkt konnte 76 der 78 (97%) Konduktorinnen im gebärfähigen Alter eine p.D. angeboten werden. 63 (81%) waren informativ für den Nachweis bzw. Ausschluss einer Mutation durch Sequenzierung bzw. Heteroduplexanalyse. 13 (16%) waren nur für die indirekte Diagnostik informativ.

Im Untersuchungszeitraum wurden 10 p.D. durchgeführt. In 9 Fällen konnte eine Diagnose mit Hilfe der direkten Diagnostik gestellt werden, in einem Fall war allein die indirekte Diagnostik informativ.

4.3 Um den Wert der Polymorphismen als diagnostische Segregationsmarker einschätzen zu können, wurden die Allelfrequenzen in der deutschen Population analysiert. Aufgrund der Allelverteilung war für die einzelnen Polymorphismen eine Heterozygotenfrequenz von 0,32-0,50 zu erwarten. Es zeigte sich, dass Kopplungsungleichgewichte zwischen den eng benachbarten RFLP für die Restriktasen TaqI (Intron 4), XmnI (Intron 3), DdeI (Intron 1) und MnlI (Exon 6) bestehen. Da es sich hier nicht um strenge Kopplungsungleichgewichte handelt, ist es dennoch sinnvoll, alle Marker zu untersuchen, da so in einzelnen Familien eine höhere Informativität erreicht werden kann.

4.4 Ein Rekombinationsereignis zwischen dem FIX-Gen und dem extragenen SacI-RFLP wurde festgestellt. Dieses entspricht einer Rekombinationsfrequenz von 1% in der untersuchten Probandengruppe.

4.5 Bei 116 von 125 (88%) untersuchten Patienten sowie bei 7 von 9 (78%) Konduktorinnen, in deren Familien eine Untersuchung des Patienten nicht möglich war, konnte eine Mutation charakterisiert werden. 91% dieser Mutationen konnten nach Haplotypanalyse als

unabhängig bestimmt werden. 85% der unabhängigen Mutationen betrafen die kodierende Sequenz des FIX-Gens, 4% die Promotorregion; 6% waren Spleißmutationen und 5% große Deletionen.

Es errechnete sich ein 20-fach gesteigertes Auftreten von Mutationen an CpG-Dinukleotiden.

In 5 Familien wurde ein wahrscheinlicher Mutationsursprung ermittelt.

Es fand sich eine höhere Mutationsrate in der männlichen Keimbahn.

- 4.6 Bei der Untersuchung der Heteroduplexanalyse stellte sich eine eingeschränkte Sensitivität für Mutationen im Bereich der Exons 1 und 8 dar.

6 Literatur

Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2003, Issue 1.

Anson DS, Choo KH, Ress DJG, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG: The gene structure of human antihemophilic factor IX. *Embo J* 1984; 3: 1053-1060.

Arveiler B, Oberle I, Vincent A, Hofker MH, Pearson PL, Mandel JL: Genetic mapping of the Xq27-q28 region: new RFLP markers useful for diagnostic applications in fragile-X and hemophilia-B families. *Am J Hum Genet* 1988; 42(2): 380-389.

Barnard R, Futo V, Pecheniuk N, Slattery M, Walsh T: PCR bias toward the wild-type k-ras and p53 sequences: implications for PCR detection of mutations and cancer diagnosis. *Biotechniques* 1991; 25(4): 684-691.

Biggs R, Douglas AS, MacFarlane RF: Christmas disease: A condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J* 1952; 2: 1378.

Bolton-Maggs PH und Pasi KJ: Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; 24; 361 (9371): 1801-1809.

Bottema CD, Ketterling RP, Vielhaber E, Yoon HS, Gostout B, Jacobson DP, Shapiro A, Sommer SS: The pattern of spontaneous germ-line mutation: relative rates of mutation at or near CpG dinucleotides in the factor IX gene. *Hum Genet* 1993; 91: 496-503.

Bottema CD, Ketterling RP, Yoon HS, Sommer SS: The pattern of factor IX germ-line mutation in Asians is similar to that of Caucasians. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 835-841.

Bottema CD, Bottema MJ, Ketterling RP, Yoon HS, Janco RL, Phillips JA-3d, Sommer SS: Why does the human factor IX gene have a G + C content of 40%?. *Am J Hum Genet* 1991b; 49(4): 839-850.

