

# Molekulare Diagnostik und Pathophysiologie: Beispiele aus Hämatopoese, aus der Antigendia- gnostik von Blutzellen und aus der Hämostaseologie



**Dr. med. Klaus Schwarz**

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und  
Immunogenetik Ulm

**Prof. Dr. rer. nat. Peter Bugert**

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie  
Mannheim

**Dr. med. Christof Geisen**

Institut für Transfusionsmedizin und  
Immunhämatologie Frankfurt a. M.

**Dr. rer. nat. Inge von Zabern**

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und  
Immunogenetik Ulm

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg -  
Hessen gemeinnützige GmbH

## Zusammenfassung

Die Individualisierung der Medizin in Diagnostik und Therapie führt nicht zuletzt über eine adäquate Genomanalytik des Menschen. Die vorliegende Arbeit zeigt ohne Anspruch auf Vollständigkeit exemplarisch auf, in welchen Bereichen diese Analytik in der Transfusionsmedizin schon weitgehend Einzug gehalten hat. Am Beispiel der CD41 wird die genetische Ursachenforschung angeborener Defekte dargestellt. Die molekulare Diagnostik von Blutzellantigenen unterstützt und ergänzt die Blutgruppenserologie. Die molekulare Analyse von Faktoren der plasmatischen Gerinnung erlaubt eine exakte Differentialdiagnose von hämorrhagischen Diathesen und Thrombophilien und durch pharmakogenetische Erkenntnisse eine individuelle Therapiesteuerung.

## Summary

An adequate human genome analysis will support individualized diagnostics and therapy in medicine. Without claiming any completeness, this report shows in which areas genomic analysis has already to a large extent infiltrated transfusion medicine. With CD41 as a prototype, molecular research of inborn deficiencies is exemplified. The molecular analysis of the genes of blood cell antigens supports and complements blood group serology. The gene analysis of plasmatic coagulation components leads to exact differential diagnosis of hemorrhagic disorders and thrombophilia and to individualized therapy guided by pharmacogenetic knowledge.

## Einleitung

In zunehmendem Maße wird eine Entwicklung hin zu individualisierter Medizin thematisiert, die durch Erkennen individueller Risikoprofile, durch maßgeschneiderte Diagnostik und Therapien besser an den einzelnen Patienten angepasst ist, und die im Laufe der nächsten 20 Jahre die Gesundheitsversorgung entscheidend verbessern kann.

Innerhalb der personalisierten Medizin lassen sich fünf verschiedene Individualisierungskonzepte identifizieren

- biomarkerbasierte Stratifizierung;
- genombasierte Informationen über gesundheitsbezogene Merkmale;
- Ermittlung individueller Erkrankungsrisiken;
- differenzielle Interventionsangebote;
- therapeutische Unikate.

In der individualisierten Medizin wird insbesondere an die Genom- und Postgenomforschung und an die molekulare und zellbiologische Forschung und Entwicklung die Erwartung gerichtet, eine Wissens- und Technologiebasis bereitzustellen, von der aus verbesserte Diagnose-, Therapie- und Präventionsmöglichkeiten entwickelt werden können (1). Dieser Bericht soll an Beispielen einen Einblick vermitteln, in welcher

Breite schon jetzt Genomforschung und molekulare Diagnostik in transfusionsmedizinischen Bereichen praktiziert wird.

## Beispiel 1: Charakterisierung eines Gendefekts der Hämatopoese

### Genetisch bedingte Erkrankungen der Hämatopoese

Die Entwicklung der Hämatopoese von der Stammzelle zum reifen Erythrozyten verläuft im Knochenmark über nur funktionell charakterisierbare Progenitoren sowie histologisch differenzierbare Vorstufen (**Abbildung 1A**). Auf allen Stufen der Differenzierung sind Entwicklungs- oder Funktionsdefekte durch Genmutationen beschreibbar. Veränderungen im Eisen- und Vitaminstoffwechsel führen zu Störungen der Erythrozytenproduktion. Mutationen von Erythrozytenmembrankomponenten oder Enzymen der Glykolyse bedingen hämolytische Anämien. Defekte der Globingene verursachen Hämoglobinopathien wie Thalassämie und Sichelzellanämie. Bei angeborenen Knochenmarksinsuffizienzsyndromen erfolgt eine inadäquate Blutzellproduktion entweder als isolierte Zytopenie (Pure Red Cell Aplasia,

