

**HÄMOGLOBINVARIANTEN:
KLINIK UND DIAGNOSTIK AM BEISPIEL EINER HbAC VARIANTE**

DARIUSCH AMIR SADRODDIN RASSOULIAN

Aus dem Adolf-Butenandt- Institut für Physiologische Chemie,
Stoffwechselbiochemie, Molekularbiologie und Zellbiologie

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert

**HÄMOGLOBINVARIANTEN:
KLINIK UND DIAGNOSTIK AM BEISPIEL EINER HbAC VARIANTE**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dariusch Amir Sadroddin Rassoulia

aus Celle

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. K. Bohlander

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2005

Meiner lieben Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG.....	8
1.1. Historischer Rückblick	8
1.2. Struktur, Funktion und Varianten von Hämoglobinen	9
1.3. Genetik der Hämoglobinsynthese	13
1.4. Hämoglobinvarianten.....	16
1.4.1. <i>Thalassämien</i>	16
1.4.2. <i>Hämoglobinopathien</i>	16
1.5. Klinische Relevanz.....	17
1.6. Analysemethoden	19
1.7. Zielsetzung	20
2. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.0.1. Untersuchungsablauf	21
2.0.2. Probenaufbereitung	22
2.0.3. Routine-Laboruntersuchungen.....	22
2.0.4. <i>Herstellung des Hämolysates</i>	22
2.1. Zelluloseacetat-Elektrophorese	24
2.1.1. <i>Prinzip</i>	24
2.2. Familienstudie	26
2.2.1. Probanden	27
2.3. HbA _{1C} Bestimmung mittels Mikrosäule.....	28
2.3.1. <i>Prinzip</i>	28
2.4. Zelluloseacetat-Elektrophorese mit 8M Harnstoff	30
2.4.1. <i>Prinzip</i>	30
2.5. PCR-Sequenzierung (In vitro DNA Amplifikation)	31
2.5.1. <i>Prinzip</i>	31
2.5.2. <i>DNA-Präparation</i>	35
2.5.3. <i>PCR-Protokoll</i>	36
2.5.4. <i>Ethidiumbromidgel-Elektrophorese</i>	38
2.5.5. <i>Prinzip</i>	38
2.6. Automatisierte Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produkts	39
3. ERGEBNISSE.....	40
3.1. Analyse einer Hämoglobinvarianten mittels Zelluloseacetat- Elektrophorese	40
3.2. Ergebnis der Familienstudie	42
3.2.1. <i>Hämatologische Daten</i>	43
3.3. Bestimmung des glukosylierten Hämoglobins/HbA _{1C} mittels eines Ionenaustauschers (Mikrosäule)	44
3.4. Analyse der Globine mittels Zelluloseacetat-Elektrophorese in Gegenwart von 8M Harnstoff bei einem Probanden mit HbAC (Autor)	45
3.5. PCR-Sequenzierung (in vitro DNA Amplifikation)	46
3.6. Automatisierte Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produkts	46
3.6. Automatisierte Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produkts	47
4. DISKUSSION	48
4.1. Methoden und eigene Ergebnisse	48
4.1.1. <i>Hb-Elektrophorese</i>	48
4.1.2. <i>Familienstudie und hämatologisches Screening</i>	50
4.1.3. <i>Zelluloseacetat-Elektrophorese in 8M Harnstoff</i>	50

4.1.4. <i>HbA_{1C} Bestimmung mittels Ionenaustauschchromatograph.....</i>	50
4.2. DISKUSSION DER KLINISCHEN BEDEUTUNG VON HÄMOGLOBIN C ..	51
4.2.1 <i>Heterozygote Form: HbAC.....</i>	51
4.2.2 <i>Homozygote Form: HbCC.....</i>	52
4.2.3 <i>Sichelzellanämie und ähnliche Varianten.....</i>	52
4.2.4 <i>Epidemiologie von Hämoglobinvarianten HbC und HbS</i>	54
4.2.5. <i>Prävalenz von HbS/ HbC vs. Malaria.....</i>	61
4.3. RICHTLINIEN ZUR UNTERSUCHUNG VON HÄMOGLOBINOPATHIEN ..	64
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	69
7. TABELLENVERZEICHNIS	70
8. LITERATURVERZEICHNIS	71
9. WEITERFÜHRENDE LITERATUR	78
10. DANKSAGUNG	79
11. LEBENS LAUF	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
Hpa I	Restriktionsendonuklease vom Haemophilus parainfluenzae
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICSH	International Committee for Standardization in Hematology
kb	Kilobase
mA	Milli Ampere
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
min	Minute
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
O ₂	Sauerstoff
o.ä.	oder ähnliches
o.g.	oben genannt
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ssDNA	Einzelstrang-DNA (single stranded)
Std.	Stunde(n)
TAS	Transkription-basiertes Amplifikationssystem
Taq	Bakterium Thermus aquaticus
T _m	Schmelztemperatur
n. Chr.	nach Christi Geburt

1. Einleitung

1.1. Historischer Rückblick

Humane Hämoglobine und ihre Varianten spielen nicht nur in der Medizin, sondern auch in der Molekularbiologie eine sehr wichtige Rolle. Ihre Untersuchung hat wesentlich zur Aufklärung grundlegender molekularbiologischer Phänomene beigetragen. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen waren essentiell zum Verständnis der Beziehung zwischen der Struktur des Hämoglobins (Hb) und seiner Funktion.

So dienten die Globingene u. a. als Modellsystem für die Erforschung der Struktur, der Expression und der Regulation von Genen (Jeffreys et al., 1979, Tilghman et al., 1978, Maniatis et al., 1978, Lawn et al., 1980). Auch die Evolution einer Genfamilie konnte exemplarisch an den Globingenen aufgezeigt werden (Kann und Dozy 1978).

Seit der Entdeckung von HbS durch Pauling wurden über 700 weitere abnormale Hämoglobine gefunden (Pauling et al., 1949). Neue Varianten des Globingens werden auch heute noch entdeckt. Die Literatur über die Hämoglobinvarianten und Globingenmutationen ist nahezu unbegrenzt. Seit 1998 existiert auch im Internet eine interaktive elektronische Datenbank bezüglich der humanen Hämoglobinvarianten (David et al., 1998, (<http://globin.cse.psu.edu>)).

Die detaillierte Kenntnis des Hämoglobinmoleküls erlaubt in vielen Fällen die resultierende Abnormalität aus der Hämoglobin-Gensequenz abzuleiten. Der Ersatz von Aminosäuren an der Oberfläche des Hämoglobinmoleküls hat im allgemeinen keinen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften, während kleine Veränderungen der internen apolaren Kontakte, insbesondere nahe der Hämgruppe, seine Eigenschaften drastisch verändern können. Eine Ausnahme ist HbS, bei dem das Glu (A3) β -6 an der Oberfläche der alpha-Helix durch Val ersetzt ist. Diese Substitution verursacht bei genügend hoher Konzentration von Deoxy-HbS das Aggregieren der Moleküle zu langen, starren semikristallinen Strukturen. Diese deformieren den Erythrozyten (Pfeil-Sichel-Zellen) und verursachen ihre vorzeitige Zerstörung (Lebensdauer ungefähr 20 Tage statt 120 Tage). Die Sichelzellanämie ist wegen ihrer hohen Frequenz in der schwarzen Bevölkerung ein bedeutendes Gesundheitsproblem. Von einem evolutionären Standpunkt gesehen bietet HbS einen gewissen Schutz gegen Blutparasiten wie z.B. Plasmodium falciparum

malariae. Patienten mit HbAS und HbSS sind weniger anfällig gegen Infektionen des Malariaerregers.

Kurz nach der Entdeckung von HbS wurde die HbC-Mutation als zweithäufigstes abnormales Hämoglobin entdeckt (Itano et al., 1950). Die homozygote Form wurde unabhängig voneinander bei Ranney et al., 1953 und Spaet et al., 1953 beschrieben. Das HbC führt meist zu einer leichten chronischen hämolytischen Anämie und zu Splenomegalie. Die HbC-Anlage (AC) (heterozygote Form des HbC) zeigt äußerst selten klinische Symptome. Das HbC-Gen wird autosomal rezessiv vererbt und verbindet sich mit einem HbS-Genträger zum HbSC. Die Bedeutung der HbC-Variante ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Sie bietet einen ähnlichen Schutz vor infektiösen, hämolytischen Erkrankungen wie Malaria.

1.2. Struktur, Funktion und Varianten von Hämoglobinen

Hämoglobin ist der eisenhaltige rote Blutfarbstoff in den Erythrozyten der Wirbeltiere. Hämoglobin hat vor allem die Aufgabe, Sauerstoff in der Lunge zu binden und über die Blutbahn in das Gewebe zu transportieren. Auf dem Rückweg durch den Körper nimmt das Hämoglobin einen Teil des Stoffwechselproduktes Kohlendioxyd (CO_2) mit zur Lunge. Von hier aus wird das Kohlendioxyd wieder abgegeben und ausgeatmet. Wegen seiner Aufgabe als Transportmolekül von Sauerstoff ist Hämoglobin für das menschliche Leben existentiell.

Neben der Transportfunktion für O_2 und CO_2 hat Hämoglobin durch freie $-\text{COO}^-/-\text{COOH}-$, $-\text{NH}_2/-\text{NH}_3^+$ -Gruppen und Histidin eine wichtige Pufferfunktion im menschlichen Organismus (30% der Gesamtpufferkapazität des Blutes).

Ein Hämoglobinmolekül besteht aus zwei verschiedenen Paaren von Polypeptidketten (Globine), die jeweils eine Hämgruppe beinhalten. Die Hämgruppe ist essentiell für den Sauerstofftransport. Die Globine schützen die Hämgruppe vor Oxidation, bestimmen die Löslichkeit des Moleküls und ermöglichen eine Veränderung der Sauerstoffaffinität.

Der überwiegende Anteil des adulten Hämoglobins der Erythrozyten des Erwachsenen liegt als Tetramer aus zwei α -Ketten (mit jeweils 141 Aminosäuren) und zwei β -Ketten (mit jeweils 146 Aminosäuren) vor. Eingebettet in jede Globinkette ist eine Hämgruppe. Sauerstoff wird über das Eisenmolekül dieser Hämgruppe transportiert .

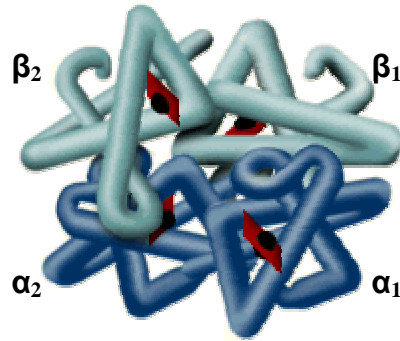


Abbildung 1: Quartärstruktur des Hämoglobinmoleküls
 α_1 , α_2 =jeweilige α -Globinkette; β_1 , β_2 =jeweilige β -Globinkette;
 Hämgruppe rot markiert.

Die Zusammensetzung des Hämoglobins ändert sich während der Entwicklung des Menschen. Ab der 12. Gestationswoche wird embryonales Hämoglobin durch fetales Hämoglobin HbF abgelöst, welches allmählich nach der Geburt durch adultes Hämoglobin HbA und HbA₂ ersetzt wird. Jeder Hämoglobintyp besteht aus zwei unterschiedlichen Peptidkettenpaaren: HbA hat die Struktur $\alpha_2\beta_2$ (zwei α -Ketten und zwei β -Ketten), HbA₂ besteht aus $\alpha_2\delta_2$ und HbF aus $\alpha_2\gamma_2$ (Abbildung 2, Tabelle 1).

Tabelle 1: Hämoglobintypen während der Altersentwicklung
 (+++ = sehr hoher, ++ = hoher, (+) = geringer Anteil)

Hämoglobin	Globinketten	Zeitperiode	
A	$\alpha_2\beta_2$	Erwachsenenalter	+++
A ₂	$\alpha_2\delta_2$	Erwachsenenalter	+
		neonatale / fetale Periode	(+)
F	$\alpha_2\gamma_2$	fetale Periode	+++
		neonatale Periode	++
		Erwachsenenalter	(+)
Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	intrauterin	++
Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	intrauterin	++
Portland 1	$\zeta_2\gamma_2$	intrauterin	++
Portland 2	$\zeta_2\beta_2$	intrauterin	++

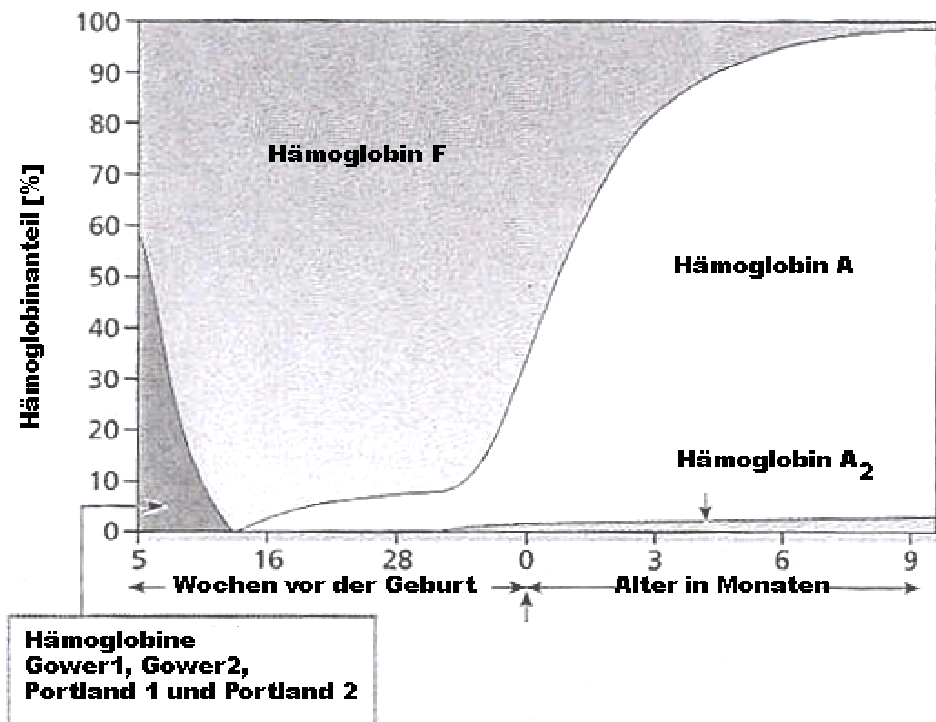


Abbildung 2: Anteil der Hämoglobine während der Altersentwicklung (modifiziert nach Harrison et al., 2002)

Neben dem normalen Hämoglobin in der postneonatalen Zeit gibt es zwei weitere Hämoglobine: HbA₂ und F.

Bei Erwachsenen macht das HbA₂ 2-3,5% des gesamten Hämoglobins aus. Der Anteil ist wesentlich geringer bei Geburt und steigt dann auf das Endniveau im Erwachsenenalter innerhalb der ersten zwei Lebensjahre an. Die funktionellen Eigenschaften ähneln dem HbA sehr (Steinberg et al., 1991). Die reduzierte Syntheserate des HbA₂ im Gegensatz zum HbA beruht auf einer langsameren Syntheserate der δ -Kette im Vergleich zur β -Kette (Steinberg et al., 1991). Patienten mit einer heterozygoten Form einer β -Thalassämie und einige Patienten mit instabilen Hämoglobinen haben einen erhöhten HbA₂-Anteil.

HbF macht während der intrauterinen Periode den Hauptanteil des Hämoglobins aus. Aufgrund einer im Vergleich zu HbA schwächeren Interaktion mit 2,3-DPG (2,3-Diphosphoglycerat) ist seine Sauerstoffaffinität höher als die des HbA, womit der Sauerstofftransport von der Mutter zum Fetus erleichtert wird. Seine Sauerstoffdissoziationskurve zeigt einen sigmoiden Verlauf (Abbildung 3).

Der Anteil an HbF wird beeinflusst durch Alter, Geschlecht (beim weiblichen Geschlecht geringgradig höher als beim männlichen Geschlecht) und durch eine Anzahl von vererbten Faktoren, die das β -Globin betreffen (Jane et al., 1998, Miyoshi et al., 1988, Merghoub et al., 1997, Craig et al., 1997, Tadmouri et al., 1998).

Die Hämoglobinstruktur ist sehr komplex. Sie kann auf vier verschiedenen Ebenen diskutiert werden:

1. Die Primärstruktur ist die Aminosäuresequenz des Polypeptids, welches die Globinkette bildet.
2. Die Sekundärstruktur ist die Anordnung der Polypeptidglobinketten in α -Helices. Die β -Globinkette besteht aus 8 α -Helices, gekennzeichnet von A bis H, wobei in der α -Globinkette der D-Helix-Anteil fehlt. 70-80% der Aminosäuren des Hämoglobinmoleküls bilden die Helices.
3. Die Tertiärstruktur stellt die dreidimensionale Anordnung der gewundenen Globinketten dar. Es enthält eine oberflächliche Hämgruppe in einer Tasche, die aus der E- und F-Helix geformt wird (s. Abbildung 1). Die starke Bindung der Hämgruppe mit zwei Histidinresten in der E- und F-Helix sind hierfür verantwortlich und essentiell für die Bildung der Sekundär- und Tertiärstruktur.
4. Die Quartärstruktur entspricht der Beziehung der vier Globinketten zueinander. Die starke dimerische Bindung zwischen $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_2$ bewirkt die stabile Form des Hämoglobinmoleküls, während die tetramerische Bindung zwischen $\alpha_1\beta_2$ und $\alpha_2\beta_1$ neben der Stabilität auch ein Hin- und Hergleiten und eine Rotation der Globinketten ermöglicht. Die charakteristische sigmoide Sauerstoff-Dissoziationskurve, der Bohr-Effekt und die Veränderung der Sauerstoff-Dissoziationskurve durch 2,3-DPG (2,3-Diphosphoglycerat) wird durch eine Veränderung in der Quartärstruktur ermöglicht.

Die Oxygenierung einer Hämgruppe verändert durch Interaktion der vier Globinketten die Form des Hämoglobinmoleküls derart, dass eine Oxygenierung einer anderen Hämgruppe begünstigt wird. Dieses Phänomen wird als Kooperativität bezeichnet und spiegelt sich in der Sauerstoff-Dissoziationskurve wieder (Abbildung 3).

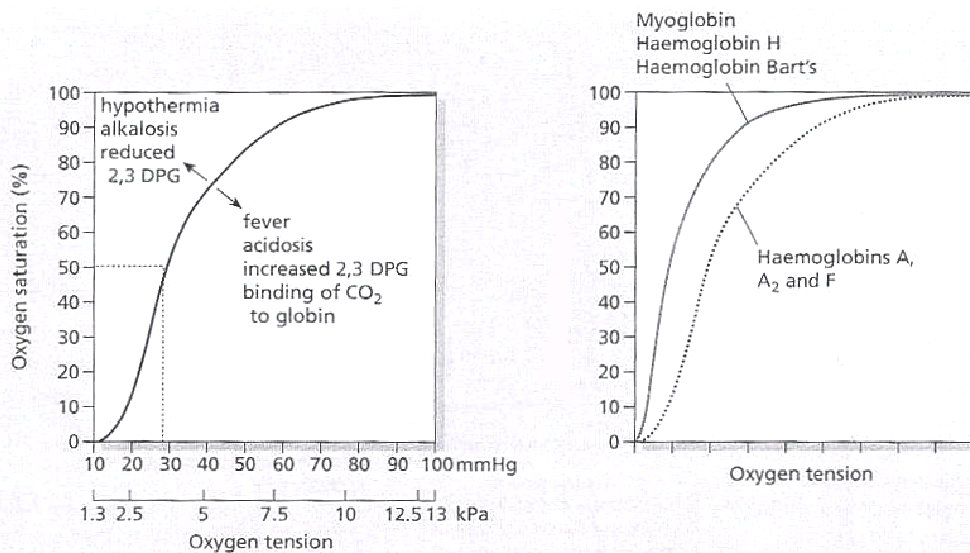


Abbildung 3: Normale Sauerstoff-Dissoziationskurve (links) und hyperbole Sauerstoff-Dissoziationskurve bei Myoglobin oder abnormem Hämoglobin (rechts)
 (aus Harrison et al., 2002)

1.3. Genetik der Hämoglobinsynthese

Die Hämsynthese wie auch die Synthese der α - und β -Globinketten erfolgt in erythroiden Vorstufen, angefangen von den Proerythroblasten bis hin zu den Retikulozyten. Für die Hämsynthese werden acht verschiedene Enzyme benötigt, die jeweils einer separaten genetischen Kontrolle unterliegen. Die verschiedenen Stadien der Hämsynthese finden in den Mitochondrien oder im Zytosol statt (Ponka et al., 1997).

Die Synthese der Globinketten erfolgt auf Ribosomen im Cytoplasma, wobei die δ -Kettensynthese bereits vor dem Retikulozytenstadium endet (Steinberg et al., 1991) (Abbildung 4).