Bottema CDK, Ketterling RP, Li S, Yoon HS, Phillips JA, Sommer SS: Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: evidence that many of the amino acids in factor IX function as „spacer“ elements. *Am J Hum Genet* 1991a; 49: 820-838.

Bowen DJ, Thomas P, Webb CE, Bignell P, Peake IR, Bloom AL: Facile and rapid analysis of three DNA polymorphisms within the human factor IX gene using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1991; 77(4): 559-560.

Bowen DJ: Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55(2): 127-144.

Choo KH, Gould KG, Rees DJG, Brownlee GG: Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilia factor IX. *Nature* 1982; 299: 178-80.

Endres, M.: Möglichkeiten genetischer Familienberatung bei Gerinnungsstörungen unter besonderer Berücksichtigung der pränatalen Diagnostik. In: Kurme, A.: *Psychosoziale Aspekte bei Hämophilie und HIV*. Thieme, Stuttgart-New York 1994; S. 199-203.

Espinosa C, Casana P, Haya S, Cid AR, Aznar JA: Molecular analyses in hemophilia B families: identification of six new mutations in the factor IX gene. *Haematologica* 2003; 88(2): 235-236.

Eyster ME, Lewis JH, Shapiro SS, Gill F, Kajani M, Prager D, Djerassi I, Rice S, Lusch C, Keller A: The Pennsylvania hemophilia program 1973-1978. *Am J Hematol* 1980; 9: 277-286.

Giannelli F, Green PM: The X chromosome and the rate of deleterious mutations in humans. *Am J Hum Genet* 2000; 67(2): 515-517.

Gitschier J, Levinson B, Lehesjoki AE, DeLaChapelle A: Mosaicism and sporadic haemophilia: implications for carrier determination. *Lancet* 1989; 1: 273-274.

Glantz SA: *Primer of Bio-Statistics*. McGraw-Hill, New York, 1992.

Goodeve AC: Advances in carrier detection in haemophilia. *Haemophilia* 1998a; 4 (4): 358-364.

Goodeve AC: Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol* 1998b; 20 (1): 3-19.

Goodeve, A.C, Peake, I.R.: Diagnosis of hemophilia A and B carriers and prenatal diagnosis. In: Forbes C., Aledort L. und Madhok R.(Hrsg): *Hemophilia*. Chapman & Hall Medical, London 1997, S. 63-74.

Graham JB, Kunkel GR, Tennyson GS, Lord ST, Fowlkes DM: The Malmö polymorphism of factor IX: establishing the genotypes by rapid analysis of DNA. *Blood* 1989; 73(8): 2104-2107.

Graham JB, Kunkel GR, Egilmez NK, Wallmark A, Fowlkes DM, Lord ST: The varying frequencies of five DNA polymorphisms of X-linked coagulant factor IX in eight ethnic groups. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 537-544.

Green PM, Giannelli F, Sommer SS, Poon MC, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Figueiredo MS, Tagariello G and Brownlee GG: The Haemophilia B mutation database- version 12, 2003. <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>

Grossmann R, Mansouri-Taleghani B: Diagnostik und Therapie erworbener Faktoreninhibitoren. *Dtsch med Wschr* 1999; 124: 740-745.

Haldane JBS: The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet* 1935; 31: 317-326.

Hanauer A, de-la-Salle C: Direct detection of the deletion-insertion polymorphism of the factor IX gene by analysis of amplified DNA sequences (PCR). *Thromb Res* 1990; 59: 219-220.

Heit JA, Thorland EC, Ketterling RP, Lind TJ, Daniels TM, Zapata RE, Ordonez SM, Kasper CK, Sommer SS: Germline mutations in counseling patients with hemophilia B: pattern of mutation in counseling is similar to the putative endogenous germline pattern. *Hum Mut* 1998; 11: 372-376.

Herrmann, F.H., Schröder, W., Wehnert, M., Wulff K.: Zur genomischen Diagnostik in den fünf neuen Bundesländern. In: Kurme, A.: *Psychosoziale Aspekte bei Hämophilie und HIV*. Thieme, Stuttgart-NewYork 1994; S. 222-229.