Neutropenie oder Thrombopenie) oder als Panzytopenie. Einige der Knochenmarksinsuffizienzsyndrome sind vergesellschaftet mit Erkrankungen nicht-hämatopoietischer Organe und zeigen eine Tendenz zu malignen Entartungen.

### **Kongenitale dyserythropoietische Anämie (congenital dyserythropoietic anemia CDA)**

Kongenitale dyserythropoetische Anämien sind angeborene Erkrankungen, die 1968 erstmals als eigene Krankheitsgruppe erkannt wurden (2, 3). Die Erkrankung ist mit weltweit ca. 600 beschriebenen Fällen in etwa 500 Familien extrem selten.

Allgemeine Definitionskriterien sind:

- Nachweis des kongenitalen Beginns oder familiäre Heredität
- Zeichen ineffektiver Erythropoese
- Im Knochenmark charakteristische morphologische Veränderungen der Erythroblasten (**Abbildung 1B**)
- Beweisend: Nachweis des zugrunde liegenden Gendefekts

Das Krankheitsbild variiert innerhalb der CDA-Subtypen: Einige Patienten müssen direkt nach der Geburt und im Kindesalter mit Erythrozytentransfusionen behandelt werden, bei leichter Betroffenen macht sich die Erkrankung durch

eine mäßige Anämie und Hyperbilirubinämie mit wechselndem Sklerenikterus bemerkbar. Angeborene Dysplasien kommen überzufällig häufig vor und betreffen vorzugsweise das Skelett.

Am häufigsten ist die CDA Typ II, seltener der Typ I. Patienten mit Typ III und weitere CDA Varianten wurden nur in Einzelfällen beschrieben. Im Folgenden werden die CDAII und der ihr zugeordnete Gendefekt beschrieben (4-6).

### **Kongenitale dyserythropoietische Anämie Typ II (CDAII)**

Die autosomal rezessiv vererbte CDAII (OMIM: #224100) wird auch als „Hereditary Multinuclearity with a Positive Acid Serum Lysis Test (HEMPAS)“ bezeichnet, da der Säurereserumtest bei Verwendung vieler normaler Seren im Testansatz mit CDAII – Erythrozyten positiv ausfällt. Charakteristische, wenn auch keineswegs spezifische Befunde sind: Eine mäßige Vergrößerung der Milz, eine meist normochrome und normozytäre Anämie mit Hämoglobinwerten zwischen 8 und 12 g/dl, eine deutliche Anisozytose und Poikilozytose der Erythrozyten mit basophil getüpfelten Erythrozyten und mit einzelnen, gelegentlich zweikernigen Erythroblasten im Blut, normale absolute und relative Retikulozyten-

zahlen (oder trotz einer Anämie nur gering [„inadäquat“] erhöhte Werte), eine Vermehrung des indirekten Serumbilirubins, eine Verminderung des Serumhaptoglobins, eine Erhöhung des Ferritins und eine Verminderung des Transferrins im Serum. Häufigste Fehldiagnosen sind bei CDAII angeborene hämolytische Anämien verschiedener Klassifikation.

Die meisten Patienten mit einer CDAII haben eine normale Lebenserwartung, sind aber durch direkte Krankheitsfolgen wie Bildung von Gallensteinen, aplastische Krisen (Parvovirus B19), sekundäre Hämochromatose, tumorartige extramedulläre Blutbildung und paramalleolar lokalisierte Unterschenkelgeschwüre beeinträchtigt.