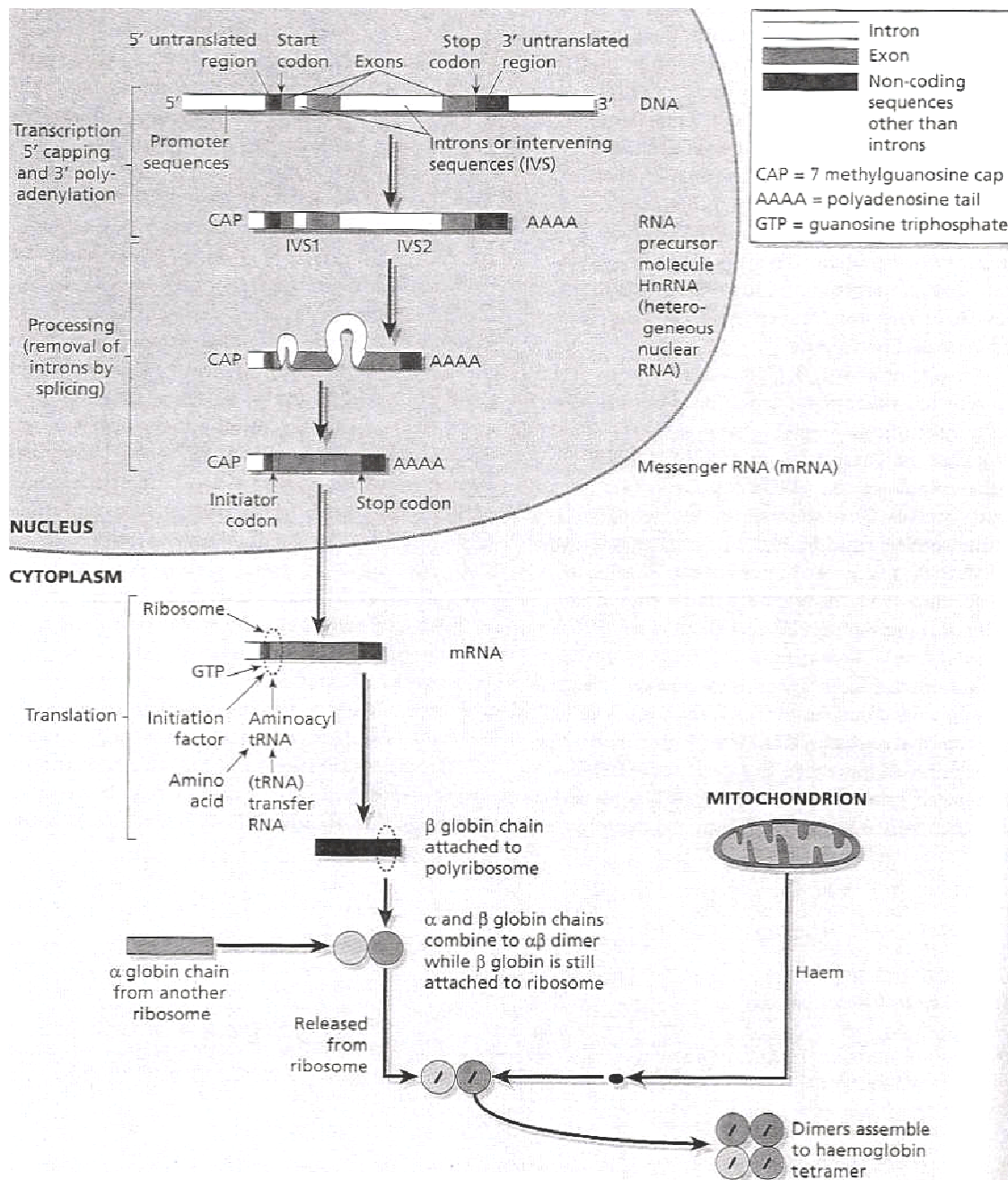


Abbildung 4: Synthese der β -Globinkette (aus Ponka et al., 1997)

Die Globingene lassen sich in zwei Gruppen einteilen: den α - und den β -Globingenkomplex (Cluster) (Abbildung 4).

Das menschliche α -Globingen wird dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p13.3) zugeordnet und erstreckt sich über ca. 40 kb (Deisseroth et al., 1977). Der Abstand zum Telomer weist eine polymorphe Bandbreite von 170-430 kb auf.

Die Gruppe der β -Globingene ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15.5) lokalisiert (Deisseroth et al., 1977; Gusella et al., 1978). Zusätzlich zu den bekannten

Genen enthalten die α - und β -Cluster auch Pseudogene (inaktive Gensequenzen, die transkribiert werden) (Abbildung 5).

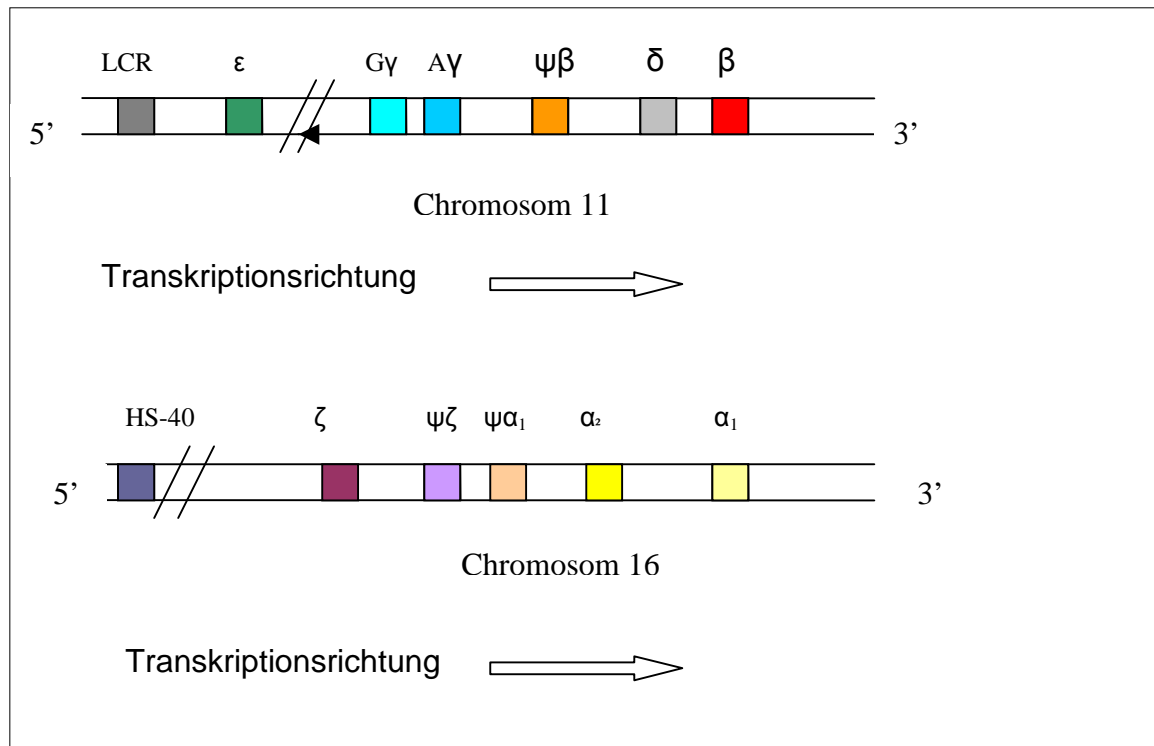


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Hämoglobin-Genloci

Der α -Globin-Komplex auf Chromosom 16 besteht aus einem ζ -Gen, einem Pseudo- ζ -Gen ($\psi\zeta$), einem Pseudo- α -Gen ($\psi\alpha$) und 2 α -Genen (α_2 und α_1). Der β -Globin-Komplex auf Chromosom 11 besteht aus einem ϵ -Gen, 2 γ -Genen ($G\gamma$ und $A\gamma$), einem Pseudo- β -Gen ($\psi\beta$), einem δ -Gen und einem β -Gen.

Da die α -Ketten Bestandteil sowohl des fetalen als auch des adulten Hämoglobins sind, haben Veränderungen dieses Hämoglobins Auswirkungen auf die Hämoglobinproduktion sowohl im fetalen als auch im Erwachsenenalter. Erkrankungen aufgrund einer defekten β -Globinsynthese können sich nur nach der Geburt manifestieren, wenn HbF durch HbA ersetzt wird.

Zwischen den Individuen besteht eine breite Variabilität bezüglich des α - und β -Gen-Clusters. Alle Globingene weisen in ihrer Sequenz mehr oder weniger große Homologien auf und sind wahrscheinlich durch eine Serie von Duplikationen aus einem einzigen, schon vor 600 Millionen Jahren existierenden Urglobin entstanden (Efstratiadis et al., 1980). Daher ist die Struktur aller aktiven Globingene sehr ähnlich.

1.4. Hämoglobinvarianten

Man unterscheidet zwei Arten von hereditären Hämoglobingendefekten: Thalassämien und Hämoglobinopathien.

1.4.1. Thalassämien

Thalassämien entstehen durch Synthesestörungen des Hämoglobins. Die Hämoglobinketten sind in ihrer Sequenz normal, aber ihre Quantität ist reduziert oder eine Globinkette fehlt vollständig. Je nachdem, ob die Synthese des α - oder β -Globins betroffen ist, unterscheidet man α - und β -Thalassämien. Ursächlich bei den α -Thalassämien ist meistens eine Deletion (Higgs et al., 1983) und bei den β -Thalassämien eine Punktmutation (Spiegelberg et al., 1989).

1.4.2. Hämoglobinopathien

Die Hämoglobinketten sind in Ihrer Quantität normal, aber Ihre Sequenz ist verändert. Aus diesem Grund werden die Hämoglobinopathien auch als strukturelle Hb-Varianten bezeichnet. Bisher sind über 1000 Varianten des Hämoglobins beschrieben (Huisman et al., 1996), wobei der überwiegende Anteil durch Punktmutationen verursacht ist. Die resultierenden Krankheitsbilder sind sehr unterschiedlich. Eine Hämoglobinvariante kann klinisch unauffällig sein oder schon im Kindesalter zum Tode führen. Die Mehrzahl ist klinisch benigne und wird oft zufällig entdeckt. Die klinisch relevanten Varianten sind oft Folge einer Aminosäuresubstitution in der Partnerkette der α -Kette, die eine Veränderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Hb-Tetramers bedingt. Diese Substitutionen sind am häufigsten nahe der Hämgruppe positioniert.

Die Nomenklatur der Hämoglobinopathien ist eine Mischung aus Buchstaben (z.B. HbC, D, S), Städtenamen / Orte des ersten Auftretens oder des Entdeckers (z.B. Hb Okayama) und Familiennamen (z.B. Hb Lepore). Anhand der Nomenklatur kann man eindeutig die Globinkette, die Lokalisation und die Aminosäuresubstitution der betroffenen Kette ablesen. So bedeutet z.B. Hb Alberta (β 100 Pro \rightarrow Ala) die Substitution eines Prolinrests durch einen Alaninrest in der 100. Position auf der β -

Kette. Bei heterozygoten Trägern wird das normale Hämoglobin an erster Stelle genannt, gefolgt von der Variante, z.B. HbAC.

Die Unterscheidung zwischen Thalassämien und Hämoglobinopathien ist nicht immer eindeutig. „Thalassämische“ klinische Manifestationen können auch Folge einer Aminosäuren-Substitution sein, die zu einem instabilen Hämoglobin führt. Hämoglobinopathien und Thalassämien sind weit verbreitete Erbkrankheiten.

1.5. Klinische Relevanz

Viele Hämoglobinvarianten sind klinisch phänotypisch auffällig. Dazu gehören:

- fetale Sterblichkeit intrauterin (homozygote α -Thalassämien)
- schwere Anämien mit lebenslanger Transfusionssubstitutions-Therapie (β -Thalassaemia major)
- erhöhte Sterblichkeit im Kindesalter und vaso-okklusive Ereignisse, die in ein Multi-Organversagen führen (Sichelzellerkrankheit)
- hämolytische Anämien (instabile Hämoglobinvarianten)
- Zyanosen (Methämoglobine)
- Erythrozytosen

Generell gilt als beste Therapie bei allen genetischen Störungen die Prävention (falls möglich). Die Prävention beinhaltet die genetische Beratung mit Evaluierung des individuellen Risikos für die Entwicklung der Anomalie. Im Falle der Hämoglobinvarianten und Thalassämien ist die Genetik bekannt. Die pränatale Diagnostik (Screening) ermöglicht auch eine frühe Diagnose mit Bereitstellung einer adäquaten Therapie, bevor die Anomalie klinisch offensichtlich wird.

Tabelle 3: Auflistung der häufigsten Hämoglobinvarianten/ Thalassämien, Klinik und Diagnostik

Normales adultes Hämoglobin			
HbA	$\alpha_2\beta_2$ (97%)		
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$ (2.5%)	erhöht bei heterozygoter Form der β -Thalassämie	
HbF	$\alpha_2\gamma_2$ (<1%)	erhöhter Anteil begünstigt Sichelzellerkrankheit	
Krankheiten	Genotyp	Klinik	Diagnose
α -Thal-2	1 α -Kette betroffen	unauffällig	DNA-Analyse, Familienanamnese
α -Thal-1	2 α -Ketten betroffen	Mikrozytose, milde Anämie (3. Lebensjahrzehnt)	DNA-Analyse, Familienanamnese
HbH	3 α -Ketten betroffen	Mikrozytose, Hämolyse, Splenomegalie, moderate Anämie	DNA-Analyse, Familienanamnese, Heinz-Körperchen
β -Thal. minor	1 β - Kette betroffen	Mikrozytose, Targetzellen, moderate Anämie (3. Lebensjahrzehnt)	Hb-Elektrophorese
β -Thal. major	2 β -Ketten betroffen	Schwere Anämie, Hämolyse	Hb-Elektrophorese
β -Thal. intermediär	2 β -Ketten betroffen mit normaler residualer β -Ketten Produktion	Variabel zwischen minor und major Thal.	Hb-Elektrophorese
HbAE	$\alpha_2\beta_1\varepsilon_1$	Mikrozytose, keine Anämie	Hb-Elektrophorese
HbE	$\alpha_2\varepsilon_2$	Mikrozytose, Targetzellen, keine Anämie	Hb-Elektrophorese
HbCC	$\alpha_2\beta_2$ ^{6Glu→Lys}	hämolytische Anämie, Mikrozytose, Targetzellen	Hb-Elektrophorese
Sichelzellerkrankheit	HbS	Sichelzellerkrankheit	Hb-Elektrophorese
heterozygote Form der Sichelzellerkrankheit	HbAS	unauffällig	Hb-Elektrophorese
HbSC	HbS/HbC	moderate Form der Sichelzellerkrankheit, Targetzellen, Splenomegalie	Hb-Elektrophorese
HbS-Thal.	HbS/ β -Thal. Gen	schwere Sichelzellerkrankheit mit Mikrozytose	Hb-Elektrophorese
α -Thal./ β -Thal. major	α -Thal./ β -Thal. major	β -Thal.	Hb-Elektrophorese
HbE/ β -Thal.	HbE/ β -Thal.	β -Thal. major	Hb-Elektrophorese

1.6. Analysemethoden

Molekularbiologische Techniken – der Einsatz von DNA-Proben und DNA-Amplifikation – haben die Diagnostik in der Medizin revolutioniert. Die klinische Anwendung dieser nützlichen molekulargenetischen Arbeitsmethoden nimmt immer mehr zu. Techniken zur Analyse von DNA-Proben werden heutzutage in vielen Bereichen der Medizin benutzt, um schnell diagnostische Ergebnisse zu erzielen. DNA-Amplifikationstechniken wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die Ligase-Ketten-Reaktion (LCR) und auf Transkription basierende Amplifikationssysteme (TAS) etablieren sich zunehmend in der Routine als Standard.

Diese Techniken sind inzwischen ein integraler Teil der klinischen Chemie geworden, insbesondere in der Hämatologie/Onkologie und Mikrobiologie.

Seit 1975 liegt eine Empfehlung zur Diagnostik von Hämoglobinvarianten und Thalassämien vom Internationalen Komitee zur Standardisierung in der Hämatologie vor (ICSH Standard 1975). Diese Empfehlung richtet sich vor allem auf die systematische Neuentdeckung von Hämoglobinvarianten. Da die Wahrscheinlichkeit, eine neue Variante des Hämoglobins zu entdecken inzwischen sehr gering ist, haben wir in Anlehnung an diese Empfehlung das Ausmaß unserer Untersuchungen bewusst rationalisiert.

In dieser Arbeit wurde bei der Untersuchung einer Hämoglobinanomalie auf eine hohe Effizienz, einfache Reproduzierbarkeit und Spezifität der benutzten Untersuchungsmethoden Wert gelegt. Insbesondere wird exemplarisch die Polymerase-Kettenreaktion mit biotinylierten Primern an der untersuchten Hb-Mutante dargestellt.

Bei der Identifikation einer Störung der Hämoglobinketten-Synthese benötigt man meistens eine Kombination von Untersuchungen. Oft zeigen die Routine-Laboruntersuchungen nur die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Hämoglobins an und ermöglichen selten eine präzise Identifikation der Hämoglobinvariante. Für eine effektive Identifikation in der Klinik sind mindestens zwei Untersuchungstechniken erforderlich, wobei die Ergebnisse in Zusammenhang mit der speziellen Klinik, der ethnischen Herkunft des Patienten und dem dazugehörigen Blutaussstrich betrachtet werden sollten (British Committee for Standards in Hematology, 1998).

Die Prinzipien der einzelnen Techniken und ihre Auswahl werden in Kapitel 2 dargestellt und in Kapitel 4 diskutiert (Wild et al., 2000).

1.7. Zielsetzung

Gegenstand der Untersuchung war eine Hämoglobinanomalie, die zufällig im Rahmen des vorklinischen Biochemie-Praktikums beim Autor elektrophoretisch entdeckt wurde. Ziel war es, mit einfachen Mitteln ein effizientes und spezifisches Verfahren zur Identifikation der unbekanntes Hb-Mutanten zu entwickeln. Die entdeckte Hb-Mutante wird im Anschluß bezüglich ihrer Epidemiologie und Klinik diskutiert. Exemplarisch werden schrittweise die einzelnen Untersuchungsmethoden zur Identifikation einer Hämoglobinvariante dargestellt und diskutiert.

2. Material und Methoden

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war die Identifikation einer im Praktikum der physiologischen Chemie aufgefundenen Hämoglobinmutante. Darauf aufbauend entwickelten wir in Anlehnung an die ICSH-Empfehlungen (1990) Schritte zur systematischen Analyse einer Hämoglobinanomalie.

Basisinformationen betrafen den klinischen Zustand des „Anomalie-Trägers“ sowie dessen hämatologische Daten (Blutausstrich, großes Blutbild inklusive Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin). Weitere Untersuchungen umfassten die Bestimmung von fetalem Hämoglobin und Methämoglobin. Familienangehörige wurden soweit erreichbar konsequent einem Screening unterzogen.

2.0.1. Untersuchungsablauf

Anhand einer einfachen Zelluloseacetat-Elektrophorese mit einem Veronalpuffer wurde die Existenz einer Mutante nachgewiesen. Anschließend wurde in einer zweiten Acetat-Elektrophorese mit Barbituralpuffer nach Schneider in 8M Harnstoff die mutierte Kette des Hämoglobinmoleküls dargestellt (Schneider et al., 1980). Als Proben dienten hier jeweils 20 µl Erythrozyten-Hämolysat. Nach der Lokalisierung der Mutanten erfolgte eine Gen-Analyse: Amplifikation und Sequenzierung der codierenden Abschnitte des β -Hämoglobingens wurden auf der Grundlage von Molchanova et al. durchgeführt aber mit folgenden signifikanten Modifikationen (Molchanova et al., 1993) :

- Benutzung eines biotinylierten Primers
- Benutzung eines Drei-Stufen-Zyklus bei der PCR
- Ein-Schritt-Amplifikation

Simultan wurden DNA-Proben zur Qualitätssicherung an eine unabhängige Biotechnologiefirma zur automatisierten Sequenzierung gesendet.

2.0.2. Probenaufbereitung

Laboruntersuchungen bei Verdacht auf Hämoglobinvarianten werden in der Regel mit venösen Blutproben (mit einem EDTA als Antikoagulant versetzt) durchgeführt. Bei Kindern kann man alternativ antikoaguliertes Kapillarblut, z.B. Fersenblut benutzen. Bei Neugeborenen kann man Nabelschnurblut oder Kapillarblut verwenden. Um die Gefahr der mütterlichen Kontamination zu verringern, sollte man Nabelblut direkt aus der Umbilicalvene mit einer sterilen Kanüle entnehmen und keinesfalls durch „Ausdrücken“ der Nabelschnur (ICSH, 1988).

Die Blutproben sollten bei 4°C gelagert werden und idealerweise innerhalb einer Woche untersucht werden, da längere Lagerung durch Denaturierung des Hämoglobins zu unschärferen Banden in der Elektrophorese führt (British Committee for Standards in Hematology, 1998).