Herrmann, F.H., Schröder, W., Wulff, K., Bendix, M., Wehnert, M., Anders, O., Aumann, V., Bratanoff, E., Ebener, U., Franke, D., Güldenring, A., Heinrichs, C., Lenk, H., Mitulla, B., Pindur, G., Seyfert, U.T., Thiele, H., Vogel, G., Weippert, M., Wendisch, J., Wenzel, E.: Genomische Diagnostik bei Hämophilie A und B – Ergebnisse einer multizentrischen zehnjährigen Zusammenarbeit. In: Scharrer, I. und Schramm, W. (Hrsg): *26. Hämophilie-Symposium Hamburg 1995*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1997, S. 261-267.

Herrmann, F.H., Scharrer, I.: *Humangenetische Beratung bei Hämophilie A und B*. Mitteilungen der Deutschen Hämophiliegesellschaft zur Bekämpfung von Blutungskrankheiten e.V. Sonderdruck 1995; 2: 1-30.

Hiller, E., Riess, H.: *Hämorrhagische Diathese und Thrombose: Grundlagen, Klinik, Therapie*. 2., neu bearb. Aufl. – Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 1998.

Hopff F: *Über die Hämophilie oder die erbliche Anlage zu tödlichen Blutungen*. Becker, Würzburg 1828.

Ivaskevicius V, Jurgutis R, Rost S, Muller A, Schmitt C, Wulff K, Herrmann FH, Muller CR, Schwaab R, Oldenburg J: Lithuanian haemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *Br J Haematol* 2001; 112(4): 1062-1070.

Jones P: *Guidelines for the development of a national programme for haemophilia*. WHO 1996.

Kadir RA, Sabin CA, Goldman E, Pollard D, Economides DL, Lee CA: Reproductive choices of women in families with haemophilia. *Haemophilia* 2000; 6(1): 33-40.

Kaufman RJ: Advances toward gene therapy for hemophilia. *Hum Gen Ther* 1999; 10(13): 2091-2107.

Ketterling RP, Bottema CD, Koeberl DD, Li S, Sommer SS: T296----M, a common mutation causing mild hemophilia B in the Amish and others: founder effect, variability in factor IX activity assays, and rapid carrier detection. *Hum Genet* 1991a; 87: 333-337.

Ketterling RP, Bottema CD, Phillips JA-3d, Sommer SS: Evidence that descendants of three founders constitute about 25% of hemophilia B in the United States. *Genomics* 1991b; 10: 1093-1096.

Ketterling RP, Drost JB, Scaringe WA, Liao DZ, Liu JZ, Kasper CK, Sommer SS: Reported in vivo splice-site mutations in the factor IX gene: Severity of splicing defects and a hypothesis for predicting deleterious splice donor mutations. *Human Mutation* 1999; 13 (3): 221-231.

Ketterling RP, Vielhaber E, Bottema CD, Schaid DJ, Cohen MP, Sexauer CL, Sommer SS: Germ-line origins of mutation in families with hemophilia B: the sex ratio varies with the type of mutation. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 152-166.

Ketterling RP, Vielhaber E, Sommer SS: The rates of G:C→T:A and G:C→C:G transversions at CpG dinucleotides in the human factor IX gene. *Am J Hum Genet* 1994; 54(5): 831-835.

Knobloch O, Zoll B, Zerres K, Brackmann HH, Olek K, Ludwig M: Recurrent mutations in the factor IX gene: founder effect or repeat de novo events. Investigation of the German haemophilia B population and review of de novo mutations. *Hum Genet* 1993; 92 (1): 40-48.

Knobloch, O. und Ludwig, M.: Molekularbiologie und Genetik der Hämophilie B. In: Müller-Berghaus, G., Pötzsch, B.(Hrsg):.Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1998. 149-171.

Koeberl DD, Bottema CD, Buerstedde JM, Sommer SS: Functionally important regions of the factor IX gene have a low rate of polymorphism and a high rate of mutation in the dinucleotide CpG. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 448-457.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J: An improved method of prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987; 317(16): 985-990.

Kurachi K, Davie EW: Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 6461-6464.

Lehesjoki AE, Rasi V, de-la-Chapelle A: Hemophilia B: diagnostic value of RFLP analysis in 19 of the 20 known Finnish families. *Clin Genet* 1990; 38: 187-197.