Grundlage der Behandlung ist die Feststellung des CDA-Typs und die Abschätzung der krankheitsbedingten Reduktion der Leistungsfähigkeit und Lebensqualität. Die Therapie beinhaltet nach der üblichen Infektionsprophylaxe (Impfung) die Splenektomie (mit der eine Besserung der Anämie erreicht wird, welche die Tendenz zur Eisenüberladung aber nicht beseitigt), ggf. die Eisendepletionsbehandlung durch Aderlässe bei nur gering ausgeprägter Anämie und/oder mit Eisenchelatabbildern. Da die endogene Erythropoetinproduktion adäquat

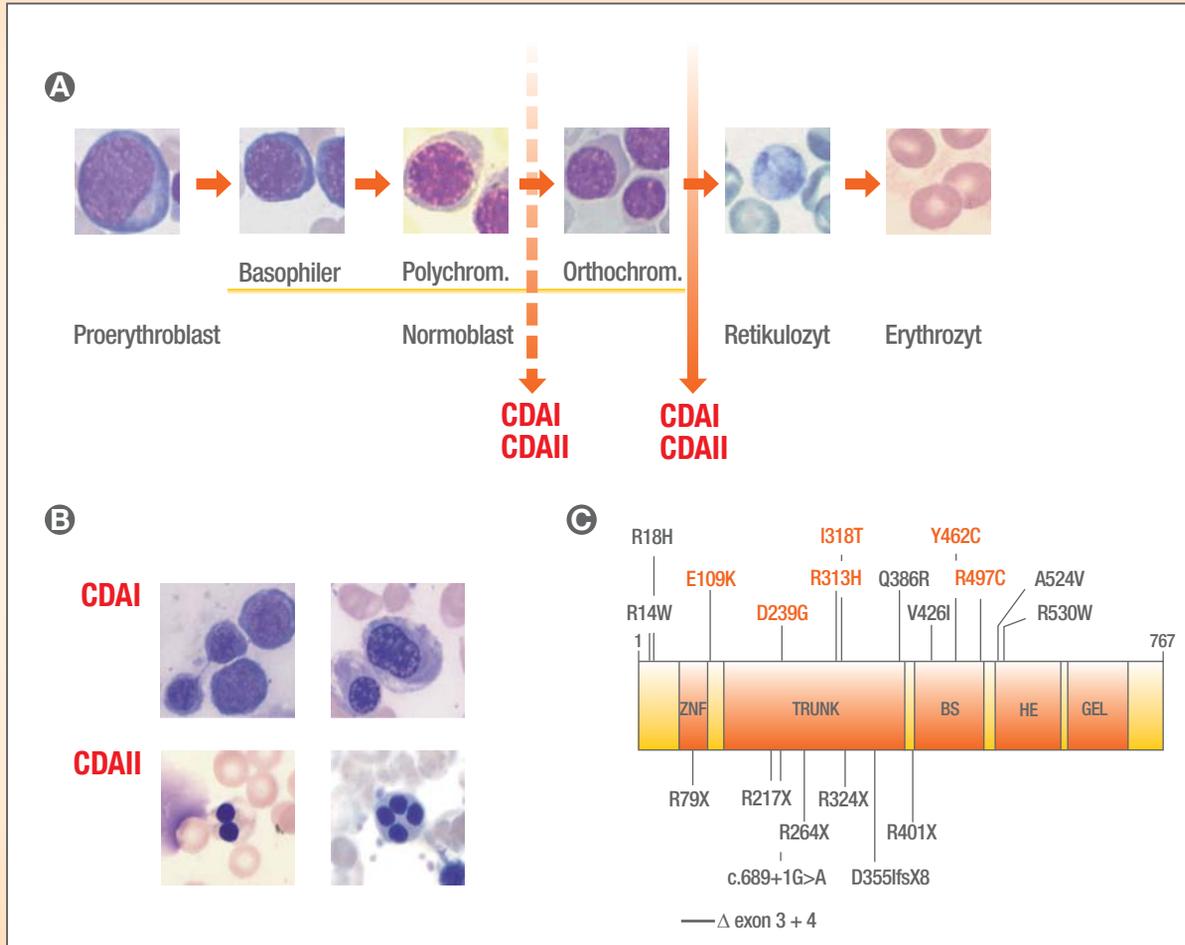


Abbildung 1

(A) Differenzierungsstufen der normalen Erythropoese, an denen die Defekte der CDA sichtbar werden. (B) Abnorme Erythroblastenformen der CDAI mit Chromatinbrücken und aufgelockertem Kern und der CDAII mit Bi- und Multinuklearität bei gleich großen Kernen. (C) Darstellung von Mutationen des *SEC23B* Gens bei CDAII Patienten. Grau eingezeichnet sind private Mutationen. Orange kenntlich gemacht sind Mutationen, die auf mehreren Allelen gefunden wurden.  $\Delta$ : Deletion.

erhöht ist, ist eine Erythropoetinbehandlung nicht sinnvoll, die Gabe von Eisenpräparaten ist kontraindiziert. Patienten mit CDA sollten einen Patientenpass mit Angabe der Diagnose, des zuständigen Arztes und ggf. Angabe der Splenektomie mit sich führen (7).

### Zell- und Molekularbiologie der CDAII

Die am ehesten ins Auge springende, jedoch unspezifische zelluläre Auffälligkeit der CDAII ist die

Häufung (10-40 %, Normalwert ca. 2 %) von binukleären Erythroblasten im Knochenmark, vornehmlich der polychromatischen und oxyphilen Entwicklungsstufen (8). Die Zellkerne sind gleich groß und haben identen DNA Gehalt (9). Dies weist auf eine Zytokinesestörung bei der Zellteilung hin. In der Elektronenmikroskopie lassen sich parallel zur Innenseite der Plasmamembran Zisternen nachweisen, die Markerproteine des Endoplasmatischen Retikulums tragen. Die Bande 3 (Anion exchange protein, AE1) und die