2.0.3. Routine-Laboruntersuchungen

Ein großes Blutbild und ein Blutausstrich sind immer bei einem Verdacht auf eine Hämoglobinabnormität indiziert. Ausnahme bildet nur das neonatale Screening bei Hämoglobinopathien, da häufig nur eine geringe Menge Blut für die Untersuchung zur Verfügung steht. Das große Blutbild ist bei der Differentialdiagnose von Thalassämien und bei einer Persistenz von HbF essentiell. Bei Zeichen von Polychromasie im Blutausstrich, bei Verdacht auf HbH und bei instabilen Hämoglobinen ist eine zusätzliche Retikulozytenbestimmung indiziert.

2.0.4. Herstellung des Hämolysates

Alle weiteren Untersuchungen wurden mit hämolysiertem Blut der Probanden durchgeführt. Die Herstellung des Hämolysates erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Betke (1960). Die Art und Weise, wie man das Hämolysat herstellt kann die Identifikation einer gesuchten Hämoglobinvariante beeinflussen (Lafferty et al., 1998). Die Erythrozyten wurden zunächst gewaschen, um alle nicht erythrozytären Anteile zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde die Erythrozytenmembran zerstört und die Hämoglobinlösung durch Zentrifugation von den restlichen Erythrozytenbestandteilen getrennt.

Reagenzien:

- 0,3%ige NaCl-Lösung in Aqua dest.
- 1,2%ige NaCl-Lösung in Chloroform

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen

Vorgehen:

1. Das mit einem Antikoagulant versetzte Blut (ca. 2-3 ml Zitratvenenblut aus der Armvene) wurde mit etwa dem zweifachen Volumen 0,9%iger NaCl-Lösung vermischt und anschließend über 3 Minuten bei 5000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Es folgte eine letzte Waschung mit 1,2%iger NaCl-Lösung und anschließender Zentrifugation bei 5000 Umdrehungen/min jeweils über 3 Minuten.
2. Das gewaschene Erythrozytensediment wurde daraufhin mit der einfachen Menge Aqua dest. versetzt und aufgeschüttelt. Zu dieser Erythrozytensuspension wurde eine 0,5 fache Menge an Chloroform hinzugegeben.
3. Das Hämolysat wurde über 20 Minuten bei 5000 Umdrehungen/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun keine trüben Anteile mehr. Die Hämoglobinkonzentration im Überstand betrug meist zwischen 80 und 100 g/l (photometrisch ermittelt). Der Überstand wurde abpipettiert und stand zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung. Es wurden Aliquots mit ca. 80 µl hergestellt, die bei -20°C gelagert wurden.

2.1. Zelluloseacetat-Elektrophorese

2.1.1. Prinzip

Die Hb-Elektrophorese ist eine einfache und immer noch die bevorzugte Methode zur initialen Bestimmung und Charakterisierung einer Hämoglobinvariante (ICSH, 1978). Die HPLC (high performance liquid chromatography) kommt jedoch zunehmend zum Einsatz. Elektrophoretische Trennverfahren beruhen darauf, dass Proteine – in Abhängigkeit von ihrer Ladung und Größe – im elektrischen Feld unterschiedlich schnell wandern. Besteht zwischen verschiedenen Hämoglobinen ein genügend großer Unterschied bezüglich mindestens einem dieser beiden Kriterien, so werden sie auf der Zellulose-Acetatfolie aufgetrennt. Mit dieser Methode lassen sich eine große Anzahl Hb-Fraktionen exakt trennen. Generell kann die Hb-Elektrophorese neben der Zellulose-Acetatfolie auch mit Filterpapier, Stärkegel oder Agarosegel durchgeführt werden.

Wir führten eine initiale Zelluloseacetat-Elektrophorese bei alkalischem pH (8,2-8,6) durch, da sie die gängigen Hämoglobin-Varianten wie HbA, F, S/G/D, C/O-Arab, H und eine Anzahl von weniger häufigen Hämoglobin-Varianten detektieren konnte. Eine Kontrollprobe mit HbA wurde mituntersucht. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde die Zellulose-Acetatfolie visuell beurteilt, densitometrisch gescannt und fotografiert.

Reagenzien:

- Hämolysat A: Autor
- Hämolysat B: Kontrolle (MTA)
- Veronalpuffer 50 mM, pH 8,6, 0,5% β -Mercapto-Ethanol
- Methanol-, Essigsäure- und Transparenzlösung
(Eisessig:Methanol:Ethanol = 1:2:2)
- Ponceau S (Farbstoff)
- Amidoschwarz (Farbstoff)

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen
- Zellulose-Acetatfolie
- Objektträger

Geräte:

- Elektrophoresesystem
- Spezialauftragegerät
- Canon AE-1 Spiegelreflexkamera

Vorgehen:

1. Die Elektrophoresekammern wurden mit Veronalpuffer aufgefüllt.
2. Equilibrieren der Zellulose-Acetatfolie: Die Folie wurde mit der matten Seite nach oben flach auf die Pufferlösung gegeben. Nach vollständiger Benetzung wurde diese für ca. 20 Minuten in die Lösung eingetaucht.
3. Einspannen der Folie.
4. Die Kammern wurden für 3-5 Minuten bei 250 Volt und 2-5 mA an eine Stromquelle angeschlossen, wodurch eine gleichmäßige Ionenverteilung innerhalb der Folie erreicht wurde.
5. Auftragen des Hämolysates mit dem Applikator bei abgeschalteter Stromquelle. Es wurden jeweils ca. 25 µl Hämolysat in eine 4 mm breite Tasche aufgetragen. Als Startlinie wurde die Folienmitte gewählt (Auftragsmodus siehe Tabelle 3).

Tabelle 4: Auftragsmodus bei der Zelluloseacetat-Elektrophorese, pH 8.6

Objektträger 1			Objektträger 2		
Bahn 1	Bahn2	Bahn3	Bahn 4	Bahn5	Bahn6
Hämolysat B	Hämolysat B	Hämolysat A	Hämolysat A	Hämolysat B	Hämolysat A

6. Anlegen einer Spannung von 250 Volt über 25 Minuten, Stromstärke 2-5 mA.
7. Nach Ende der Elektrophorese wurde die Folie herausgenommen und sofort gefärbt.

8. Eiweißfärbung mit der Ponceau S-Lösung: Die Folie wurde für ca. 5 Minuten in die Ponceau-Farblösung gelegt. Im Anschluss daran wurde die Folie dreimal für jeweils 5 Minuten in einer Methanol:Essigsäure (9:1) Lösung geschwenkt und dadurch entfärbt und fixiert. Analog wurde bei der Amidoschwarzfärbung vorgegangen.
9. Transparentmachen der Folie: Die Folie wurde durch ein 1-2 minütiges Methanolbad dehydriert. Sie wurde dazu für eine Minute in die Transparenzlösung gelegt und anschließend auf den mit Methanol gereinigten Objektträger aufgezogen.
10. Trocknen im Wärmeschrank bei ca. 100°C für ca. zwei Stunden.
11. Die Auswertung erfolgte visuell.

2.2. Familienstudie

Es wurden sämtliche erreichbare Mitglieder der Familie klinisch charakterisiert und ihr Hämoglobin durch ein einfaches Screening mittels o.g. Zellulose Acetatelektrophorese (siehe Kapitel 2.1.) auf eine mögliche Mutation untersucht (Auftragsmodus: siehe Tabelle 4).

Tabelle 5: Auftragsmodus Elektrophorese Familienstudie

Tasche 1	Autor
Tasche 2	Mutter
Tasche 3	Vater
Tasche 4	1. Bruder
Tasche 5	2. Bruder
Tasche 6	1. Schwester
Tasche 7	2. Schwester
Tasche 8	Kontrolle (normaler Hb-A-Träger)

2.2.1 Probanden

1. Autor	D.R.	geb. 17.05.1971 in Celle
2. Mutter	S:R.	geb. 27.02.1946 in Teheran
3. Vater	E.R.	geb. 22.01.1936 in Teheran
4. Bruder	K.R.	geb. 21.03.1969 in Erlangen
5. Bruder	S.R.	geb. 11.11.1976 in Hannover
6. Schwester	A.R.	geb. 22.06.1978 in Hannover
7. Schwester	A.R.	geb. 22.06.1978 in Hannover
8. Kontrolle	J.O.	gesicherter HbA-Träger

Jeweils 5-10 ml Armvenenblut, wurden mit 3,8%iger Natriumcitrat-Lösung versetzt und jeweils 5-10 ml Armvenenblut mit EDTA versetzt. Die Blutproben wurden über den Hausarzt in ein Routinelabor zur Untersuchung weitergeleitet.

Tabelle 6: Laborchemische Untersuchungen der Familienmitglieder

Autor	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
Mutter	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
Vater	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
1. Bruder	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
2. Bruder	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
1. Zwillingschwester (homozygot)	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
2. Zwillingschwester (homozygot)	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin
Kontrolle (normaler Hb-A-Träger)	Erythrozytenzahl, Hb, MCHC, MCH, MCV, Ferritin, Transferrin

2.3. HbA_{1c} Bestimmung mittels Mikrosäule

2.3.1. Prinzip

Die hier vorgestellte Mikrosäulenmethode ist ein chromatographisches Verfahren, mit dem die HbA_{1c} -Fraktion bzw. verschiedene Hb-Fraktionen isoliert und sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmt werden können. Bei der Ionenaustauschchromatographie werden mittels eines Ionenaustauschers die verschiedenen Hämoglobinkomponenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung aufgetrennt. Im hier beschriebenen Verfahren wird ein Kationenaustauscher angewandt. Ein solcher Ionenaustauscher besteht aus inertem Trägermaterial, an das kovalent negativ geladene funktionelle Gruppen gebunden sind. Jedes an den Austauscher gebundene Ion ist ein Gegenion zu den geladenen funktionellen Gruppen. Die Mischung der zu trennenden Ionen (hier Hämoglobinmoleküle mit leicht unterschiedlicher Gesamtladung) wird mit dem Austauscher inkubiert, so dass sich die Ionen an die funktionellen Gruppen binden können. Das Globin im Hämoglobin besitzt, wie alle Proteine, gleichzeitig positive und negative Ladungen. Die Gesamtladung eines Proteins hängt innerhalb gewisser Grenzen vom pH-Wert der Lösung ab. Mit der Gesamtladung ändert sich auch die Bindung an einen Austauscher (Cooper, 1981). Nach Auftragen des Hämoglobingemisches auf die Säule werden die schnell wandernden Fraktionen mit einer niedermolaren Pufferlösung eluiert (HbA_{1c} – Extinktion A). Die Hauptkomponente HbA (Extinktion B) wird anschließend in einem zweiten Schritt mit einer hochmolaren Pufferlösung eluiert.

Reagenzien:

- Microspinsäule
- Elutionspuffer I
- Elutionspuffer II
- 0,75 ml Hämolyat (jeweils eine Probe vom Autor und 1 Kontrollprobe von einer MTA)

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen

Geräte:

- Photometer
- Canon AE-1 Spiegelreflexkamera

Vorgehen:

1. Die Kationenaustauschersäule wurde zunächst horizontal geschüttelt und auf ein Reaktionsgefäß gesetzt. Nach Entfernen des Deckels und des unteren Verschlusses konnte die Pufferlösung in ein Reaktionsgefäß auslaufen.
2. Jeweils 100 µl Hämolyt wurden in die Säule vorsichtig pipettiert.
3. Nach 5 Minuten wurde die Säule mit 1,5 ml Elutionspuffer I gewaschen.
4. Die Säule wurde auf ein neues Reaktionsgefäß 2 gesetzt und mit 4 ml Elutionspuffer II versetzt. Das Reaktionsgefäß 2 enthielt nun das eluierte, glukosylierte Hämoglobin.
5. In einem weiteren Reaktionsgefäß 3 wurden 4 ml Elutionspuffer II und 20 µl Hämolyt hinzugegeben. Diese Lösung wurde für die Bestimmung des Gesamt-Hb verwendet.
6. Photometrische Bestimmung des Elutionspuffer II bei 405 nm (Leerwert).
7. Photometrische Bestimmung der Lösung aus Reaktionsgefäß 2 und Reaktionsgefäß 3 bei 405 nm.

2.4. Zelluloseacetat-Elektrophorese mit 8M Harnstoff

2.4.1. Prinzip

Die Zelluloseacetat-Elektrophorese mit 8M Harnstoff beruht auf den selben Prinzipien wie die Zelluloseacetat-Elektrophorese mit Veronalpuffer. Der 8M Harnstoff bewirkt eine Trennung des Hämoglobinmoleküls in seine Ketten, wodurch mit dieser zweiten modifizierten Zelluloseacetat-Elektrophorese mit Babbituralpuffern nach Schneider et al. die mutierte Kette des Hämoglobinmoleküls nachgewiesen werden kann.

Reagenzien:

- Hämolysat A: Autor
- Hämolysat B: Kontrolle (MTA)
- 0,5 mM Babbitural-Natrium, pH 8,9, Harnstoff 0,5% Beta-Mercaptoethanol
- Ponceau S Lösung
- Methanol, Eisessig, Transparenzlösung (Eisessig:Methanol:Ethanol = 1:2:2)

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen
- Zellulose-Acetatfolien
- Objektträger zum Trocknen der Folie

Geräte:

- Elektrophoresekammer
- Spezialauftragegerät

Vorgehen:

Die Elektrophorese wurde analog zur üblichen Zelluloseacetat-Elektrophorese mit Veronalpuffer durchgeführt. Im Unterschied wurde hierbei eine alkalische 8M Harnstoff β -Mercaptoethanol Pufferlösung verwendet. Zusätzlich wurden die Zelluloseacetat-Streifen über Nacht in diesem Harnstoff-Arbeitspuffer inkubiert.

Auftragsmodus

Objektträger 3		
Bahn 1	Bahn2	Bahn3
Hämolysat A	Hämolysat B	Hämolysat A

Die Auswertung erfolgte visuell.

2.5. PCR-Sequenzierung (In vitro DNA Amplifikation)

2.5.1. Prinzip

Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) ist in der Lage, gewünschte DNA-Sequenzen von verschiedenen Ursprüngen (viral, bakteriell, pflanzlich oder human) millionenfach in einem Zeitraum von wenigen Stunden zu amplifizieren. Die Vorteile der PCR gegenüber früheren rekombinanten Technologien liegen in der Geschwindigkeit, der hohen Spezifität, einfachen Automatisierung und der Fähigkeit, geringste Mengen an Ausgangsproben zu amplifizieren. Aus diesem Grund spielt die PCR eine große Rolle in der klinischen Medizin, in der Diagnostik genetischer Erkrankungen, der forensischen Medizin und der Evolutionsbiologie. Die PCR basiert auf einem speziellen Polymerase-Enzym, der Taq-Polymerase, welches einen komplementären Strang zu einem gegebenen DNA Strang in einer Mischung aus 4 DNA-Basen und 2 Primern synthetisieren kann. Das Reaktionsgemisch wird auf 92°C erhitzt, um die beiden Stränge der Doppelstrang DNA zu separieren und die Target-Sequenzen freizulegen. Im Anschluß wird auf 60°C gekühlt, damit die Primer an ihre komplementäre Sequenz binden können. Es folgt ein Syntheseschritt bei 72°C, in dem die Taq-Polymerase die Primer zu komplementären Strängen erweitert.

Wiederholte Erwärmungs- und Abkühlungszyklen multiplizieren die Ziel-DNA exponentiell, da jeder neuer Doppel-Strang zwei neue Vorlagen für weitere Synthesen liefert. In einer Stunde kann durch 20 PCR-Zyklen die Vorlage 10⁶-fach amplifiziert werden (Abb. 6).

Wir benutzten aus der Literatur bewährte Primer (Molchanova et al., 1993), wobei der Reverse-Primer biotinyliert war. Die optimalen PCR-Bedingungen, u. a. Anzahl

der Zyklen, Temperaturen und Inkubationszeiten wurden in einer Optimierungs-Versuchsreihe ermittelt.

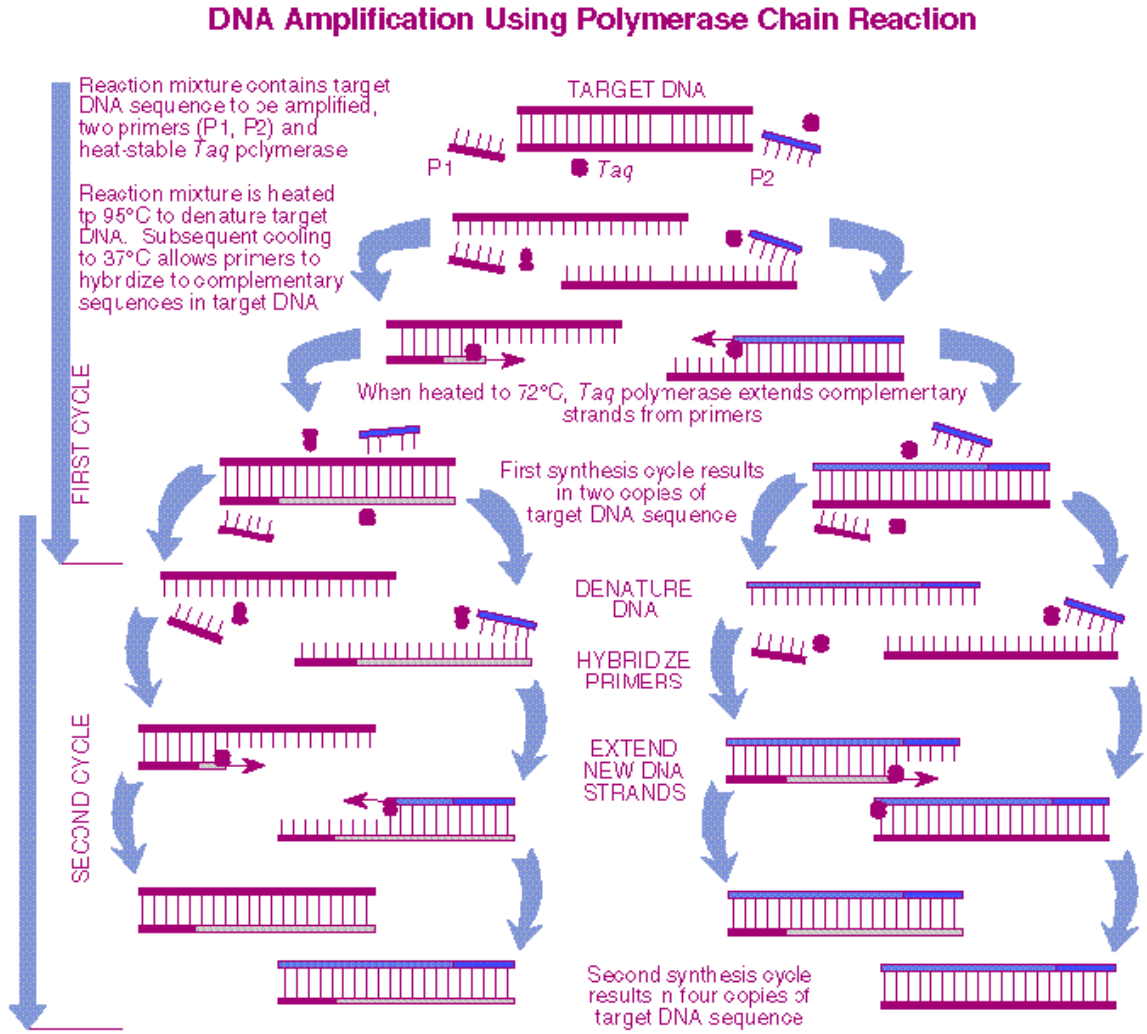


Abbildung 6: Schema der Polymerase-Kettenreaktion (modifiziert nach Stryer et al., 2002)

2.5.1. PCR mit biotinylierten Primern

Bei der Biotinylierung des Reverse-Primers wurde der Biotinrest kovalent an die Purin- oder Pyrimidinbase durch einen Allylamin-Linker (Spacer) gekoppelt. Dieser Linker (bestehend aus 7-21 C-Atomen) reduzierte den sterischen Widerstand zwischen dem Biotinrest und der DNA, so dass die Biotingruppe leichter angekoppelt werden konnte (Detektions-Mechanismus). Dieser Detektions-Mechanismus beruht auf der hohen Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin. Üblicherweise benutzt man Avidin (Streptavidin)-Enzymverbindungen, die bei Benutzung von chromogenen Substraten (z.B. Streptavidin-Meerettich-Peroxidase) in einer enzymatischen Reaktion eine Visualisierung ermöglichen. In unserer Versuchsreihe benutzten wir Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel, die in der Lage waren, an biotinylierte DNA-Fragmente zu binden.

Hierdurch wurde eine magnetische Trennung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) ermöglicht, die die Grundlage für eine exakte Einzelstrang-DNA-Sequenzierung bildete.