- Li X, Drost JB, Roberts S, Kasper C, Sommer SS: Factor IX mutations in South Africans and African Americans are compatible with primarily endogenous influences upon recent germline mutations. *Hum Mutat* 2000; 16(4): 371.
- Lillicrap D: The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia* 1998; 4(4): 350-357.
- Liu Q, Thorland EC, Sommer SS: Inhibition of PCR amplification by a point mutation downstream of a primer. *Biotechniques* 1997; 22(2): 292-300.
- Liu JZ, Li X, Drost J, Thorland EC, Liu Q, Lind T, Roberts S, Wang HY, Sommer SS: The human factor IX gene as germline mutagen test: samples from Mainland China have the putatively endogenous patterns of mutation. *Hum Mutat* 2000; 16(1): 31-36.
- Ljung R, Petrini P, Tengborn L, Sjorin E: Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. *Br J Haematol* 2001; 113(1): 81-86.
- Lyon MF: Possible mechanism of X-chromosome inactivation. *Nature New Bio* 1971; 232: 229-232.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- Mauser-Bunschoten EP, van-Houwelingen JC, Sjamsoedin-Visser EJ, van-Dijken PJ, Kok AJ, Sixma JJ: Bleeding symptoms in carriers of hemophilia A and B. *Thromb Haemost* 1988; 59(3): 349-352.
- Miller R: Counselling about diagnosis and inheritance of genetic bleeding disorders: haemophilia A and B. *Haemophilia* 1999; 5(2): 77-83.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16: 1215-1216.
- Montandon AJ, Green PM, Bentley DR, Ljung R, Kling S, Nilsson IM, Giannelli F: Direct estimate of the haemophilia B (factor IX deficiency) mutation rate and of the ratio of the sex-specific mutation rates in Sweden. *Hum Genet* 1992; 89: 319-322.
- Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Chaudhuri K, Ray K: Analysis of haemophilia B database and strategies for identification of common point mutations in the factor IX gene. *Haemophilia* 2003; 9(2): 187-192.
- Mulligan L, Holden JJ, White BN: A DNA marker closely linked to the factor IX (haemophilia B) gene. *Hum Genet* 1987; 75: 381-383.

Oldenburg J, Quenzel EM, Harbrecht U, Fregin A, Kress W, Muller CR, Hertfelder HJ: Missense mutations at ALA-10 in the factor IX propeptide: an insignificant variant in normal life but a decisive cause of bleeding during oral anticoagulant therapy. *Br J Haematol* 1997; 98: 240-244.

Oldenburg, J. und Brackmann, H.H.: Diagnostik, Klinik und Therapie der Hämophilie A und B. In: Müller-Berghaus, G., Pötzsch, B.(Hrsg): Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1998, S. 185-197.

Peake I: Genetic services available for counseling and prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia* 1998; 4 (Suppl 2): 24-25.

Peake I: Molecular genetics and counseling in haemophilia. *Thromb Haemost* 1995; 74(1): 40-44.

Peake I: Registry of DNA polymorphisms within or close to the human factor VIII and factor IX genes. For the Factor VIII/IX Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1992; 67 (2): 277-280.

Peake I, Tuddenham E: A standard nomenclature for factor VIII and factor IX gene mutations and associated amino acid alterations. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on Factor VIII and Factor IX. *Thromb Haemost* 1994; 72(3): 475-476.

Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicolaidis K, Tuddenham EGD: Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bull World Health Organ* 1993; 71 (3/4): 429-458.

Picketts DJ, Mueller Ch, Lillicrap D: Transcriptional Control of the factor IX gene: Analysis of five cis-acting elements and the deleterious effects of naturally occurring Hemophilia B Leyden mutations. *Blood* 1994; 84(9): 2992-3000.

Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: Modern treatment of haemophilia. WHO 1994.

Rickard, K.A.: The diagnosis of hemophilia A and B and von Willebrand's disease. In: Forbes, C.D., Aledort, L.M. und Madhok, R. (Hrsg): Hemophilia. Chapman & Hall Medical, London 1997, S. 53-62.

Rosendaal FR, Briet E: The increasing prevalence of haemophilia [letter]. *Thromb Haemost* 1990; 63(1): 145.

Rosner F: Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann Intern Med* 1969; 70: 833-837.