Bande 4.5 (Glucose Transporter 1, GLUT1) der Erythrozytenmembranproteine zeigen ein geschärftes und beschleunigtes Laufverhalten in der SDS-Gelelektrophorese. Die veränderte Wanderungsgeschwindigkeit beruht auf einer Störung der N-Glykosylierung der Glykoproteine der Erythrozytenmembran im Golgiapparat (10). Mit Hilfe von „Reverse Genetik“ Methoden wurde 2009 der Gendefekt charakterisiert (11). Unter der Annahme einer autosomal rezessiven Vererbung der CDAII wurde das Genom Erkrankter aus konsan-

guinen Stammbäumen mit Hilfe einer genomweiten SNP-Analyse für homozygote chromosomale Regionen kartiert. Eine Region mit 23 kartierenden Genen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 (20p11.23–20p12.1) war bei allen analysierten Patienten homozygot. Die Synopse aus dieser Kartierung und aus der Glykosilierungsstörung im Golgiapparat wies auf Faktoren des Sekretionsapparates als möglicherweise gestörte Komponente(n) hin.

Alle untersuchten Patienten hatten Mutationen im *SEC23B* Gen (**Abbildung 1C**), einem Faktor des Coat Protein Komplexes II (COPII). Zytoplasmatische Coat Proteine werden an Membranoberflächen zusammengesetzt, binden an eine zu transportierende Ladung und zwingen die Membran in verschieden große Vesikelformen. Ein Heterodimer aus *SEC23* und *SEC24* hilft beim selektiven Transport der Ladung vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat. Weitergehende Untersuchungen an Zelllinien und am Zebrafischmodell bestätigten, dass *SEC23B* in der Erythropoese eine bedeutende Rolle spielt. Insbesondere der Zellzyklus und die Zytokinese erythroider Zellen hängen von einer ausreichenden *SEC23B* Konzentration ab (**11**). Defekte im *SEC23B* Gen als Grundlage der CDAll wurden in einer weiteren

Arbeit bestätigt (**12**), eine vermutete Genotyp/Phänotyp Korrelation gilt es in größeren Studien zu überprüfen (**13**).