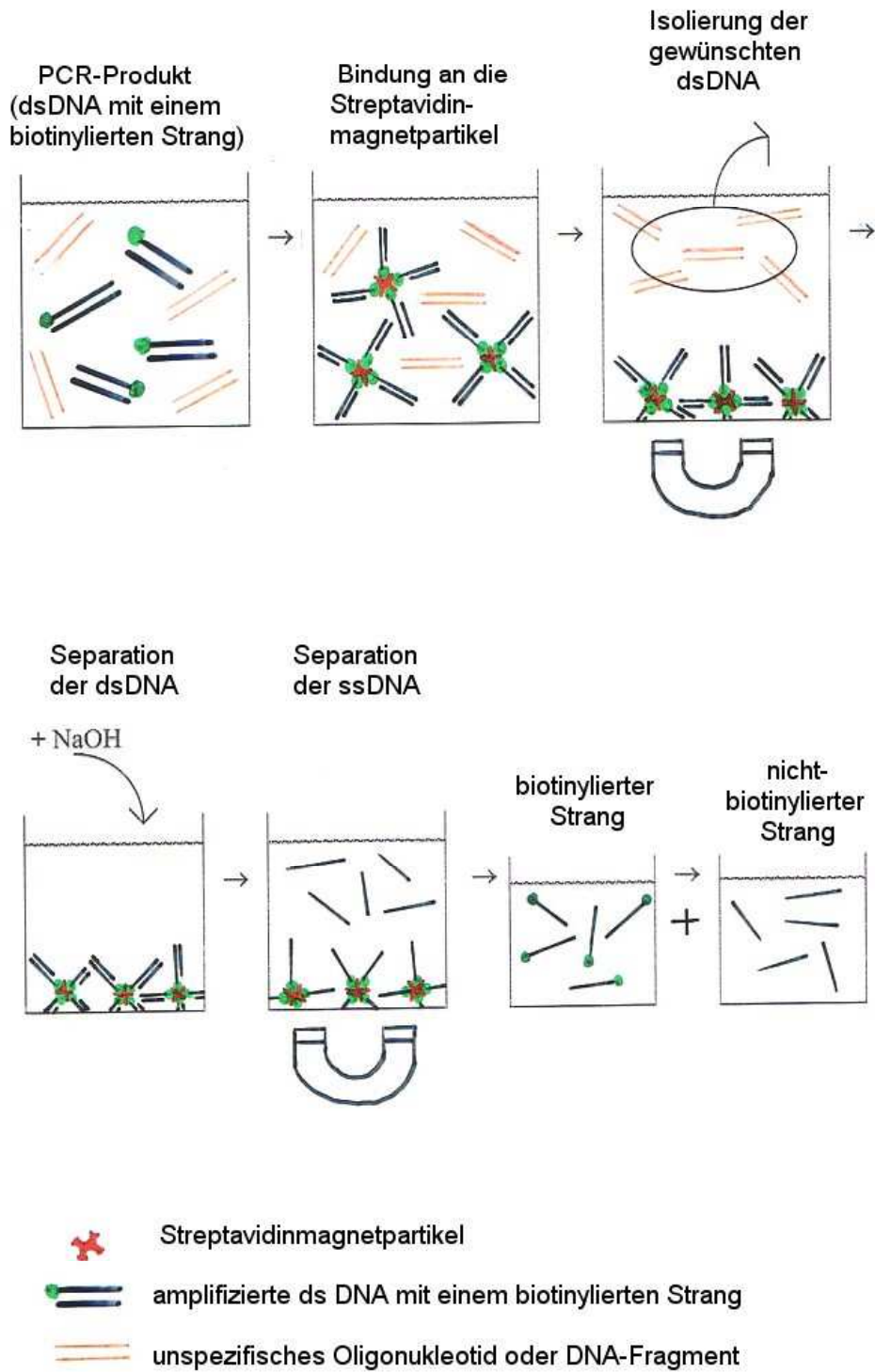


Abbildung 7: Schematische Darstellung der PCR mit biotinylierten Primern

2.5.2. DNA-Präparation

Wir benötigten zur Genanalyse lediglich 500µl EDTA-Na₂-Vollblut, das wir mit einem DNA-Präparationskit nach Split-Second innerhalb von 20 min aufbereiteten.

Reagenzien:

- Jeweils 500µl EDTA-Na₂-Vollblut (Autor, Kontrollperson)
- Split-Second DNA-Präparationskit (bestehend aus Lösung A und B, beide jeweils Raumtemperatur)

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen

Geräte:

- Eppendorf Zentrifuge
- Rüttler

Vorgehen:

1. 1 ml Lösung A wurden in ein steriles 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettiert
2. 500 µl EDTA-Na₂-Vollblut wurde hinzu pipettiert, das Reaktionsgefäß geschlossen und vorsichtig geschwenkt.
3. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 min bei Raumtemperatur im Rüttler oder alternativ 10 min manuell periodisch geschwenkt.
4. Zentrifugation des Reaktionsgefäßes bei 2500U/min über 5 min (Raumtemperatur).
5. Der Überstand (klar rötlich=Zeichen für Hämolyse) wurde mit einer sterilen Pipette vorsichtig abpipettiert, woraufhin ein weißes Pellet sichtbar wurde.
6. 1 ml Lösung A wurde hinzupipettiert und durch Schwenken und Anticken das Pellet resuspendiert.
7. Zentrifugation bei 2500U/min über 3 min.
8. Der Überstand wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen und verworfen.
9. Das weiße Pellet wurde in 1ml Lösung B resuspendiert und kräftig im Vortex aufgeschüttelt.

10. Die Proben wurden für 5 min bei 65°C inkubiert um die Zelllyse zu unterstützen.
11. Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben.

2.5.3. PCR-Protokoll

Reagenzien:

- Forward- und Reverse-Primer (siehe Tabelle 6)
- MOPS-Puffer (pH 7.8), Mg²⁺-Lösung
- dNTPs
- DNA (Split Second™ Produkt)
- Ampli-Taq-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT),
- Mineralöl (Sigma)

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen

Tabelle 7: Forward- und Reverse-Primer

Beschreibung des Primers	Relativ zur Cap Site (bp)	Sequenz	%GC	MW
Forward-Primer	-22	5'-AGG-GCA-GAG-CCA-TCT-ATT-3'	50%	5524
Reverse-Primer (biotinyliert)	-1645	5'-CAC-TGA-CCT-CCC-ACA-TTC-CCT-3' 5'-Biotin	57.14 %	6222
Sequenzierung von Exon 2	-138	5'-GCA-GGT-TGG-TAT-CAA-GGT-T-3'	47.37 %	5899
Sequenzierung von Exon 3	-1139	5'-GGG-TTA-AGG-CAA-TAG-CAA-T-3'	42.11 %	5901

Geräte:

- Eppendorf Zentrifuge
- PCR-Cycler (Perkin Elmer Cetus)

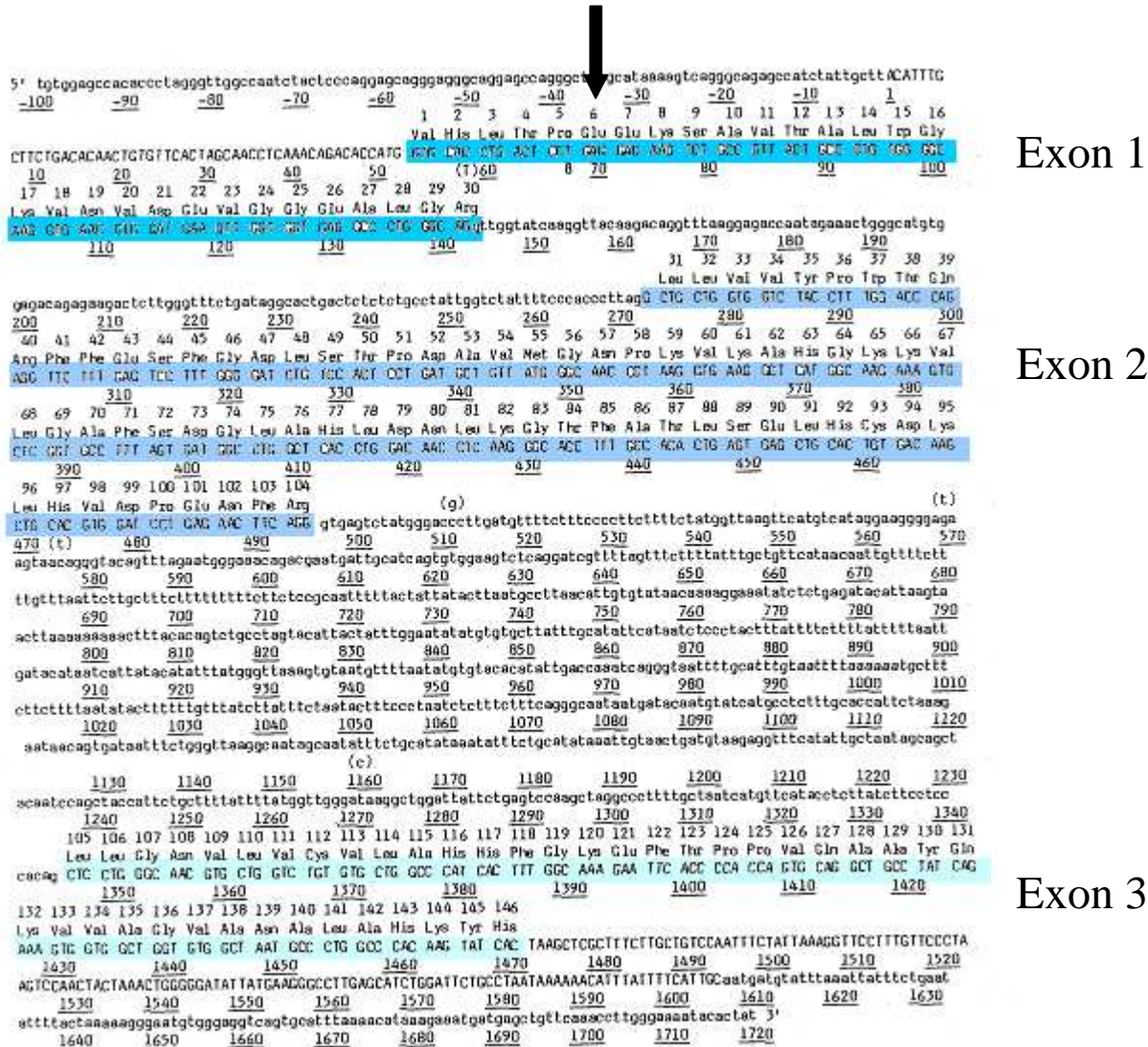


Abbildung 8: Nukleotid-Sequenz des β-Globingens
(Lown et al., 1980) Die verschiedenen Exons sind farbig unterlegt. Der Pfeil deutet auf die 6. Position der Sequenz die z.B. bei HbS ((α₂β₂^{6Glu→Val})) verändert ist

PCR-Protokoll:

Es wurden 3 Sequenzierreaktionen mit 3 verschiedenen Forward-Primern durchgeführt (s. Tabelle 7). Wir entwickelten folgende optimale PCR-Konditionen:

Tabelle 8: PCR-Protokoll

PCR-Mixtur (100µl/ 50µl): <ul style="list-style-type: none"> • a 500 nM Forward- und Reverseprimer • 40 mM MOPS buffer, pH 7.8 • 2 mM Mg⁺⁺ • 150 µM Deoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) • 1 µg genomische DNA (entspricht 10µl Split SecondTM Produkt) • 2.5 I.E. Ampli-Taq (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT) Das Reaktionsgemisch wurde mit 50µl leichtem Mineralöl bedeckt	3 min 95°C 45 Sek. 92°C 45 Sek. 60°C } 10 Zyklen 60 Sek. 72°C 75 Sek. 92°C 75 Sek. 60°C } 10 Zyklen 90 Sek. 72°C 105 Sek. 92°C 105 Sek. 60°C } 10 Zyklen 120 Sek. 72°C 10 min 72°C
---	--

2.5.4. Ethidiumbromidgel-Elektrophorese

2.5.5. Prinzip

Im Anschluß an die PCR folgte eine Ethidiumbromidgel-Elektrophorese mit Markern, um den Erfolg der PCR-Reaktion zu validieren.

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-Ethyl-5-Phenylphenantridiumbromid) ist ein fluoreszierender, hoch kanzerogener Farbstoff, der zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA und RNA interkaliert. Der Nukleinsäure-Ethidiumbromidkomplex fluoresziert bei UV-Lichtbestrahlung von einer Wellenlänge von ≥ 300 nm. Der Farbstoff wird benutzt, um doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle in Agarose- und Polyacrylamidgelen bei einer Fluoreszenz-Emission bei 590 nm zu visualisieren. Unter geeigneten Färbebedingungen ist die Fluoreszenz-Intensität direkt der DNA bzw. RNA-Fragmentmenge proportional und lässt sich dann bestimmen.

Reagenzien:

- PCR-Proben
- Marker
- 1% Agarose
- Ethidiumbromid
- 1xTAE-Puffer

Verbrauchsmaterial:

- 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
- Autoklavierte, gestopfte Kunststoffpipettenspitzen

Geräte:

- Elektrophoresekammer
- UV-Lampe

Vorgehen:

Jeweils 10 µl Probe und 2 µl Marker wurden in die Taschen des mit Ethidiumbromid getränkten Agarosegels aufgetragen und eine Spannung von ca. 250V für eine Stunde angelegt. Im Anschluß wurde das Agarosegel unter UV-Lichtbestrahlung beurteilt.

2.6. Automatisierte Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produkts

Eine Probe vom PCR-Produkt wurde einem unabhängigen Labor zur automatisierten Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung zugesandt.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse einer Hämoglobinvarianten mittels Zelluloseacetat-Elektrophorese

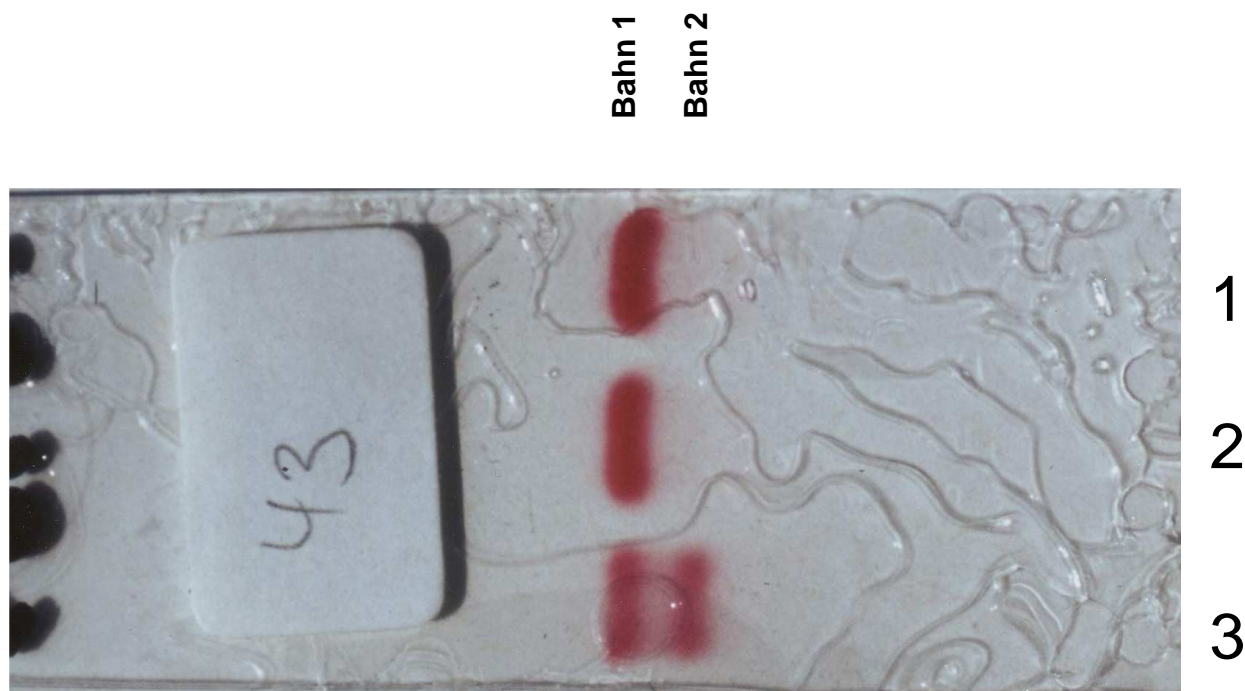


Abbildung 9: Zelluloseacetat-Elektrophorese von Hämolysaten mit anschließender Ponceau S-Färbung

Auftragsmodus Bahn 1, 2 = Hämolysat B (Kontrolle), Bahn 3 = Hämolysat A (Autor mit einer HbAC-Varianten)

In Abbildung 9 erkennt man jeweils zwei Hämoglobinbanden bei dem Hämolysat des Autors, wobei die erste Bande genauso schnell wandert wie bei der Kontrolle und noch eine zweite Bande folgt. Es besteht ein „normaler“ Hämoglobinanteil und zusätzlicher Hämoglobinanteil (Variante: Bahn 3). Anhand dieser Zelluloseacetat-Elektrophorese mit einem Veronalpuffer kann man die Existenz einer abnormen Hämoglobinvariante diagnostizieren und gleichzeitig auch eine heterozygote Form feststellen. Nach einer Versuchsreihe zur Optimierung erzielten wir bei pH 8.6 beste Resultate.

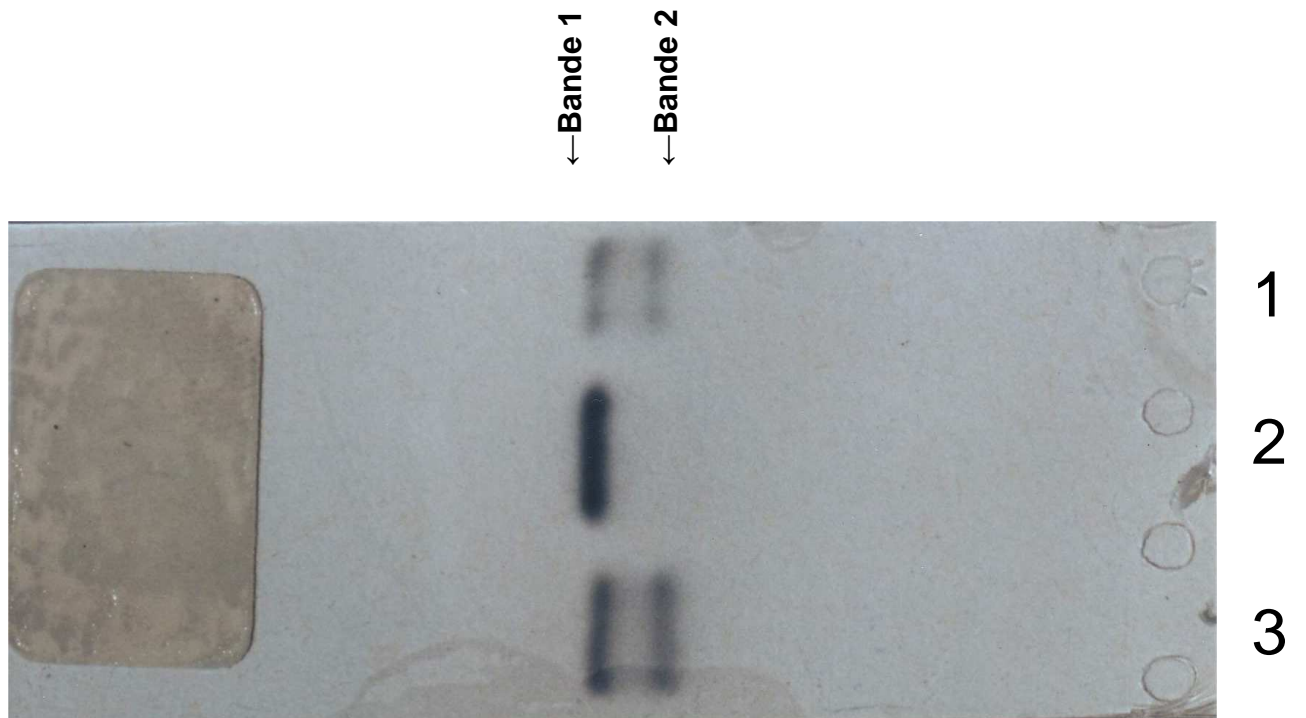


Abbildung 10: Zelluloseacetat-Elektrophorese von Hämolysaten mit anschließender Amidoschwarz-Färbung

Bahn 1, 3 = Hämolyt A (Autor mit einer HbAC-Varianten), Bahn 2 = Hämolyt B (Kontrolle)

In Abbildung 10 erkennt man in Bahn 1 und 3 jeweils beim Hämolyt des Autors zwei Hämoglobinbanden, womit das Ergebnis der Zelluloseacetat-Elektrophorese mit anschließender Ponceau S-Färbung validiert wird.