Saad S, Rowley G, Tagliavacca L, Green PM, Giannelli F: First report on UK database of haemophilia B mutations and pedigrees. UK Haemophilia Centres. *Thromb Haemost* 1994; 71(5): 563-570.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487-491.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 5463-5467.

Schiller WG, Hartmann G, Remde W: Todesursachen von Hämophiliepatienten in der DDR. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1985; 112(6): 845-852.

Schramm, W., Schulte-Hillen, J.: Todesursachen und Aids-Erkrankungen Hämophiler in der Bundesrepublik Deutschland – Umfrageergebnisse Oktober 1995. In: Scharrer, I.; Schramm, W.: 26. Hämophilie-Symposium: Hamburg 1995. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1997; S. 3-16.

Schröder W, Poetsch M, Gazda H, Werner W, Reichelt T, Knoll W, Rockicka-Milewska R, Zieleniewska B, Herrmann FH: A de novo translation 46, X,t(X;15) causing haemophilia B in a girl: a case report. *Brit J Haematol* 1993; 100: 750-757.

Schröder W, Wulff K, Wollina K, Herrmann FH: Haemophilia B in female twins caused by a point mutation in one factor IX gene and nonrandom inactivation patterns of the x-chromosomes. *Thromb Haemost* 1997; 78(5): 1347-1351.

Schwaab, R, Brackmann, H.H., Oldenburg, J.: Spektrum molekulargenetischer Methoden zur Untersuchung von hereditären Hämostasestörungen. In: Müller-Berghaus, G., Pötzsch, B.(Hrsg): Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1998, S. 216-227.

Sommer SS: Assessing the underlying pattern of human germline mutations: lessons from the factor IX gene. *Faseb J* 1992; 6: 2767-2274.

Sommer SS, Ketterling RP: The factor IX gene as a model for analysis of human germline mutations: an update. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1505-1514.

Sommer SS, Scaringe WA, Hill KA: Human germline mutation in the factor IX gene. *Mut Res* 2001: 487(1-2): 1-17.

Soucie JM, Evatt B, Jackson D: Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. *Am J Hematol* 1998; 59(4): 288-294.

Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503.

Tedgard U, Ljung R, McNeil TF: How do carriers of hemophilia and their spouses experience prenatal diagnosis by chorionic villus sampling? *Clin Genet* 1999b; 55: 26-33.

Tedgard U, Ljung R, McNeil TF: Long-term psychological effects of carrier testing and prenatal diagnosis of haemophilia: Comparison with a control group. *Prenat Diagn* 1999a; 19 (5): 411-417.

Wehnert M, Herrmann FH, Wulff K: Zur Molekulargenetik und genomischen Diagnostik (Carrierdiagnostik und pränatale Diagnostik) bei Hämophilie B. *Z Klin Med* 1988a; 43: 2195-2198.

Wehnert M, Kiessling U, Schütz M, Machill G, Wulff K, Herrmann FH: Modifiziertes Verfahren zur DNS-Präparation aus kultivierten und unkultivierten Fruchtwasserzellen und Choriongewebe. *Z med Lab-diagn* 1988b; 29: 126-127.

Wehnert M: Molekulargenetik ausgewählter X-chromosomaler Defekte des Menschen in der Region Xq26-28. *Sc. nat. Diss.*, Greifswald 1990.

White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, on behalf of the Factor VII and Factor IX Subcommittee: Definitions in Hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; 85: 560.

White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M: Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992; 12: 301-306.

Wilcox DE, Connor JM: Genetic counseling in hemophilia. In: Forbes, C.D., Aledort, L.M. und Madhok, R. (Hrsg): *Hemophilia*. Chapman & Hall Medical, London 1997, S. 76-85.

Winship PR, Anson DS, Rizza CR, Brownlee GG: Carrier detection in haemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 8861-8872.

Winship PR, Rees DJ, Alkan M: Detection of polymorphisms at cytosine phosphoguanadine dinucleotides and diagnosis of haemophilia B carriers. *Lancet* 1989; 1: 631-634.

Wollina K: Hämophilie B bei Mädchen - eine Übersicht. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 1996; 144 : 830-835.