## Beispiel 2: Differenzierung der Antigene von Blutzellen

### Erythrozytäre Antigene

Die Diagnostik im Rahmen einer Bluttransfusion umfasst obligatorisch die Bestimmung von erythrozytären Blutgruppenmerkmalen und Antikörpern, sowohl beim Spender als auch beim Empfänger. Träger der Blutgruppenmerkmale sind Proteine und Kohlenhydrate der komplex aufgebauten Erythrozytenmembran (**Abbildung 2**). In die Doppellipidschicht eingesenkt oder an Membranlipide angeheftet sind viele unterschiedliche Proteine. Die meisten dieser Proteine und zu einem geringeren Maß auch Membranlipide tragen Kohlenhydrate. Durch diese Strukturen ist die Außenseite des Erythrozyten negativ geladen und hydrophil.

Die membranständigen Proteine und Kohlenhydrate weisen bei verschiedenen Individuen geringe, vererbte Unterschiede auf. Diese Varianten (Allotypen) können bei einer Bluttransfusion oder im Rahmen

einer Schwangerschaft als Fremdantigene vom Immunsystem erkannt werden. Die Folgen einer Immunisierung reichen von der Ausbildung spezifischer Alloantikörper ohne weitere Symptomatik bis hin zu akuten Abstoßungsreaktionen mit Zerstörung der Antigen-tragenden Zellen. Ausdruck solcher Immunprozesse sind Transfusionsreaktionen sowie der Morbus haemolyticus fetalis und neonatorum. Auch „natürlicherweise“ werden erythrozytäre Alloantikörper gebildet durch Immunisierung gegen ubiquitäre Antigene. Die geringen individuellen Unterschiede in der Antigenität von Proteinen gehen auf genetisch fixierte Unterschiede in der Aminosäuresequenz zurück. Auch die Struktur von Kohlenhydraten wird letztlich durch Proteine bestimmt, nämlich durch die Zucker-übertragenden Enzyme (Transferasen). Die Unterschiede auf der Proteinebene spiegeln sich in der Nukleotidsequenz der zugehörigen Gene wider.

### Blutgruppensysteme

Voraussetzung für die Bezeichnung als Blutgruppe ist, dass ein Antikörper gegen ein erythrozytäres Antigen nachgewiesen und dessen Vererbbarkeit belegt wurde; der Begriff ist somit primär serologisch definiert.

Die ABO Blutgruppen wurden im Jahr 1901 durch Landsteiner in Wien entdeckt. Seither wurden insgesamt 308 Blutgruppen nachgewiesen

(14). Um die Vielfalt an Bezeichnungen zu ordnen und zu vereinheitlichen, wurde eine Arbeitsgruppe gebildet (International Society of

Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens) (15). Derzeit werden 270 verschiedene Antigene in 30