3.2. Ergebnis der Familienstudie

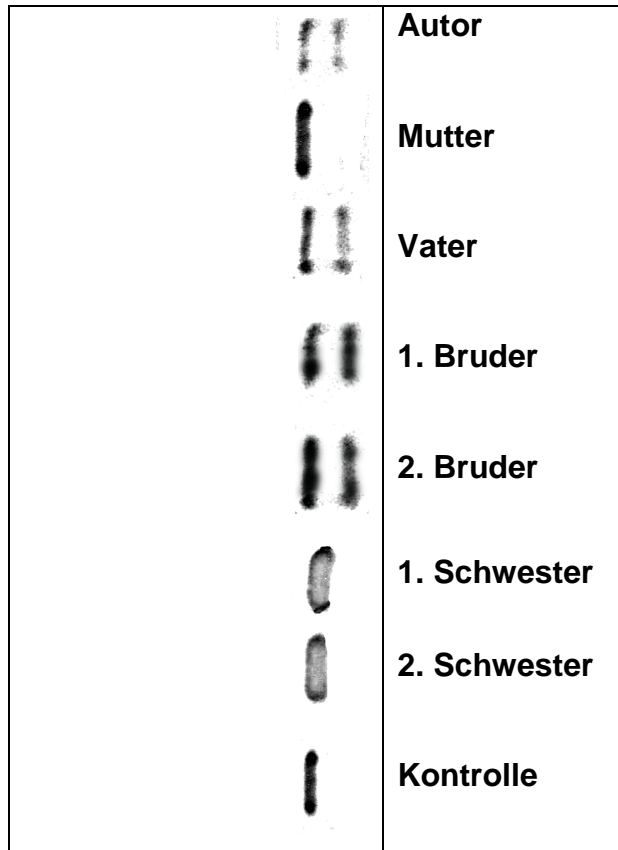


Abbildung 11: Acetatelektrophorese der Familienstudie

Autor, Vater, 1. Bruder und 2. Bruder sind heterozygote Träger derselben Anomalie
Mutter, 1. Schwester und 2. Schwester, sind HbA-Träger.

3.2.1. Hämatologische Daten

Tabelle 9: Hämatologische Daten der Familienstudie

MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (Normwert: 31-36 g/dl)

MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (Normwert: 26-34 pg)

MCV = mittleres korpuskuläres Volumen (Normwert: 81-100 fl)

Person	Erythrozyten [10 ⁶ /μl]	Hb [g/dl]	MCHC [g/dl]	MCH [pg]	MCV [fl]	Ferritin [ng/ml]	Transferrin [mg/dl]
Autor	4,6	18	40,00	33	83	143	347
Mutter	4,2	17,2	39,09	32	83	98	307
Vater	4,7	16,5	37,50	35	94	106	282
1. Bruder	4,8	16,8	39,07	35	90	163	331
2. Bruder	4,5	16,2	37,67	36	96	134	379
1. Schwester	4,3	12,3	30,75	29	93	117	314
2. Schwester	4,2	13,1	33,59	31	93	135	365
Kontrolle	4,6	15,5	34,44	34	98	164	305

Anmerkung: Bei den Schwestern handelt es sich um homozygote Zwillingsschwestern.

Sowohl bei den in Tabelle 8 aufgeführten hämatologischen Daten, als auch bei dem durchgeführten Blutausschich, zeigten sich keine abnormen Werte. Bei allen untersuchten Probanden ergab eine orientierende klinische Untersuchung keine pathologischen Befunde.

3.3. Bestimmung des glukosylierten Hämoglobins/HbA_{1c} mittels eines Ionenaustauschers (Mikrosäule)

Makroskopisch erkennt man bei der Mikrosäule mit dem Hämolysat vom Autor zwei rötlich-braune Ringe im Gegensatz zu einem kräftigen rot-bräunlichen Ring bei der Kontrolle. Dies bestätigt, dass es sich um eine heterozygote Anomalie des Hämoglobins handelt.

Tabelle 10: Photometrische Messwerte

Hämolysat	Extinktion A bei 405 nm	Extinktion B bei 405 nm	berechneter HbA _{1c} -Anteil [%]
Autor	0,106	0,492	4,3
Kontrolle	0,129	0,565	4,6

Der glukosylierte Anteil berechnet sich nach der Formel:

$$\text{HbA}_{1c} [\%] = (100 \cdot E_A) / (5 \cdot E_B)$$

Beide Werte entsprechen Normwerte für Nicht-Diabetiker (<6%).

3.4. Analyse der Globine mittels Zelluloseacetat-Elektrophorese in Gegenwart von 8M Harnstoff bei einem Probanden mit HbAC (Autor)

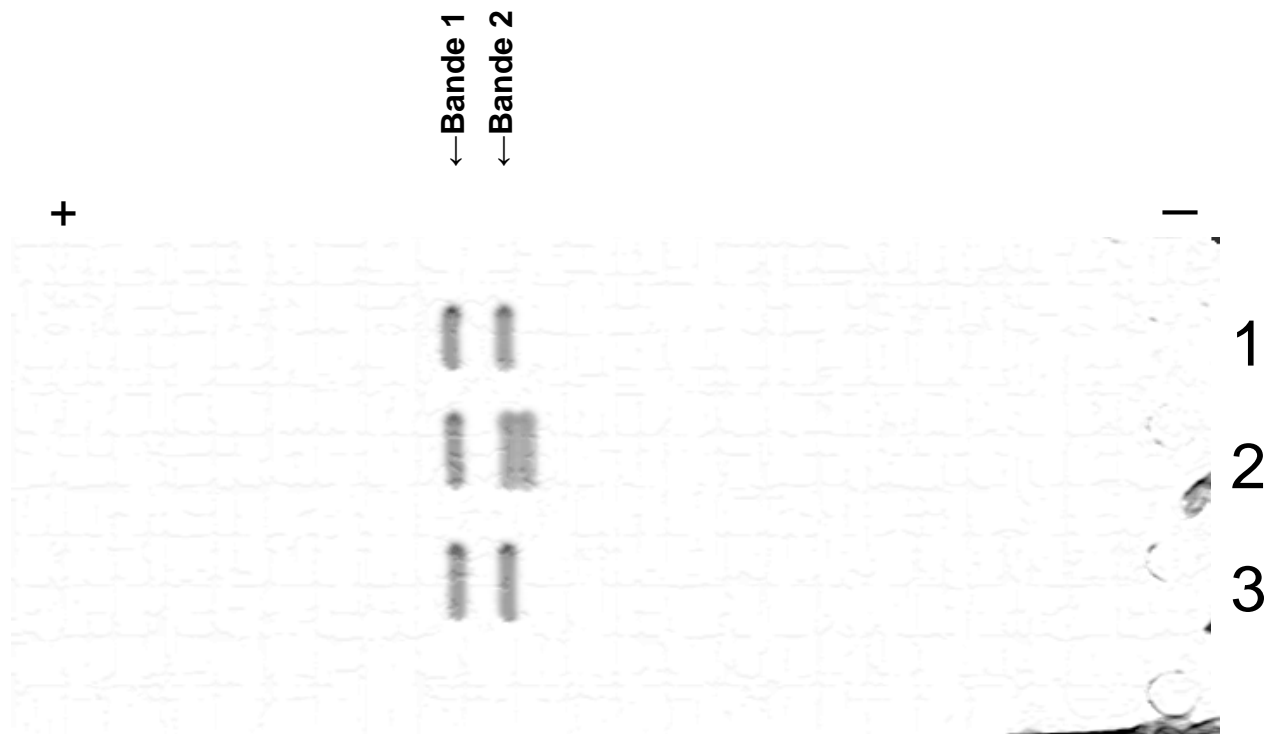


Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der Globine des Probanden mit einer Hämoglobinvarianten nach Versetzen des Hb mit 8M Harnstoff

Auftragsmodus Bahn 1, 3 = Hämolyt B (Kontrolle), Bahn 2 = Hämolyt A (Autor mit HbAC)

Bande 1 entspricht der α -Kette und Bande 2 entspricht der β -Kette des Globinmoleküls, das nach Aufspaltung mit 8M Harnstoff mittels Elektrophorese getrennt werden konnte. Beim Autor sind zwei Banden im Bereich der β -Ketten zu erkennen (Bahn 2, Bande 2). Daraus kann man auf eine heterozygote Form einer Hämoglobinanomalie, die die β -Kette betrifft, schließen.

3.5. PCR-Sequenzierung (in vitro DNA Amplifikation)

Um die Veränderung des codierenden Abschnittes des β -Hämoglobingens bei dem untersuchten Probanden zu identifizieren bzw. zu lokalisieren erfolgte ein PCR-Sequenzierung des betroffenen Exons.

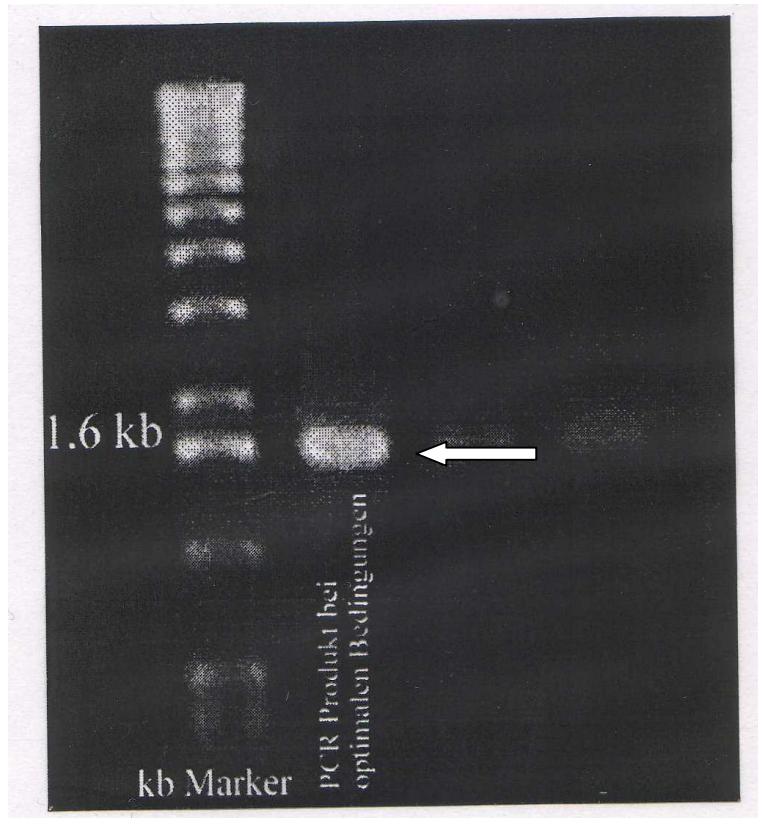


Abbildung 13: PCR-Produkt der genomischen DNA des Probanden mit Hämoglobinvariante

DNA wurde isoliert, PCR-Reaktion mit Primern für die Amplifikation von Exon1 des β -Globingens. Auftrennung mit Ethidiumbromid getränktem Agarosegel. Darstellung mit Hilfe von UV-Licht. Pfeil: PCR-Produkt

Man erkennt, dass das PCR-Produkt ausreichend ist für 3 Sequenzierreaktionen mit 3 verschiedenen Forward-Primern mit der erwarteten Größe von 1,6 kb.

3.6. Automatisierte Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produkts

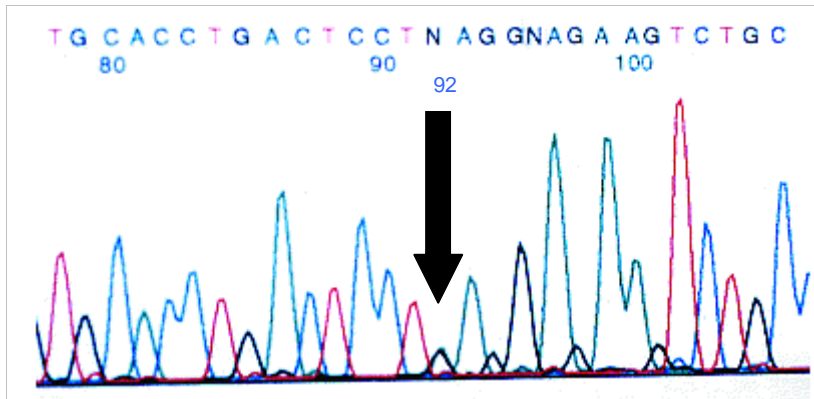


Abbildung 14: Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produktes.

Jedem Nukleotid ist eine Farbe zugeordnet: A: Adenosin=grün, C: Cytosin=blau, G: Guanosen=schwarz, T: Thyminid=rot und N: Nukleotid =konnte nicht eindeutig zugeordnet werden.

Man erkennt in Position 92 des PCR-Produktes von Exon1 zwei Nukleotide gleichzeitig als Peak (siehe Pfeil-Markierung in Abbildung 12). Es handelt sich um die Nukleotide Guanosen und Adenosin. Wenn man die Sequenz in Abbildung 14 und Abbildung 8 vergleicht, entspricht Position 92 in Abbildung 14 der Position 69 (vom 5'-Ende gezählt) in Abbildung 8. Es handelt sich demnach um das Nukleotid-Triplet, dass die 6. Aminosäure der β -Kette codiert. Da man zwei gleich ausgeprägte Peaks an der Stelle beobachtet, liegt hier eine heterozygote Form vor. Das Triplet entspricht dann zum einen **GAG** und zum anderen **AAG**. **GAG** codiert die Aminosäure Glutaminsäure und **AAG** die Aminosäure Lysin. Es handelt sich also um eine Hämoglobinvariante mit der Bezeichnung:

Hb $\alpha_2\beta_1\beta$ $6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$ oder anders ausgedrückt: **HbAC ($\alpha_2\beta_1\beta$ 6Glu \rightarrow Lys)**, eine heterozygote Form von HbC.

4. Diskussion

4.1. Methoden und eigene Ergebnisse

4.1.1. Hb-Elektrophorese

Die Hämoglobinelektrophorese ist eine einfache Technik zur initialen Detektion von Hämoglobinvarianten. Aus diesem Grund ist sie trotz der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) immer noch die am häufigsten angewendete initiale Methode (siehe 4.1.4.). Die Hämoglobinelektrophorese beruht auf dem Prinzip, dass Proteine, die auf einer Membran aufgetragen werden, in einem elektrischen Feld getrennt werden und durch Färbung visualisiert werden können (siehe 2.1.). Wir benutzten gewaschenes Erythrozytenkonzentrat, um eine konstante Hämoglobinmenge zu gewährleisten und um unspezifische Banden durch Plasmaproteine zu vermeiden. Bei Verwendung von Vollblut würde durch die hohe Konzentration von polyklonalen Immunglobulinen eine prominente Bande entstehen, die mit einer Hämoglobinvariante verwechselt werden könnte.

Die initiale Zelluloseacetat-Elektrophorese bei alkalischem pH (pH 8.6) erwies sich als überaus nützlich, da mit dieser einfachen Methode sehr häufige Hämoglobinvarianten wie die Hämoglobine A, F, S, G, D, C, E, O-Arab, H sowie eine Anzahl von seltenen Varianten identifiziert wurden (Schneider et al., 1983). In unserem Fall konnten wir dadurch einen heterozygoten Träger einer Hämoglobinvariante ermitteln. Die Identifikation wäre eigentlich schon abgeschlossen gewesen, wenn eine Kontrollprobe mit den Hämoglobinen A, F, S und C mituntersucht worden wäre. Die Trennung der Proteine bei alkalischem pH beruht hauptsächlich auf der Ladung des Hb-Moleküls. Bei alkalischem pH wandert das negativ geladene Hämoglobinmolekül zur positiven Anode.

Bei der von uns benutzten Ponceau S-Färbung wurde auch die Carboanhydrase neben den Hämoglobinbanden angefärbt. Durch eine isolierte Hämoglobinanfärbung hätte man das Ergebnis diesbezüglich verfeinern können. Bei guter Technik kann man HbF-Anteile, die größer als 2% betragen, visualisieren. Bei erhöhtem HbF-Anteil sollte eine präzise Quantifizierung zur besseren Diagnosestellung erfolgen. Wenn Hämoglobinvarianten mit einer ähnlichen Mobilität wie HbS detektiert werden, sollte unbedingt ein Sichelzellen-Löslichkeitstest durchgeführt werden. Bei diesem Test

kann man zwischen Hämoglobinvarianten mit und ohne Sichelzellformation unterscheiden. Es ist ein rein qualitativer Test, der keine Aussage über die Quantität der Sichelzellen liefern kann und daher auch nicht zwischen einer homozygoten oder heterozygoten Form unterscheiden kann. Es ersetzt daher nicht eine Hb-Elektrophorese oder eine HPLC-Untersuchung. Einige Hämoglobinvarianten zeigen eine gleiche elektrophoretische Mobilität und können daher mit dieser Methode differenziert werden (Davidsohn et al., 1974). Der Sichelzell-Löslichkeitstest wird in Form von fertigen Kits angeboten. Wenn dieser Test negativ ausfällt oder abnorme Banden mit unterschiedlicher Mobilität bei der Elektrophorese vorliegen, sollte man alternative Untersuchungen wie eine Elektrophorese bei saurem pH oder eine HPLC in Betracht ziehen. Auch bei schwachen Banden oder fehlender HbA₂-Fraktion können diese alternativen Untersuchungen hilfreich sein, da beide Techniken gerade bei niedrigen Konzentrationen einer Hämoglobinvariante sensitiver sind. Um zwischen einer homozygoten (HbS) und einer heterozygoten Form (HbD, HbG) einer Sichelzellanämie besser zu unterscheiden, ist bei einem positiven Sichelzelltest eine anschließende HPLC-Untersuchung sicherlich hilfreich. Eine systematische Vorgehensweise wird unter Berücksichtigung von aktuellen Empfehlungen in Kapitel 4.3. diskutiert (ICSH, 1978; U.S. Preventive Services Task Force, 1996, General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology, 1998).

Bei unserer vorliegenden Untersuchung haben wir zunächst eine unbekanntes Hämoglobinvariante postuliert und darauf aufbauend schrittweise Untersuchungen der von der Gensequenz abgeleiteten AS-Sequenz des Proteins durchgeführt. Auf die Ausführung eines Sichelzelltests wurde im nachhinein verzichtet, da bei der vorliegenden HbAC-Variante ein negatives Testergebnis zu erwarten war (siehe auch 4.2.1.).

4.1.2. Familienstudie und hämatologisches Screening

Eine Familienstudie wurde durchgeführt, um die einzelnen Träger der Hämoglobinvariante zu identifizieren. Dies ermöglicht eine Grundlage für eine spätere genetische Beratung und gegebenenfalls eine therapeutische Konsequenz in Zusammenhang mit den hämatologischen Daten. Da strukturelle Hämoglobinopathien oft einen Einfluss auf den Erythrozytenindex haben, ist dieser Index unverzichtbar für die Diagnose von Hämoglobinvarianten und Thalassämien. Die wichtigsten Marker sind diesbezüglich Hb, MCH, MCH, MCV und pathologische Befunde im Sinne von Targetzellen o.ä. im Blutaussstrich.

Sie erlauben die Unterscheidung zwischen einer hypo- bzw. hyperchromen und einer mikro- bzw. makrozytären Anämie.

Hämoglobingehalt, Erythrozytenzahl und Hämatokrit sind weitere wichtige Diagnoseparameter zur Abgrenzung einer Anämie. Generell sollte man bei Identifikation einer Hb-Variante immer ein Screening aller erreichbaren Familienmitglieder anstreben, da eine Spontanmutation eher unwahrscheinlich ist.

4.1.3. Zelluloseacetat-Elektrophorese in 8M Harnstoff

Mit der Zelluloseacetat-Elektrophorese mit 8M Harnstoff ermöglicht man eine elegante Trennung des Hämoglobins in seine α und β -Ketten. Erst dadurch ist die Mutation der jeweiligen Kette zuzuordnen. In unserem Fall zeigte sich eine heterozygote Form einer Hämoglobinvariante, welche die β -Kette betrifft. Aus dieser Information konnte man gezielt eine Sequenzierung des β -Globingens anvisieren, um die Mutation auf genomischer Ebene zu lokalisieren.

4.1.4. HbA_{1c} Bestimmung mittels Ionenaustauschchromatograph

Durch die Wahl eines geeigneten pH-Bereiches und der optimalen Pufferkonzentration (Jongeneel J, van Wissen M, 1979; Simon und Eissler, 1980) lässt sich eine gute Trennung in die verschiedenen Hämoglobinfraktionen erreichen.

4.2. Diskussion der klinischen Bedeutung von Hämoglobin C

Im HbC ersetzt Lysin die Glutaminsäure an der Position 6 der β -Kette. Die positive Ladung, die aus dieser Substitution resultiert, bewirkt eine geringere elektrophoretische Mobilität bei alkalischen und sauren pH (siehe Kapitel 3.1.). HbC ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$) ist eine Hämoglobinvariante mit einer Mutation im β -Globin an der selben Stelle wie bei HbS ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$). Es kann in der homozygoten Form (HbC), der heterozygoten Form (HbAC) oder in Kombination mit anderen Hämoglobinvarianten wie z.B. HbSC oder HbC/ β -Thalassämie auftreten. Ursprung und Epidemiologie werden in Kapitel 4.2.3. diskutiert. Es sollte erwähnt werden, dass die ähnlichen elektrophoretischen Eigenschaften von HbO-Arab und HbC in frühen Veröffentlichungen oft zu Verwechslungen führten.