Wulff K, Parrish JE, Herrmann FH, Wehner (1997) M. Six Novel Mutations in the Emerin Gene Causing X-Linked Emery-Deyfuss Muscular Dystrophy. *Human Mut* 9: 526-530

Wulff K; Schröder W; Herrmann FH: Molekulare Defekte bei 116 Hämophilie B (Faktor IX-Mangel)-Patienten und bei Patienten mit Faktor VII-Mangel. In: Herrmann FH (Hrsg.): Molekulargenetik hereditärer Hämostasedefekte.- Pabst, Lengerich 1996, S. 35-56.

Wulff K, Schröder W, Wehnert M, Herrmann FH: Twenty-five novel mutations of the factor IX gene in haemophilia B. *Hum Mutat* 1995; 6: 346-348.

Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K: Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochem J* 1985; 24: 3736-3750.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
cDNA	copy DNA
cM	centi Morgan
FIX	Gerinnungsfaktor IX
FIX:C	FIX-Gerinnungswert in IU/ml („factor IX coagulant activity“)
HB	Hämophilie B
HK	Hemmkörper
IHG	Institut für Humangenetik der Universität Greifswald
kb	Kilobasen (=10 ³ bp)
p.D.	pränatale Diagnostik
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PPSB	Prothrombinkomplex
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen

7.2 Tabellen

Tabelle 7.1: Erwartete und beobachtete Häufigkeiten der Haplotypen für jeweils zwei untersuchte Polymorphismen

Haplotyp	Anzahl untersuchte Chromosomen	Frequenz		
		beobachtet	erwartet ^a	signifikant verschieden ^b
TaqI/XmnI	237			
1/1	167	0,70	0,56	p<0,005
1/2	1	0,00	0,14	p<0,001
2/1	25	0,11	0,24	p<0,001
2/2	44	0,19	0,06	p<0,001
TaqI/DdeI	236			
1/1	75	0,32	0,22	p<0,005
1/2	90	0,38	0,48	p<0,05
2/1	1	0,00	0,10	p<0,001
2/2	70	0,30	0,20	p<0,001
TaqI/HhaI	233			
1/1	78	0,33	0,34	
1/2	88	0,38	0,36	
2/1	35	0,15	0,15	
2/2	32	0,14	0,15	
TaqI/SacI	105			
1/1	37	0,35	0,35	
1/2	41	0,39	0,35	
2/1	16	0,15	0,15	
2/2	11	0,10	0,15	
TaqI/MnlI	57			
1/1	33	0,58	0,50	
1/2	6	0,11	0,20	
2/1	9	0,16	0,22	
2/2	9	0,16	0,08	p<0,05
XmnI/DdeI	232			
1/1	74	0,32	0,26	
1/2	114	0,49	0,54	
2/1	2	0,01	0,06	p<0,005
2/2	42	0,18	0,14	
XmnI/HhaI	231			
1/1	94	0,41	0,40	
1/2	94	0,41	0,41	
2/1	17	0,07	0,09	
2/2	26	0,11	0,10	
XmnI/SacI	104			
1/1	41	0,39	0,40	
1/2	42	0,40	0,40	
2/1	11	0,11	0,10	
2/2	10	0,10	0,10	
XmnI/MnlI	57			
1/1	39	0,68	0,58	
1/2	9	0,16	0,22	
2/1	4	0,07	0,14	
2/2	5	0,09	0,06	
DdeI/HhaI	234			
1/1	33	0,14	0,16	
1/2	41	0,18	0,16	
2/1	81	0,35	0,33	
2/2	79	0,34	0,35	
DdeI/SacI	103			
1/1	15	0,15	0,16	
1/2	18	0,17	0,16	
2/1	37	0,36	0,34	

Haplotyp	Anzahl untersuchte Chromosomen	Frequenz		
		beobachtet	erwartet ^a	signifikant verschieden ^b
2/2	33	0,32	0,34	
DdeI/MnII	58			
1/1	15	0,26	0,23	
1/2	7	0,12	0,09	
2/1	28	0,48	0,49	
2/2	8	0,14	0,19	
HhaI/SacI	105			
1/1	25	0,24	0,25	
1/2	26	0,25	0,25	
2/1	28	0,27	0,25	
2/2	26	0,25	0,25	
HhaI/MnII	55			
1/1	15	0,27	0,35	
1/2	9	0,16	0,14	
2/1	26	0,47	0,37	
2/2	5	0,09	0,14	
SacI/MnII	22			
1/1	9	0,41	0,36	
1/2	4	0,18	0,14	
2/1	7	0,32	0,36	
2/2	2	0,09	0,14	

^a errechnet aus den in Tabelle 3.3 angegebenen Allelfrequenzen (Berechnung s.2.3, S. 23f.)