### Schematische Darstellung der Blutgruppensysteme

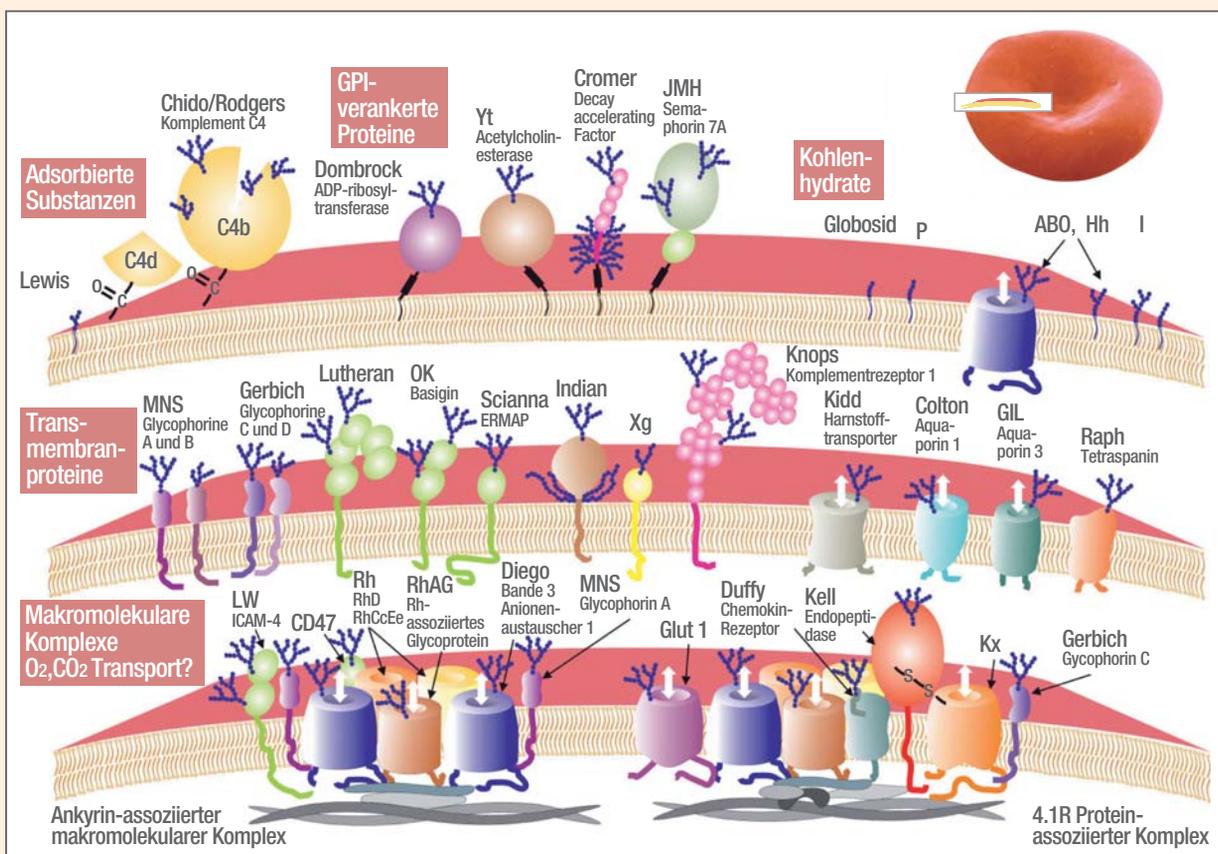


Abbildung 2

Doppellipidschicht der Erythrozytenmembran mit den Membran-assoziierten Proteinen und Kohlenhydraten der 30 Blutgruppensysteme: (1) ABO, (2) MNS, (3) P, (4) Rh, (5) Lutheran, (6) Kell, (7) Lewis, (8) Duffy, (9) Kidd, (10) Diego, (11) Yt, (12) Xg, (13) Scianna, (14) Dombrock, (15) Colton, (16) Landsteiner-Wiener, (17) Chido/Rodgers, (18) Hh, (19) Kx, (20) Gerbich, (21) Cromer, (22) Knops, (23) Indian, (24) OK, (25) Raph, (26) John Milton Hagen, (27) I, (28) Globoside, (29) GIL und (30) RhAG. Die Glykosylierung ( ) von Lipiden ( ) und in größerem Maße von Proteinen ( ) bildet den Glykocalyx. Lewis Blutgruppen sind keine integralen Membranbestandteile und werden aus dem Plasma adsorbiert. Die 4. Komponente des Komplementsystems (C4) trägt Chido/Rodgers Blutgruppen und wird nach Aktivierung zu C4b kovalent mit einer Esterbindung an Kohlenhydrate oder Proteine der Außenmembran fixiert. C4d ist das Abbauprodukt von C4b. Einige Proteine sind über GPI-Anker ( ) an die Membran angeheftet. Der Anker enthält als Bestandteil Glykosylphosphatidylinositol verbunden mit Lipid. Die Kohlenhydratantigene der Systeme ABO, Hh, I, P, Lewis und Globoside sind auf Proteinen oder Membranlipiden fixiert. Bei den Transmembranproteinen durchquert die Aminosäurekette die Membran einmal oder mehrmals. Mehrere Transmembranabschnitte bilden bei einigen Blutgruppen einen Kanal, der dem Transport dient: Kidd (Harnstoff), Diego (Bicarbonat/Chlorid), Colton (Wasser), Kx (Natrium-Ionen?), GIL (Wasser, Glycerol) und RhAG (Ammonium, CO<sub>2</sub>?). RhAG, RhD und RhCcEe sind verwandt (Ammonium Transporter Familie); die Funktion von RhD und RhCcEe ist derzeit unbekannt. Bande 3 (Diego-System) macht 20 % der erythrozytären Membranproteine aus und trägt einen großen Teil der ABO-Antigene. Die Glycophorine sind stark glykosyliert; die Glycophorine A und B (MNS-System) sind evolutionsgeschichtlich verwandt, unterscheiden sich aber von den ebenfalls untereinander verwandten Glycophorinen C und D (Gerbich-System). Die Komplement-Kontrollproteine