4.2.1 Heterozygote Form: HbAC

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Hämoglobinvariante handelt es sich um die heterozygote Form des HbC. In der durchgeführten Familienstudie konnte keine homozygote Form (HbC) nachgewiesen werden. Die heterozygote Form hat keine hohe klinische Relevanz, ist jedoch wichtig bei der genetischen Beratung von werdenden Eltern. Vor allem in Gebieten mit einer hohen Prävalenz von HbS (z.B. Afroamerikanern und Nordafrikanern) können bei Nachfahren eines HbAC-Trägers bei Verbindung mit einem Elternteil mit einer klinisch unauffälligen Form von HbAS Kinder mit HbSC geboren werden, also einer Form der Sichelzellerkrankheit.

Bei der heterozygoten Form ist die Lebensdauer der Erythrozyten nicht verkürzt (Prindle et al., 1969). In der Regel enthalten die Erythrozyten einen HbA-Anteil von 50-60%, einen HbC-Anteil von 30-40% und einen leicht erhöhten HbA₂-Anteil (Huisman et al., 1972). Bei einer α -Thalassämie ist der HbC-Anteil niedriger (Weatherall et al., 1981). Der Blutausstrich ist in der Regel unauffällig (wie beim Autor) kann aber eine erhöhte Anzahl von Targetzellen aufweisen, jedoch nicht in der Intensität wie bei der homozygoten Form. Bunn et al. konnten zeigen, dass Erythrozyten mit HbAC oder HbSC eine erhöhte Dichte und eine erhöhte MCHC im Gegensatz zu Erythrozyten mit HbAA oder HbCC haben (Bunn et al., 1982). HbAC hat keine nachteiligen Konsequenzen für Individuen mit perniziöser Anämie, einem Glucose 6 Phosphat Dehydrogenase-Mangel oder einer hereditären Form von Elliptozytose.

4.2.2 Homozygote Form: HbCC

Patienten mit einer homozygoten Form von HbC zeigen eine milde bis moderate Form einer hämolytischen Anämie (Ranney et al., 1953). Die homozygote Form des HbC ist nach HbS vermutlich die am besten untersuchte Hämoglobinvariante (Spaet et al., 1953; Singer et al., 1954; Terry et al., 1954; Hartz et al., 1955; Jensen et al., 1957; Smith et al., 1959; Redetzki et al., 1968). In der Regel sind die HbC-Träger asymptomatisch. Die fetale oder maternale Morbidität während der Schwangerschaft ist nicht signifikant erhöht (Anderson et al., 1967). Wie bei anderen chronisch-hämolytischen Erkrankungen ist die Inzidenz von Cholelithiasis oder einer aplastischen Krise erhöht. Häufig zeigt sich eine moderate Retikulozytose als Folge einer erniedrigten Erythrozytenlebensdauer (→erhöhte Sequestration in der Milz mit Splenomegalie) (Prindle et al., 1969; Jensen et al., 1957). Im Blutausstrich dominieren Targetzellen und eine kleine Anzahl von Mikrosphärozyten. Diggs et al. konnten erstmals die charakteristische Bildung von Kristallen nachweisen (Diggs et al., 1954). HbCC-Erythrozyten formen dabei intrazelluläre Kristalle, ein Vorgang der an den Membranen beginnt und durch Deoxygenierung gefördert wird. Durch diese intrazellulären Aggregate erhöht sich die interne Viskosität und führt über eine erniedrigte Verformbarkeit der Zellen zu einer erhöhten Fragmentation, Sphärozytenformation und Sequestration in der Milz. Der Zusammenhang zwischen HbCC und Arthralgien, Abdominalschmerzen oder Hämorrhagien wird oft diskutiert, ist aber nicht bewiesen.

4.2.3 Sichelzellanämie und ähnliche Varianten

Die Sichelzellanämie wurde als erste Hämoglobinopathie entdeckt, als ein Patient mit schwerer Anämie durch „veränderte, sichelzelloförmige“ Erythrozyten im Blutausstrich auffiel (Herrick JB et al., 1910). Viele Jahre später wurde durch Pauling gezeigt, dass die Ursache des Sichelzellphänomens ein abnormes Hämoglobin ist (Pauling et al., 1949). Kurz darauf wurde die dafür verantwortliche Aminosäure in der β -Kette identifiziert (Ingram et al., 1956). Das Sichelzellhämoglobin, HbS, hat eine Substitution von Glu→Val an der 6. Position der β -Kette und wird deshalb auch HbS $\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$ deklariert. Die homozygote Form HbS ($\beta_s\beta_s$) verursacht die Symptome, die als Sichelzellkrankheit zusammengefasst werden. Das β_s -Gen kann auch mit

anderen β -Kettenvarianten vererbt werden. Auch Patienten mit einer heterozygoten Form einer β -Thalassämie, zusammen mit HbS (HbS/ β -Thalassämie) weisen eine Klinik mit Sichelzellformationen und daraus resultierenden Gefäßverschlüssen auf. Die Bezeichnung „Sichelzellkrankheit“ wird als generischer Terminus benutzt und beinhaltet die Sichelzellanämie und alle anderen Krankheitsbilder, die durch eine Sichelzell-Bildung und assoziierte pathologische Prozesse hervorgerufen werden.

Tabelle 11: Ursachen für eine Sichelzellkrankheit

(Monplaisir et al., 1986; Witkowska et al., 1991; Wong et al., 1969; Cohen Solal et al., 1998; Nagel et al., 1998)

Sichelzellanämie (homozygote Form von HbS)	
Verbindungen von heterozygoten Formen	
<ul style="list-style-type: none"> • HbSC • HbS/C-Harlem • HbS/O-Arab • HbC/S-Antilles • HbC/C-Harlem 	<ul style="list-style-type: none"> • HbS/β-Thalassämie • HbS/S-Antilles • HbS/Lepore • HbS/Quebec-Chori
Mutationen in heterozygoten Formen	
<ul style="list-style-type: none"> • HbS-Antilles • HbS-Oman 	<ul style="list-style-type: none"> • HbAS + HbA/Conakry

Tabelle 12: Klinische Symptome der Sichelzellkrankheit
(Axford et al., 1996)

<p>Schmerzhafte vaso-okklusive Symptome</p> <ul style="list-style-type: none"> • Knochen (Hand-Fuß- Syndrom, Hüften, Schulter, Wirbelsäule) • Brust • Abdomen (Girdle Syndrom) • Milz <p>Hämatologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anämie • aplastische Krisen <p>Immunologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • erhöhte Infektanfälligkeit <p>Dermatologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beinulzerationen 	<p>Kardiovaskuläres System</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rechts- und Linksherzhypertrophie <p>Neurologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemiplegien • Konvulsionen <p>Renal</p> <ul style="list-style-type: none"> • glomeruläre Sklerose • Tubulusschaden • kortikale und medulläre Infarkte • Infektionen <p>Sonstige</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retinopathien • Priapismus
--	---

4.2.4 Epidemiologie von Hämoglobinvarianten HbC und HbS

Das klinische Spektrum der Sichelzellkrankheit ist in Westafrika seit mehreren Jahrhunderten bekannt. Die Krankheit hat viele Namen unter den verschiedenen Stämmen wie „chwechweechwe“ (Ga Stamm), „nwiwii“ (Faute Stamm), „nuidudui“ (Ewe Stamm) oder „ahotutuo“ (Twi Stamm) (Konotey-Ahulu et al., 1974). Viele Generationen in Westafrika waren mit den verschiedenen Auswirkungen der Krankheit vertraut. Es war auch bekannt, dass diese Erkrankung gehäuft in Familien auftrat, also vererbt wurde (Conley CL, 1980). Endemische Infektionen, schlechte Ernährung und fehlende medizinische Versorgung in West- und Zentralafrika führten dazu, dass Patienten mit der homozygoten Form der Sichelzellanämie nur selten das Kindesalter überlebten. Dies führte zu der Fehlinterpretation, dass die homozygote Form der Sichelzellkrankheit in Afrika selten ist und zusätzliche Faktoren wie Genetik oder Umwelt für eine höhere Prävalenz in Amerika verantwortlich waren (Raper et al., 1950). HbC hat eine Prävalenz von bis zu 40% in Westafrika und Nord-Ghana

(Tabelle 8). Auffällig ist, dass die geographische Verteilung des β s-Gens sehr ähnlich dem des β c-Gens ist. Beide Gene sind auf 2 Regionen in Westafrika konzentriert (Abbildung 8). Eine Region entspricht dem heutigen Nigeria und Ghana und die zweite Region Gabun und Zaire. Im Gegensatz zum HbC findet man auch gehäuft HbS im nordöstlichen Teil von Saudi-Arabien und in Indien. Es gibt historische Hinweise, dass die erhöhte Prävalenz von HbS in Saudi-Arabien durch Völkerwanderungen aus Ostafrika entstanden sein können. Sklaventransporte von Ostafrika zum persischen Golf florierten von 200 bis 1500 n. Chr. Im Jahr 1051 berichtete der persische Geschichtsschreiber Naser-i-Khusraw von 30.000 farbigen Arbeitssklaven aus Abyssinien (heutiges Äthiopien) bei einem Prinzen. Vermutlich herrschte ein aktiver Handel zwischen Ostafrika und Indien bis zum 19. Jahrhundert. Die Verteilung des β s- und β c-Gens in der neuen Welt basiert hauptsächlich auf Emigration aus Westafrika. Die Prävalenz von HbS oder HbC bei Afroamerikanern beträgt zwischen 6-15% und 1-3,5% (Nagel et al., 1992). Ähnliche Prävalenzen findet man auch unter der schwarzen Bevölkerung in Zentral- und Südafrika, wo in früheren Zeiten aktiver Sklavenhandel betrieben wurde (Gelpi et al., 1973; Serjeant et al., 1981).

Tabelle 13: Die Prävalenz in % von HbC und HbS in verschiedenen Populationen

Die Prävalenzen weichen je nach Literaturstelle zum Teil stark voneinander ab. Bei fehlenden Werten wurden keine Veröffentlichungen gefunden.

(White, 1983; Livingstone, 1985; de Pablos, 1985; Nagel et al., 1992; Serjeant et al., 1992; Talafih et al., 1996; Wurie et al., 1996; Flint et al., 1998; Segbena et al., 1998)

Mit * markiert: Ursprungsland des Autors.

Land / Bevölkerungsgruppe	HbC [%]	HbS [%]
<i>Westafrika</i>		
Burkina Faso	15-40	2-34
Ghana	8-40	3-25
Benin	7-27	6-28
Elfenbeinküste	1-50	2-26
Togo	7-17	6-28
Nigeria	<1-9	10-41
Niger	1-8	5-23
Senegal	<1-6	3-15
Liberia	1-3	<1-29
Gambia	<1-2	6-28
Guinea Bissau	<1-1,5	<1-25
Guinea		13-33
Sierra Leone		22-30
<i>Nordafrika</i>		
Algerien	<1-13	<1-15
Marokko	<1-6	<1-7
Libyen		<1-70
Sudan		<1-17
Tunesien		<1-2
Ägypten		<1
<i>Zentralafrika</i>		
Kamerun	<1	<1-31
Gabun		8-32
Kongo		7-32
Zentralafrikanische Republik		2-24

Land / Bevölkerungsgruppe	HbC [%]	HbS [%]
Afroamerikaner	1-3,5	6-15
<i>Karibik</i>		
Barbados	5	
Antillen	1-4,5	1-14
Jamaika	2-4	3,5-12
Dominikanische Republik	3	6-12
Bahamas	3	14
Haiti	1-3	7-17
Puerto Rico	<1-2	<1-8
Guadeloupe		4.4
<i>Südamerika</i>		
Franz. Guyana	0-7	0-18
Kolumbien	0-6	0-15
Surinam	0-6	0-22
Brasilien	0-4	0-16
Venezuela	0-3	0-9
Chile	<1	<1
<i>Zentralamerika</i>		
Mexiko	<1	<1-9
Belize		0-25
Panama		0-21
Guatemala		<1-17
Honduras		<1-16
Costa Rica		<1-8
El Salvador		<1-2
<i>Europa</i>		
Türkei	0,5-1	<1-34
Spanien	0,1-0,2 (Südspanien)	
Griechenland		0-32
Sizilien		<1-13
Portugal		<1-5

Land / Bevölkerungsgruppe	HbC [%]	HbS [%]
Zypern		<1
<i>Mittlerer Osten</i>		
Israel arabisch-stämmig		1-38
Israel jüdisch-stämmig		≈0
Saudi-Arabien		1-38
Syrien		<5-25
Irak		0-25
Jordanien		4-6
Oman		5
Bahrain		2,5
Kuwait, Abu Dhabi, Emirate		2
Jemen		1-2
Iran*		≈0
<i>Asien</i>		
Indien		0-35
Pakistan		<1
<i>Ostafrika</i>		
Kenia, Uganda, Tansania		1-39
Burundi		1,5-26
Ruanda		<1-15
<i>Südafrika</i>		
Angola		8-40
Mosambik		<1-40
Sambia		<1-30
Madagaskar		<1-23
Malawi		3-18
Namibia, Südafrika, Simbabwe		<1-15
Botswana		<1

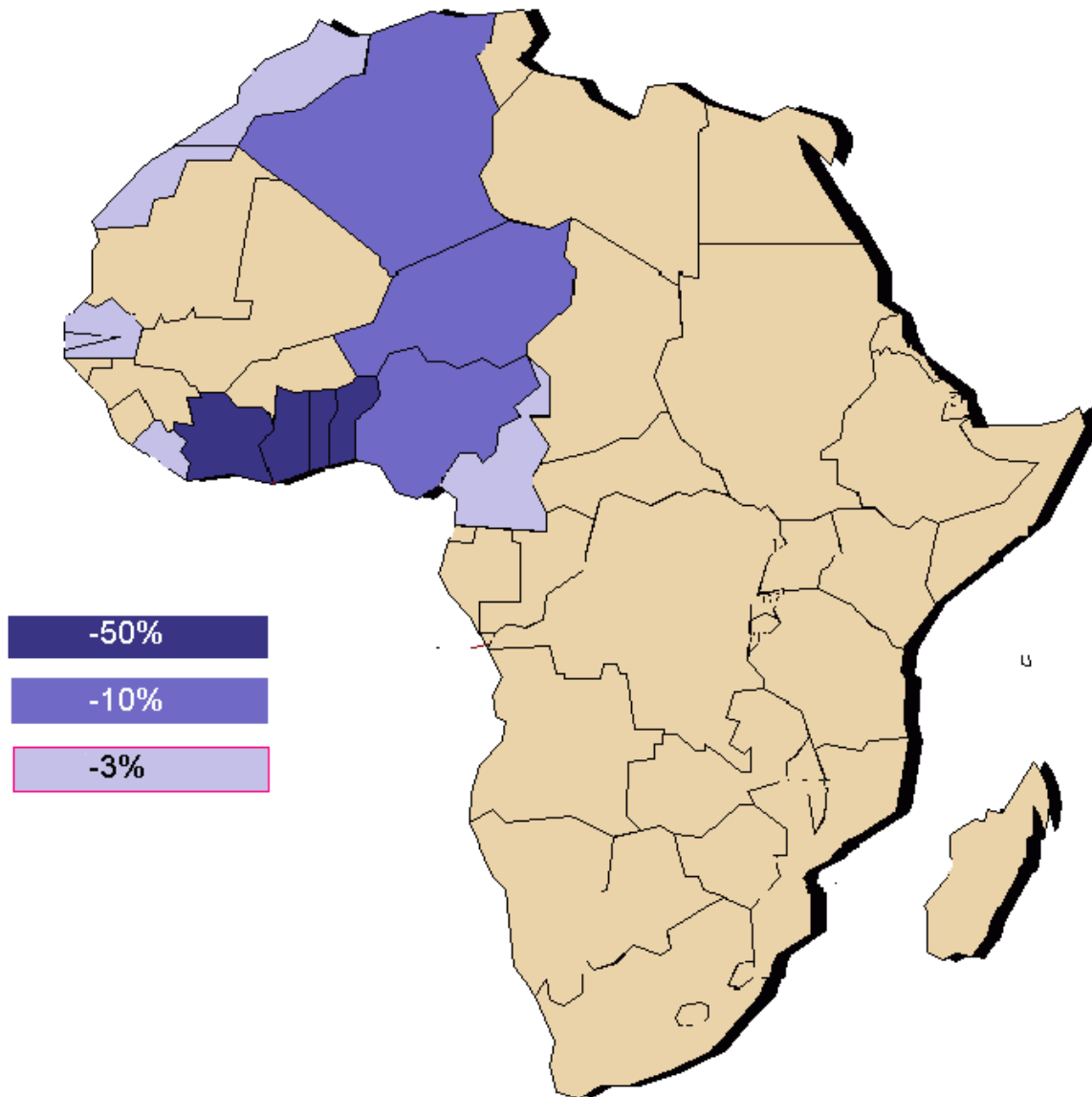


Abbildung 15: Geographische Darstellung der Prävalenz von HbC

Neue Untersuchungen der Globingen-Struktur brachten neue Erkenntnisse über den Ursprung und der Wanderung des β s- und β c-Gens. Mit Hilfe eines Restriktionsendonuklease-Mappings mit Hpa I konnte ein Polymorphismus nachgewiesen werden, der eng an die β s und β c-Mutation gekoppelt ist (Kan et al., 1978). Fast alle Kaukasier und 97% der schwarzen Bevölkerung mit dem Phänotyp HbAA haben ein 7,6kb (seltener 7,0kb) Hpa I-Fragment, welches das gesamte β -Globingen umfasst. Nur 3% der Bevölkerung hat das 13kb Fragment. Im Gegensatz findet man bei 70% der Afroamerikaner mit dem Phänotyp HbS das 13kb Fragment. Bei Afroamerikanern mit dem Phänotyp HbC findet man fast ausschließlich das 13kb Fragment.

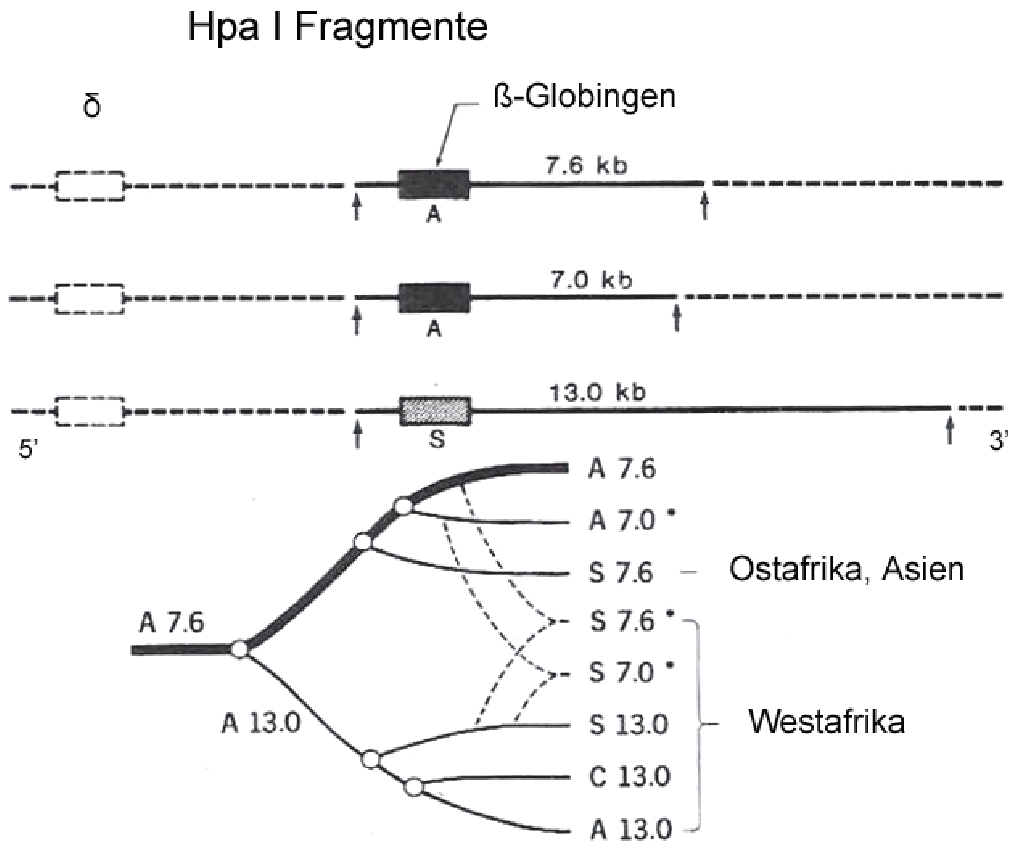


Abbildung 16: Polymorphismus des β -Globingens und Evolution aufgezeigt durch Hpa I Restriktionsendonuklease (Kan et al., 1980)

Die Vermutung liegt nahe, dass sowohl die β_s als auch β_c Mutation beide ihren Ursprung in einer β -Genmutation auf dem 13kb Fragment haben und dass diese Mutation ursprünglich geographisch auf eine kleine Region in Ghana begrenzt war. Aufgrund der protektiven Wirkung gegen Malaria hatten Träger des β_s - und β_c -Gens einen Selektionsvorteil zum Ursprungs- β_a -Gen und konnten sich somit weiter verbreiten. Bei Nordafrikanern und Sizilianern findet man gehäuft 13 kb Fragmente bei β_s -Genträgern als Beweis für einen Ursprung in Westafrika. In Zentral- und Ostafrika sowie in Saudi-Arabien und Indien ist das β_s -Gen häufig mit dem 7,6kb Wildtyp Fragment assoziiert. Vermutlich ist dieses Gen unabhängig von Westafrika entstanden. Es könnte durch eine Spontanmutation in Ostafrika entstanden sein und durch den o.g. Sklavenhandel nach Saudi-Arabien und Indien Verbreitung gefunden haben. Tatsächlich legen Untersuchungen des Restriktionspolymorphismus in verschiedenen Populationen in Afrika unabhängige β_s -Mutationen nahe (Abbildung 9). Beim β_c -Gen gibt es auch aufgrund der wesentlich niedrigeren Prävalenzen in den genannten Regionen nur wenige Untersuchungen.