^b ermittelt durch χ^2 -Test (s. 2.3, S. 23) unter Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p

^a Kodon und Aminosäureaustausch nach [Anson et al. 1984]

^b S=schwer, M=moderat, L=leicht; k.A.= keine Angabe

^c T=Taql, X=XmnI, D=DdeI, H=HhaI, S=SacI, M=MnII; 1 und 2 bezeichnen die Ab- bzw. Anwesenheit einer Restriktionsstelle. Bei DdeI beschreibt 1 das Vorhandensein einer 50bp Insertion. Ein Bindestrich (-) weist auf eine nicht erfolgte Untersuchung des entsprechenden RFLP's hin

^d Unabhängig Haplotyp heißt, daß Patient individuellen Haplotyp trägt; unabhängig ethnisch heißt, daß der Patient einer anderer ethnischer Population angehört und die Mutation trotz eventuell gleichen Haplotyps als unabhängig zu betrachten ist.

^e Transition an CpG

^f Deletion

^g s. 3.5, S. 3.5f.

^h nach Knobloch und Ludwig 1998 wird bei unzureichender Haplotypisierung eine Mutation als unabhängig klassifiziert, wenn sie zu einem moderat-schweren Phänotyp führt. Sie wird dahingegen als nicht unabhängig klassifiziert, wenn sie zu einem leichten Phänotyp führt.

ⁱ Konduktorin ohne untersuchten Patienten in der Familie; der mit der Mutation assoziierte Haplotyp konnte durch untersuchte Familienmitglieder abgeleitet werden

Tabelle 7.3: *Ursprung und Art der Mutation bei Familien mit sporadischer HB*

Patient, Familie	Klinik ^a	Nukleotidnummer; Basenaustausch ^b	Kodon- nummer; Aminosäure- austausch	Mutations- ursprung und Alter() bei Konzeption
8135,B-HB-6	-	10497; TGT→TAT	Cys 82 Tyr	M (24)
9048,Nbg-HB-1	-	6460; CGA→TGA ^{cc}	Arg 29 Stop	M (28)
3215,F-HB-1	M	31262; GGA→AGA	Gly 381 Arg	MGV (27)
2705,K-HB-1	S	6420-25, delGAGAGA	delArg 15 Glu	MGV (26)
2722,D-HB-4	L	31008; ACG→AAG ^c	Thr 296 Lys	MGM (22)
3792,B-HB-4	Leyden	-20; T→A ^c	-	MGM(29)/MGV
2138,M-HB-1	S	keine	-	M(20)/MGV(-)
9189,Wü-HB-4	L	48, ATC→TTC ^c	Ile -40 Phe	? ^d
8478,Mü-HB-5	-	6364; CGG→TGG ^{cc}	Arg -4 Trp	? ^d
3282,F-HB-2	M	6427; TGT→CGT ^f	Cys 18 Arg	? ^d
3328,F-HB-4	L	30864; CGA→CAA ^{cc}	Arg 248 Gln	? ^d
3294,F-HB-3	M	31119; CGA→CAA	Arg 333 Gln	? ^d
965,L-HB-3	S	31170; TGT→TCT	Cys 350 Ser	? ^d
3918,B-HB-5	M	31217; GGG→TGG	Gly 366 Trp	? ^d
3299,D-HB-6	S	31241, G→T	Glu 374 Stop	? ^d
8027,Mü-HB-3	L	31342; TGG→TGC	Trp 407 Cys	? ^d
3667,Wü-HB-1	S + HK ^f	Deletion Exon 1-5		? ^d

^a S=schwer, M=moderat; L=leicht; (-)=nicht bestimmt

^b nach [Yoshitake et al. 1985]

^c gleiche Mutation in Green et al. 2003 beschrieben

^d sporadischer Fall von Hämophilie B, bei dessen Mutter die Mutation ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Der Ursprung der Mutation konnte nicht festgestellt werden, da die Großeltern mütterlicherseits nicht untersucht werden konnten.

^e Transition CpG

^f Hk=Hemmkörper