Boehm et al., 1985 schlussfolgerten aus Restriktions-Haplotypisierungen, dass das β^c -Gen bei Schwarzen einen einzigen Ursprung hat und durch Rekombination des β -Globingens über Mutationen zu anderen Haplotypen Verbreitung gefunden hat. Bei 22 von 25 untersuchten Chromosomen fand man den selben Haplotyp (definiert durch acht polymorphe Restriktionsabschnitte). Diesen Haplotyp findet man nur selten bei Chromosomen mit einem β^a -Gen. Haplotypisierungen von Trabuchet et al. deuten auf einen unizentrischen Ursprung der HbC Mutation in Zentral-Westafrika hin (Trabuchet et al., 1991).

In der beschriebenen Familienstudie wäre eine Untersuchung mit einer Hpa I Restriktionsendonuklease oder eine Haplotypisierung sicherlich interessant gewesen, wobei das Resultat auch keine sichere Aussage über die Herkunft des β^c -Gens in der Familie hätte geben können. Leider konnte keine weiterführende Familienstudie durchgeführt werden, da andere Familienmitglieder nicht für die Untersuchung zugänglich waren. Die Frage nach einer Spontanmutation im Iran oder einem Ursprung in Westafrika wird offen bleiben. In der Literatur gibt es bis dato keine Fallbeschreibung über HbC oder HbAC im Iran (Tabelle 8).

4.2.5. Prävalenz von HbS/ HbC vs. Malaria

Spätestens seit Haldane ist bekannt, dass Träger von Hämoglobinvarianten einen relativen Schutz gegen lebensbedrohliche Malariainfektionen haben. Untersuchungen belegen, dass sowohl HbAC als auch HbAS einen Schutz gegenüber Plasmodium falciparum, dem Erreger der Malaria bieten (Haldane et al., 1949). Wenn man die Verteilung des β^s -Gens in der alten Welt der Verteilung der Falciparum-Malaria gegenüberstellt (Livingstone et al., 1976; Boyd et al., 1949), kann man eine deutliche Übereinstimmung erkennen.

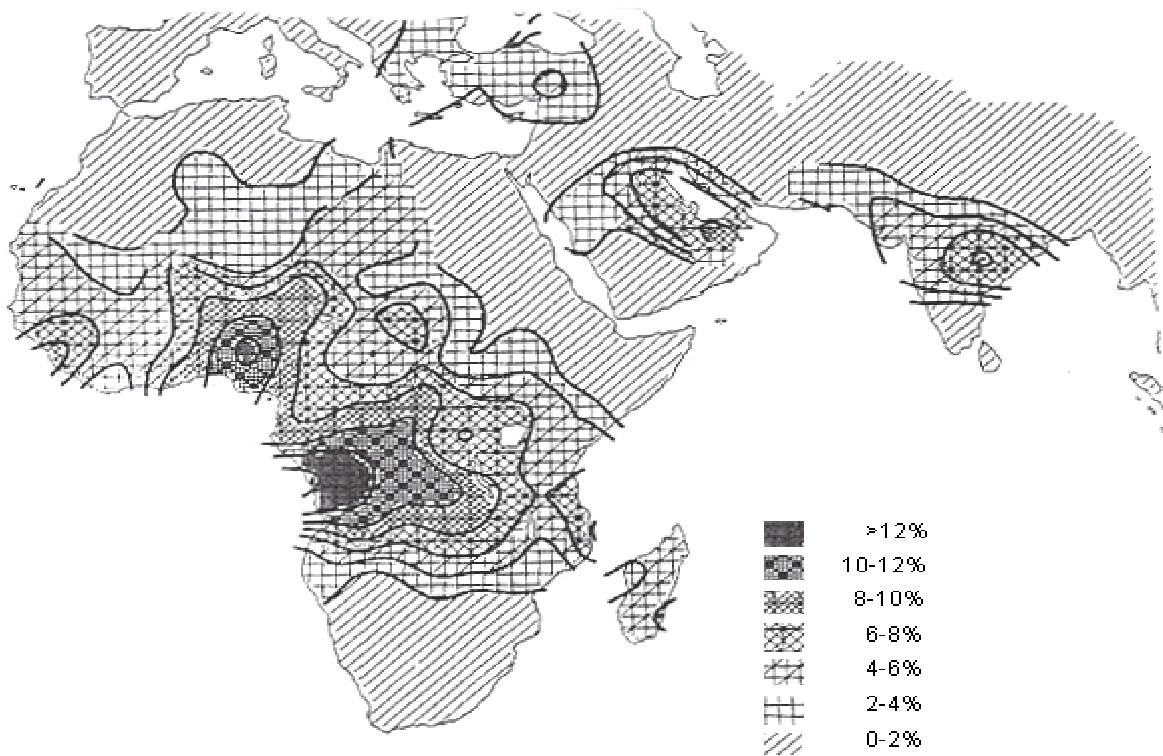


Abbildung 17: Verteilung des HbS-Gens in der alten Welt (Livingstone et al., 1976)

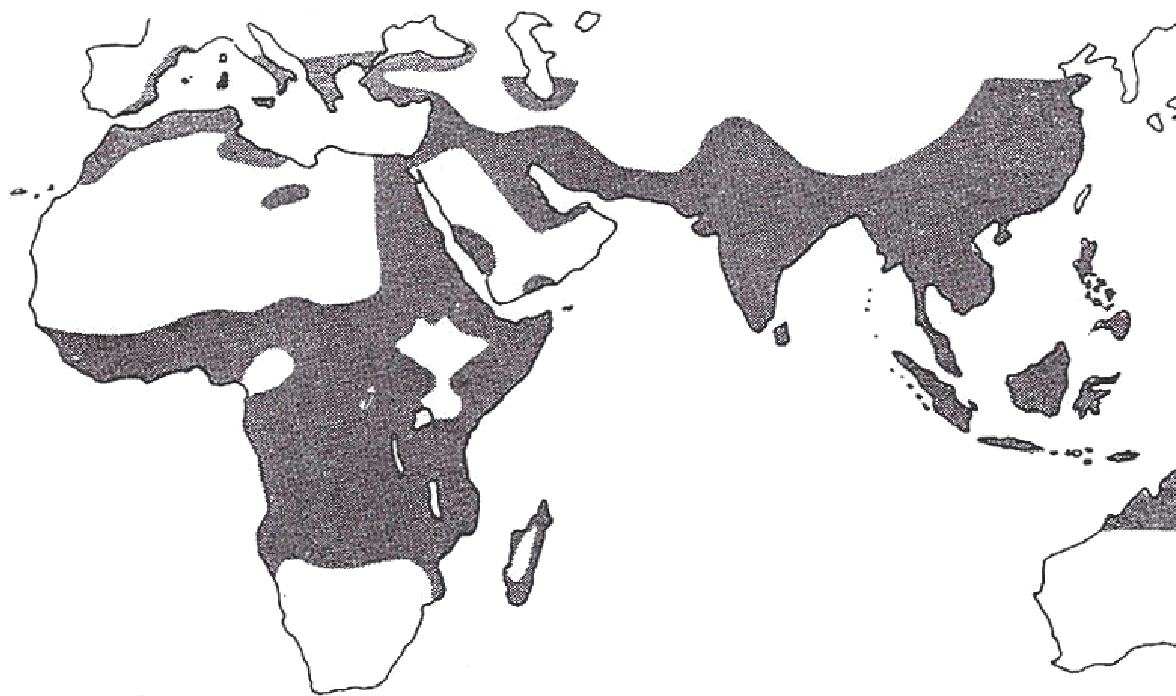


Abbildung 18: Verteilung von Malaria bedingt durch Plasmodium falciparum vor ungefähr 150 Jahren (Boyd et al., 1949)

Studien in Nigeria zeigen eine Prävalenz des HbAS von 24% bei Neugeborenen und von 29% bei 5-jährigen Kindern. Diese Daten sprechen in Zusammenhang mit der geographischen Verteilung für einen Selektionsvorteil der HbAS und HbAC-Träger. Bemerkenswert ist, dass dieser Schutz vor allem bei Kindern und Neugeborenen ausgeprägt ist. Bei Kindern, die sich mit Malaria infiziert haben, verläuft die Erkrankung seltener schwer oder meist in deutlich abgeschwächter Form ab (Fleming et al., 1979). Diesen Unterschied kann man bei älteren Kindern nicht mehr feststellen (Kramer et al., 1978).

Um die Hypothese zu belegen, dass HbC gegen eine schwere Form von Malaria protektiv ist, initiierten Agarwal et al. eine Studie in der Dogon Population in Bandiagara, Mali, Westafrika. Die Region ist bekannt für eine hohe Prävalenz von HbC (8,7%) und gleichzeitig niedriger Prävalenz von HbS (<1,6%) (Agarwal et al., 2000). Die Ergebnisse belegten einen Schutz vor der schweren Form der Malaria bei HbC-Trägern, wobei der Schutz bei HbAS-Trägern vermutlich höher ist als bei HbAC-Trägern. Modiano et al. konnten in einer großen Studie (n = 4.348) in Burkina Faso zeigen, dass HbC in 29% der Fälle bei der heterozygoten Form HbAC ($p = 0.0008$) eine Malariamaniifestation verhindern konnte (Modiano et al., 2001). Bei der homozygoten Form HbC bot sie sogar in 93% der Fälle ($p = 0.0011$) einen Schutz. In den Epizentren des HbC zeigt sich eine relativ niedrige β s-Gen Prävalenz. Diese Ergebnisse können zusammen mit der Tatsache, dass HbAC und HbCC eine geringere Pathologie aufweisen als HbS oder HbSC, zu der Schlussfolgerung führen, dass langfristig gesehen bei fehlender Malariakontrolle HbC das vorherrschende HbS ablösen könnte.

Der genaue zelluläre Mechanismus des Schutzeffektes gegenüber Malaria ist noch nicht ganz geklärt. Man vermutet jedoch, dass durch die Formation von Sichelzellen die befallenen Erythrozyten leichter eliminiert werden können (Luzzatto et al., 1970). Ursachen für die erhöhte Sichelzell-Formation bei Malariainfektion wurden von verschiedenen Autoren untersucht (Friedman et al., 1978; Pasvol et al., 1978; Roth et al., 1978; Friedman et al., 1979).

4.3. Richtlinien zur Untersuchung von Hämoglobinopathien

Hämoglobinopathien repräsentieren in einigen Ländern wie z.B. der USA oder Brasilien ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem, da sie in einigen Populationen die häufigste genetische Störung darstellen. Allein die Sichelzellerkrankheit betrifft jedes vierhundertste afroamerikanische Neugeborene. Diese und andere Hämoglobinopathien sind häufig bei Personen aus Afrika, dem Mittelraum, der Karibik oder Zentral- und Südamerika. Obwohl ein Screening von Neugeborenen seit mehreren Jahren möglich ist, findet ihre Anwendung noch keine weite Verbreitung. Mögliche Gründe spielen hierbei der fehlende Nachweis einer Verbesserung des „Outcomes“ bei einer frühen Diagnose, die Frage, wen man screenen sollte, technische Schwierigkeiten bei Neonaten, verursacht durch einen hohen HbF-Anteil und fehlende Richtlinien über das Procedere bei einem Träger einer Hämoglobinvariante. Bei der Sichelzellanämie ist seit mehr als 20 Jahren bekannt, dass Kinder mit dieser Erkrankung ein erhöhtes Risiko für bakterielle Infektionen, insbesondere durch *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) haben. In den ersten 3 Lebensjahren ist das Risiko für eine Infektion am höchsten. Als eine typische Erstmanifestation der Erkrankung kann sie eine Letalität von bis zu 30% aufweisen. Eine aplastische Krise, eine weitere fatale Komplikation kann auch in der Kindheit zum Tode führen. Studien zeigen, dass durch eine frühe Diagnosestellung mit konsekutiver adäquater Behandlung (z.B. Penicillin-Prophylaxe) sowohl die Morbidität als auch die Mortalität signifikant gesenkt werden können (Ashley-Koch et al., 2000). Eine sehr frühe Diagnosestellung könnte durch ein Neugeborenen-Screening erreicht werden. Der Nutzen dieses Screening wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert. Es bleibt auch unklar, ob präsymptomatische Interventionen einen sicheren Vorteil bei Kindern mit anderen Hämoglobinopathien (z.B. HbE-beta Thalassämien und homozygote beta- und alpha-Thalassämien) bieten. In einer Konferenz des „National Institute of Health“ wurden Richtlinien herausgegeben und ein generelles Screening von allen Neugeborenen, unabhängig von der Rasse oder der ethnischen Herkunft empfohlen (Agency for Health Care Policy and Research, 1993; National Institute of Health Consensus Development Conference Statement, 1987).

Tabelle 14: Empfehlungen zum Screening von Neugeborenen

(American College of Obstetricians and Gynecologists, 1996; Canadian Task Force on the Periodic Health Examination, 1994; US Preventive Services Task Force, 1996)

American College of Obstetricians and Gynecologists	Screening aller gebärfähigen Frauen aus karibischer, lateinamerikanischer, asiatischer, mediterraner oder afrikanischer Herkunft
Canadian Task Force on the Periodic Health Examination	Bei allen werdenden Eltern aus dem Mittelmeerraum, Afrika, dem Nahen Osten, Ostindien und spanischer oder asiatischer Herkunft sollte eine Familienanamnese erstellt werden (insbesondere bezüglich genetische Erkrankungen). Ein Screening mit einer Hb-Elektrophorese oder einer iso-elektrischen Fokussierung wird für alle Schwangeren einer Risikogruppe, nicht jedoch für andere Erwachsene empfohlen.
US Preventive Services Task Force	„Es gibt keine evidenz-basierte Studien, die ein Pro- oder Contra gegenüber einem Hb-Elektrophorese-Screening für Hämoglobinopathien bei jungen Erwachsenen aus einer ethnischen Gruppe mit einem erhöhten Risiko für HbS, Thalassämien oder anderen Hämoglobinopathien rechtfertigen.“

Wie aus der Tabelle 12 ersichtlich, sind allein in Nordamerika die Empfehlungen bezüglich eines Neugeborenen-Screenings kontrovers. Aufgrund der verschiedenen Meinungen über den Nutzen eines generellen Screenings und in Anbetracht der Kosten für das jeweilige Gesundheitssystem kann man ein gezieltes Screening von Risikogruppen für eine Hämoglobinopathie (z.B. Afroamerikaner für HbS, West-Ghanesen für HbC, Mediterraner für homozygote Thalassämieformen) empfehlen.

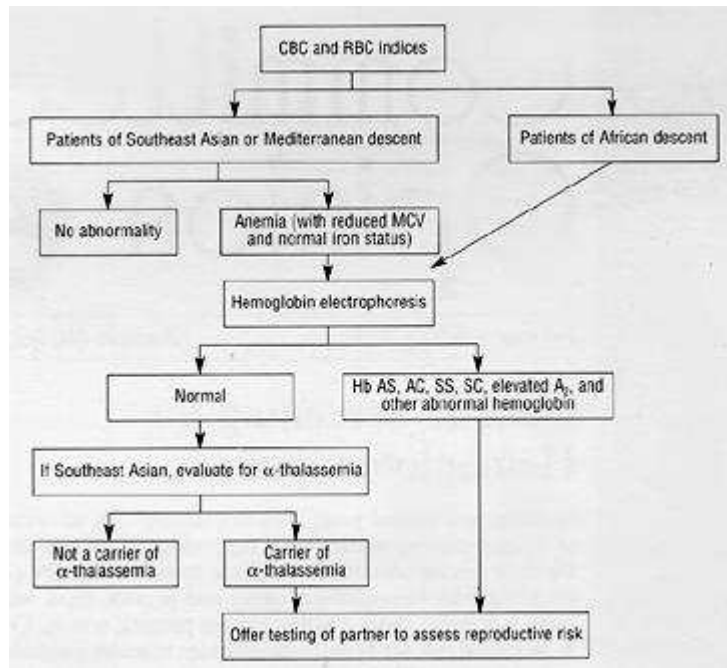


Abbildung 19: Pränatale hämatologische Evaluation bei Patienten aus Afrika, Südostasien oder mediterraner Herkunft
 (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2000)

5. Zusammenfassung

Ziel der Untersuchung war es, anhand einer Hämoglobinanomalie beim Autor mit einfachen Mitteln ein effizientes und spezifisches Verfahren zur Identifikation von unbekanntem Hb-Mutanten zu entwickeln. Die entdeckte Hb-Mutante wird im Anschluß bezüglich ihrer Epidemiologie und Klinik diskutiert. Exemplarisch werden schrittweise die einzelnen Untersuchungsmethoden zur Identifikation einer Hämoglobinvariante dargestellt.

In Anlehnung an die ICSH-Empfehlungen wurden Schritte zur systematischen Analyse einer Hämoglobinanomalie entwickelt. Neben der Erfassung von Basisdaten wie klinischer Zustand und hämatologische Parameter wurden alle erreichbaren Familienangehörigen einem Screening unterzogen. In einer initialen Zelluloseacetat-Elektrophorese zusammen mit einer Kontrollprobe bei alkalischem pH (8,2-8,6) konnten gängige Hb-Varianten detektiert werden. Um die Mutation der jeweiligen Kette zuzuordnen folgte eine Zelluloseacetat-Elektrophorese mit 8M Harnstoff, bei der das Hämoglobin in seine α und β -Ketten aufgetrennt wurde. Aus dieser Information konnte gezielt eine Sequenzierung des betroffenen Globingens durchgeführt werden, um die Mutation auf genomischer Ebene zu lokalisieren. Die optimalen PCR-Bedingungen wurden durch Versuchsreihen ermittelt. Dazu wurden biotinylierte Reverse-Primer eingesetzt. Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel ermöglichten die Bindung der biotinylierten DNA-Fragmente und die anschließende magnetische Trennung der doppelsträngigen DNA. Die Sequenz des PCR-Produktes wurde anhand einer automatisierten Fluoreszenz-Sequenzierung der DNA bestimmt.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Hämoglobinvariante handelte es sich um die heterozygote Form des HbC. In der durchgeführten Familienstudie konnte keine homozygote Form des HbC nachgewiesen werden.

Die heterozygote Form hat keine hohe klinische Relevanz. In Gebieten mit einer hohen Prävalenz von HbS kann bei Nachfahren eines HbAC-Trägers in Verbindung mit einem HbAS/HbS-Träger eine Form der Sichelzellerkrankung weitervererbt werden. Die Bezeichnung Sichelzellerkrankung beinhaltet die Sichelzellanämie und alle anderen Krankheitsbilder, die durch eine Sichelzell-Bildung und assoziierte pathologische Prozesse hervorgerufen werden. Bei der homozygoten Form von HbC zeigen Betroffene eine milde bis moderate Form einer hämolytischen Anämie. In der Regel sind die HbC-Träger asymptomatisch.

HbC hat eine Prävalenz von bis zu 40% in Westafrika und Nord-Ghana. Auffällig ist, dass die geographische Verteilung des β s-Gens sehr ähnlich dem des β c-Gens ist. Beide Gene sind auf zwei Regionen in Westafrika konzentriert. Die Vermutung liegt nahe, dass sowohl die β s als auch β c Mutation beide ihren Ursprung in einem β -Genmutation haben und dass diese Mutation ursprünglich geographisch auf eine kleine Region in Ghana begrenzt war. Wenn man die geographische Verteilung des β s-Gens der Prävalenz von Plasmodium falciparum malariae gegenüberstellt, lässt sich eine deutliche Übereinstimmung feststellen. Aufgrund der protektiven Wirkung gegen Malaria hatten offenbar Träger des β s- und β c-Gens einen Selektionsvorteil zu den Trägern des Ursprungs-Gens und konnten sich somit weiter verbreiten. Da der untersuchte Autor aus dem heutigen Iran stammt und es bis dato keine Fallbeschreibung über HbC oder HbAC im Iran gibt wird die Frage nach einer Spontanmutation oder einem Ursprung in Westafrika offen bleiben.

Nach den Richtlinien des „National Institute of Health“ (USA) wird ein generelles Screening von allen Neugeborenen auf Hamoglobinanomalien, unabhängig von der Rasse oder der ethnischen Herkunft empfohlen. Die Empfehlungen bezüglich eines Neugeborenen-Screenings sind weltweit kontrovers. Aufgrund der verschiedenen Meinungen über den Nutzen eines generellen Screenings und in Anbetracht der Kosten für das jeweilige Gesundheitssystem kann man ein gezieltes Screening von Risikogruppen für eine Hämoglobinopathie (z.B. Afroamerikaner für HbS, West-Ghanesen für HbC, Mediterraner für homozygote Thalassämieformen) empfehlen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quartärstruktur des Hämoglobinmoleküls.....	10
Abbildung 2: Anteil der Hämoglobine während der Altersentwicklung.....	11
Abbildung 3: Normale Sauerstoff-Dissoziationskurve (links) und hyperbole Sauerstoff-Dissoziationskurve bei Myoglobin oder abnormem Hämoglobin (rechts).....	13
Abbildung 4: Synthese der β -Globinkette	14
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Hämoglobin-Genloci.....	15
Abbildung 6: Schema der Polymerase-Kettenreaktion	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung der PCR mit biotinylierten Primern	34
Abbildung 8: Nukleotid-Sequenz des β -Globingens	37
Abbildung 9: Zelluloseacetat-Elektrophorese von Hämolysaten mit anschließender Ponceau S-Färbung	40
Abbildung 10: Zelluloseacetat-Elektrophorese von Hämolysaten mit anschließender Amidoschwarz-Färbung.....	41
Abbildung 11: Acetatelektrophorese der Familienstudie.....	42
Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der Globine des Probanden mit einer Hämoglobinvarianten nach Versetzen des Hb mit 8M Harnstoff	45
Abbildung 13: PCR-Produkt der genomischen DNA des Probanden mit Hämoglobinvariante.....	46
Abbildung 14: Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Fluoreszenz- Sequenzierung des PCR-Produktes.....	47
Abbildung 15: Geographische Darstellung der Prävalenz von HbC	59
Abbildung 16: Polymorphismus des β -Globingens und Evolution aufgezeigt durch Hpa I Restriktionsendonuklease.....	60
Abbildung 17: Verteilung des HbS-Gens in der alten Welt	62
Abbildung 18: Verteilung von Malaria bedingt durch Plasmodium falciparum vor ungefähr 150 Jahren	62
Abbildung 19: Pränatale hämatologische Evaluation bei Patienten aus Afrika, Südostasien oder mediterraner Herkunft.....	66

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hämoglobintypen während der Altersentwicklung	10
Tabelle 2: Auflistung der häufigsten Hämoglobinvarianten/ Thalassämien, Klinik und Diagnostik.....	18
Tabelle 3: Auftragsmodus bei der Zelluloseacetat-Elektrophorese, pH 8.6	25
Tabelle 4: Auftragsmodus Elektrophorese Familienstudie.....	26
Tabelle 5: Laborchemische Untersuchungen der Familienmitglieder	27
Tabelle 6: Forward- und Reverse-Primer	36
Tabelle 7: PCR-Protokoll	38
Tabelle 8: Hämatologische Daten der Familienstudie	43
Tabelle 9: Photometrische Messwerte.....	44
Tabelle 9: Ursachen für eine Sichelzellkrankheit	53
Tabelle 10: Klinische Symptome der Sichelzellkrankheit.....	54
Tabelle 11: Die Prävalenz in % von HbC und HbS in verschiedenen Populationen .	56
Tabelle 12: Empfehlungen zum Screening von Neugeborenen.....	65

8. Literaturverzeichnis

- (1) Agarwal A et al., Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2358-63.
- (2) Agency for Health Care Policy and Research. Sickle cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in newborns and infants. Clinical Practice Guideline no. 6. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, 1993. (Publication no. 93-0562.)
- (3) American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), ACOG Committee Opinion: Genetic Screening For Hemoglobinopathies, 2000
- (4) American College of Obstetricians and Gynecologists. Hemoglobinopathies in Pregnancy: ACOG Technical Bulletin #220. Washington, DC: American College of Obstetricians and Gynecologists; 1996.
- (5) Anderson M et al., Pregnancy and homozygous haemoglobin C disease. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1967 Oct;74(5):694-6.
- (6) Ashley-Koch A et al., Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000 May 1;151(9):839-45.
- (7) Axford J et al., *Medicine*, Blackwell Science, 1996
- (8) Betke K, Diagnose und klinische Bedeutung der Hämoglobinanomalien. *Internist* 1960;6:236-241
- (9) Boehm CD et al. Evidence supporting a single origin of the beta(C)-globin gene in blacks. *Am J Hum Genet*. 1985 Jul;37(4):771-7.
- (10) Boyd MF *Malariology*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1949.
- (11) British Committee for Standards in Hematology, The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Br J Haematol* 1998;101:783-92.
- (12) Bunn HF et al., Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Dec;79(23):7527-31.
- (13) Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. Screening for hemoglobinopathies in Canada. In: *The Canadian Guide to Clinical Preventive Health Care*. Ottawa, Canada: Minister of Supply and Services; 1994: chap 20.
- (14) Conley CL, Sickle cell anemia-the first molecular disease. In Wintrobe MM (ed.): *Blood, Pure and Eloquent*. New York, McGraw Hill, 1980, p.139.
- (15) Cooper A, Spurious conformational transitions in proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jun;78(6):3551-3.

- (16) Craig JE et al. Genetic heterogeneity in heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood* 1997;90:428-34.
- (17) Davidsohn, DD et al., J.B. *Clinical diagnosis by laboratory methods*. 15 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1974:206-208, 218.
- (18) Deisseroth A et al., Localization of the human alpha-globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell*. 1977 Sep;12(1):205-18.
- (19) de Pablos JM. Incidence of HbC trait in an area of southern Spain. *Br J Haematol*. 1985 Jul;60(3):584-5.
- (20) Diggs LW et al., Intraerythrocytic crystals in a white patient with hemoglobin C in the absence of other types of hemoglobin. *Blood*. 1954 Dec;9(12):1172-84.
- (21) Efstratiadis A et al., The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell*. 1980 Oct;21(3):653-68.
- (22) Fleming AF et al., Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. *Ann Trop Med Parasitol*. 1979 Apr;73(2):161-72.
- (23) Flint J et al. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol*. 1998 Mar;11(1):1-51. Review.
- (24) Friedman MJ et al., Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Apr;75(4):1994-7.
- (25) Friedman MJ et al., *Plasmodium falciparum*: physiological interactions with the human sickle cell. *Exp Parasitol*. 1979 Feb;47(1):73-80.
- (26) Friedman MJ et al., Ultrastructural damage to the malaria parasite in the sickled cell. *J Protozool*. 1979 May;26(2):195-9.
- (27) Gelpi AP et al., Migrant populations and the diffusion of the sickle-cell gene. *Ann Intern Med*. 1973 Aug;79(2):258-64.
- (28) Gusella J et al., Precise localization of human beta-globin gene complex on chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Oct;76(10):5239-42.
- (29) Harrison TR et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Education (ISE Editions), 2002
- (30) Hartz WH et al., Hemoglobin C disease: report of four cases. *Blood*. 1955 Mar;10(3):235-46.
- (31) Herrick JB et al., Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med*. 1974 133:611.
- (32) Higgs DR et al., Alpha-thalassemia. *Curr Top Hematol*. 1983;4:37-97. 1983

- (33) Huisman TH et al., Chromatographic separation of hemoglobins A 2 and C. The quantities of hemoglobin A 2 in patients with AC trait, CC disease, and C - - thalassemia. *Clin Chim Acta*. 1972 Aug;40(1):159-63.
- (34) Huisman THJ et al., A Syllabus of Human Hemoglobin Variants- Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, Georgia, 1996.
- (35) ICSH, Simple electrophoretic system for presumptive identification of abnormal hemoglobins. By the International Committee for Standardization in Hematology. *Blood*. 1978 Nov;52(5):1058-64.
- (36) ICSH, Recommendations of a system for identifying abnormal hemoglobins. By the International Committee for Standardization in Hematology. *Blood*. 1978 Nov;52(5):1065-7.
- (37) ICSH, Recommendations for neonatal screening for haemoglobinopathies. International Committee for Standardization in Haematology. ICSH Expert Panel on Abnormal Haemoglobins. *Clin Lab Haematol*. 1988;10(3):335-45.
- (38) ICSH, Recommendations for the analysis of red cell, white cell and platelet size distribution curves. Methods for fitting a single reference distribution and assessing its goodness of fit. International Committee for Standardization in Haematology. ICSH Expert Panel on Cytometry. *Clin Lab Haematol*. 1990;12(4):417-31.
- (39) Ingram VM et al., A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956 Oct 13;178(4537):792-4.
- (40) Itano HA et al., A new inherited abnormality of human hemoglobin, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1950 Nov;36(11):613-7.
- (41) Jane SM, Cunningham JM. Understanding fetal globin gene expressions: a step towards effective HBF reactivation in hemoglobinopathies. *Br J Haematol* 1998;102:415-22
- (42) Jeffreys AJ et al. Localisation of the G gamma-, A gamma-, delta- and beta-globin genes on the short arm of human chromosome 11. *Nature*. 1979 Oct 18;281(5732):606-8.
- (43) Jensen WN et al., Clinical and necropsy findings in hemoglobin C disease. *Blood*. 1957 Jan;12(1):74-83.
- (44) Jongeneel J, van Wissen M., Optimizing measurement of glycosylated hemoglobins. *Clin Chem*. 1979 Apr;25(4):642.

- (45) Kan YW et al. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Nov;75(11):5631-5.
- (46) Kan YW et al. Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science*. 1980 Jul 18;209(4454):388-91.
- (47) Konotey-Ahulu FI et al., The sickle cell diseases. Clinical manifestations including the "sickle crisis". *Arch Intern Med*. 1974 Apr;133(4):611-9.
- (48) Kramer MS et al., Growth and development in children with sickle-cell trait. A prospective study of matched pairs. *N Engl J Med*. 1978 Sep 28;299(13):686-9.
- (49) Lafferty J et al., The effect of carbon tetrachloride on the detection of Hemoglobin H using various commercially available electrophoresis products. *Am J Clin Pathol* 1998;109:651-2
- (50) Lawn RM et al. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. *Cell*. 1980 Oct;21(3):647-51.
- (51) Lehmann H. Hemoglobins we have known. *Tex Rep Biol Med*. 1980-81;40:471-7. Review.
- (52) Livingstone FB. *Frequencies of Hemoglobin Variants*. Oxford University Press, Oxford, 1985.
- (53) Livingstone FB, courtesy of D.E. Schreiber, IBM Research Laboratory, San Jose. von Bodmer WF und Cavalli-Sforza LL: *Genetics, Evolution and Man*. San Francisco, Freeman WH, 1976.
- (54) Luzzatto L et al., Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet*. 1970 Feb 14;1(7642):319-21.
- (55) Maniatis T et al. Amplification and characterization of eukaryotic structural genes. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1978 May;(48):9-10.
- (56) Merghoub T et al. Dissection of the association status of two polymorphisms in the β -globin gene cluster with variations in F-cell number in non anemic individuals. *Am J Hematol* 1997;56:239-43.
- (57) Miyoshi K et al. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by genes on X chromosome. *Blood* 1988;72:1854-60.
- (58) Modiano D et al., Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2001 Nov 15;414(6861):305-8.

- (59) Molchanova TP et al., HbAlesha or alpha 2 beta (2)67(E11)Val-->Met: a new unstable hemoglobin variant identified through sequencing of amplified DNA. *Hemoglobin*. 1993 Jun;17(3):217-25.
- (60) Nagel RL et al. Genetic epidemiology of the beta s gene. *Baillieres Clin Haematol*. 1992 Apr;5(2):331-65. Review.
- (61) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *JAMA*. 1987;258:1205-1209
- (62) Pauling L et al., Sickle Cell Anemia, A Molecular Disease. *Science*. 1949, 110, 543-548.
- (63) Pasvol G et al., Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature*. 1978 Aug 17;274(5672):701-3.
- (64) Phelan L et al., An analysis of relative costs and potential benefits of different policies for antenatal screening for beta thalassaemia trait and variant haemoglobins. *J Clin Pathol*. 1999 Sep;52(9):697-700.
- (65) Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 1997;89:1-25.
- (66) Prindle KM et al., Red cell life span in hemoglobin C disorders. *Clin Res*. 17:33, 1969.
- (67) Ranney HM et al., Some clinical, biochemical and genetic observations on hemoglobin C. *J Clin Invest*. 1953 Dec;32(12):1277-84.
- (68) Raper AB et al., Sickle cell disease in Africa and America-a comparison. *J Trop Med Hyg*. 1950 53:49.
- (69) Redetzki JE et al., Homozygous hemoglobin C disease: Clinical review of fifteen patients. *South Med J*. 1968 Mar;61(3):238-42.
- (70) Roth EF et al., Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*. 1978 Nov 10;202(4368):650-2.
- (71) Schneider RG et al, Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins such as S, D, G, and P; or A2, C, E, and O by electrophoresis of the globin chains. *Clin Chem*. 1974 Sep;20(9):1111-5.
- (72) Schneider RG et al, Electrophoretic methods in hemoglobin identifications. *Hemoglobin*. 1980;4(3-4):521-6.
- (73) Schwedt G, Taschenatlas der Analytik; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996
- (74) Segbena AY et al. Hemoglobins in Togolese newborns: HbS, HbC, HbBart's, and alpha-globin gene status. *Am J Hematol*. 1998 Nov;59(3):208-13.

- (75) Serjeant GR et al., Observations on the epidemiology of sickle cell disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(2):228-33.
- (76) Serjeant GR. *Sickle Cell Disease*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 1992.
- (77) Simon M, Eissler J, Critical factors in the chromatographic measurement of glycohemoglobin (HbA1). *Diabetes.* 1980 Jun;29(6):467-74.
- (78) Singer K et al., Studies on abnormal hemoglobins. X. A new syndrome: hemoglobin C-thalassemia disease. *Blood.* 1954 Nov;9(11):1032-46.
- (79) Smith et al., Clinical manifestations of hemoglobin C disorders. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1959 Jan;104(1):17-43.
- (80) Spaet TH et al., Homozygous type c hemoglobin. *Pediatrics.* 1953 Nov;12(5):483-90.
- (81) Spiegelberg R et al., A beta-thalassemia gene caused by a 290-base pair deletion: analysis by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Blood.* 1989 May 1;73(6):1695-8.
- (82) Steinberg MH, Adams JG. Haemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. *Blood* 1991;78:2165-77.
- (83) Stryer L et al., *Biochemistry*, W H Freeman , 2002
- (84) Tadmouri GO et al. HbS/beta(del) thalassemia associated with high hemoglobin A2 and F in a Turkish family. *Am J Hematol* 1998;59:83-6
- (85) Talafih K et al. The prevalence of hemoglobin S and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Jordanian newborn. *J Obstet Gynaecol Res.* 1996 Oct;22(5):417-20.
- (86) Terry DW et al., A new hereditary hemolytic disease. *N Engl J Med.* 1954 Sep 2;251(10):365-73.
- (87) Tilghman SM et al., The intervening sequence of a mouse beta-globin gene is transcribed within the 15S beta-globin mRNA precursor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978 Mar;75(3):1309-13.
- (88) Trabuchet G et al., Nucleotide sequence evidence of the unicentric origin of the beta C mutation in Africa. *Hum Genet.* 1991 Sep;87(5):597-601.
- (89) Weatherall D et al. *The Thalassemia Syndromes*, 3rd. edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1981
- (90) Wild BJ et al., Investigation of abnormal haemoglobins and thalassaemia In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I, eds. *Dacie and Lewis's Practical Haematology*, 9th edn. Harcourt International, London, 2000.

- (91) White JM, The approximate gene frequency of sickle haemoglobin in the Arabian Peninsula. *Br J Haematol.* 1983 Nov;55(3):563-4.
- (92) Wurie AT et al. The prevalence of sickle cell trait in Sierra Leone. A laboratory profile. *West Afr J Med.* 1996 Oct-Dec;15(4):201-3.

9. weiterführende Literatur

- Bain BJ, Haemoglobinopathy Diagnosis, Blackwell Science, 2001.
- Bunn HF et al. Hemoglobin : Molecular, Genetic and Clinical Aspects. WB Saunders, Philadelphia, 1986.
- Dacie J. The Haemolytic Anaemias, Vol. 2 The Hereditary Haemolytic Anaemias, Part 2 3rd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988.
- Huisman THJ et al. A Syllabus of Human Hemoglobin Variants- Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, Georgia, 1996.
- Lehmann H et al. Man's Hemoglobins Including the Hemoglobinopathies and Their Investigation. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974.
- Nienhuis AW et al. Regulation of hemoglobin synthesis during development of the red cells. N Engl J Med 1997;297:1318-28,1371-81, 1430-6.
- Serjeant GR. Sickle Cell Disease, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 1992.
- Stamatoyannopoulos G et al. The Molecular Basis of Blood Diseases, pp. 107-56, 2nd edn. WB Saunders, Philadelphia, 1994.
- Weatherall D et al. The Thalassemia Syndromes, 3rd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1981
- Wild BJ et al. Investigation of abnormal haemoglobins and thalassaemia. In: Lewis SM et al. Dacie and Lewis's Practical Haematology, 9th edn. Harcourt International, London, 2000

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Otto

danke ich für die Motivierung zum Dissertationsthema und die Förderung dieser Arbeit, die im Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Neupert) durchgeführt wurde.

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Neupert

danke ich für das Verständnis und die Geduld, die er bei dieser Dissertation aufgebracht hat und für die Fortsetzung der Betreuung nach dem Tod von Herrn Prof. Dr. J. Otto.

Frau Ilona Dietze

gilt mein besonderer Dank für die großzügige, wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, Anregungen, geduldige und fürsorgliche Betreuung der Arbeit.

Frau Münch und Herrn Manfred Dünnwald

danke ich für die unermüdliche Hilfe beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden und bei der Durchführung der Versuche.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern

des Adolf-Butenandt Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität danke ich für ihre Unterstützung.

Meinem Freundeskreis

gilt mein ganz besonderer Dank für Ihr Verständnis, die Motivation in schwierigen Momenten und tatkräftige Unterstützung. Insbesondere erwähnen möchte ich hierbei: A. Demircioglu, T. Seyfi, T. Tükel und M. Rückels.

Meinen Eltern,

insbesondere meiner Mutter gilt mein unendlicher Dank für ihre unermessliche persönliche Unterstützung und Liebe.

11. Lebenslauf

Name Dariusch Rassouliau
Geburtsdatum 17. Mai 1971
Geburtsort Celle

Diplome

April 1998 3. Staatsexamen
April 1997 2. Staatsexamen
Physikum und 1. Staatsexamen
Mai 1990 Abitur

Hochschullaufbahn

10/91 - 05/98 Ludwig-Maximilians-Universität München
04/91 - 11/91 Justus-Liebig- Universität Gießen

Praktisches Jahr (PJ)

02/98 - 04/98 Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie sowie Herzkatheter-Labor,
Instituto Nacional de Cardiologia I.C., Mexico-City, Mexiko, Prof.
Barragan
12/97 - 02/98 Abdominalchirurgie, UCSD San Diego, USA, Prof. Moossa/
Easter/ Cosman/ Gammagami
10/97 - 12/97 Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, UCSD San Diego, USA,
Prof. Jamieson/ Tarazi/ Kaplonski/ Kriett
08/97 - 10/97 Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Klinikum Großhadern,
Ludwig-Maximilians Universität München, Prof. Reichart
04/97 - 08/97 Kardiologie, Klinikum Großhadern, Prof. Steinbeck

Herzchirurgische Laufbahn

1998 – 2000 AiP an der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians University München, Klinikum Großhadern unter der Leitung von Prof. Reichart
seit 01/2000 Assistenzarzt in der Herz- und Kinderherzchirurgie am Klinikum Großhadern unter der Leitung von Prof. Reichart und PD Dr. Daebritz

Zusatzqualifikationen

- Notfall- und Rettungsmedizin
- Herzchirurgische Intensivmedizin
- Sportmedizin
- Qualitätsmanagement

Wissenschaftliche Arbeiten

1995 - 1998 -Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Publikationen

- "Improved Method for PCR-Sequencing by an example of a hemoglobin-mutation", GH Research-Festival '96, p.315-316
- Automatisierte Brief- und Berichtschreibung in der Herzchirurgie unter Verwendung eines integrierten Dateninformationssystems, GH Research Festival 1999, p 239
- „Kinetic-assisted venous Drainage (KAVD) and vacuum-assisted venous drainage (VAVD) in minimal-Invasive cardiothoracic- Surgery- clinical study, GH Research-Festival 2000, p.243

Sprachen

Englisch, Spanisch	fließend in Wort und Schrift
Französisch	durchschnittliche Kenntnisse
Persisch, Deutsch	Muttersprache