CR1 (Komplement-Rezeptor 1, Knops-System) sowie DAF (Decay accelerating factor, Cromer-System) gehören einer Superfamilie an und bestehen aus repetitiven Komplement-Kontroll-Protein-Domänen ( ). Lutheran, Scianna, LW, OK und JMh Blutgruppenproteine enthalten Domänen der Immunglobulin-Superfamilie ( ) und haben ebenso wie Duffy, Xg, Indian und Raph nachgewiesene oder wahrscheinliche Rezeptorfunktion. Kell, Yt und Dombrock Glykoproteine sind Enzyme. Makromolekulare Protein-Komplexe in der Erythrozytenmembran (Ankyrin-Komplex, 4.1R-Komplex) weisen Verbindungen zum Zytoskelett auf und stabilisieren die Form des Erythrozyten. CD47 und Glut1 (Glucose Transporter) zählen nicht zu den Blutgruppenantigenen. (32, 55-58)



Blutgruppensysteme eingeordnet (**Abbildung 2**). Jedes System stellt ein einziges Gen oder eine Zusammenfassung von 2 bis 3 eng verwandten homologen Genen dar. Bei diesen 30 Blutgruppensystemen sind (bis auf P) die Gene auf der Ebene der Nukleotidsequenzen bekannt. Zu den Systemen gehören jeweils 1-50 Antigene. 38 Antigene sind derzeit noch keinem Blutgruppensystem zugeordnet, weil eine hinreichende Charakterisierung auf molekularer Ebene fehlt. Diese Blutgruppen werden derzeit zu Kollektionen und Serien zusammengefasst. Viel größer noch als die Anzahl der Blutgruppenantigene ist die Anzahl der bekannten Allele der Blutgruppenproteine. Viele DNA-Veränderungen führen nicht zu Unterschieden in der Antigenität, sondern nur zu einer veränderten quantitativen Ausprägung auf der Erythrozytenmembran. Die komplexesten Blutgruppensysteme mit jeweils mehr als 200 Allelen sind ABO und Rh.

### **Molekularbiologische Methoden der Blutgruppenbestimmung**

Bis vor etwa 20 Jahren wurden Blutgruppen allein durch die Agglutination von Erythrozyten mit Antikörpern bekannter Spezifität bestimmt. Heute sind molekularbiologische Methoden der Blutgruppenbestim-

mung international etabliert (**16-19**) und gewinnen zunehmend an Bedeutung. Die Blutgruppenbestimmung auf DNA-Basis wird insbesondere zur Vorhersage des Phänotyps genutzt. Häufig liegen bei den Blutgruppenallelen nur geringe Unterschiede in der DNA vor. Wenn nur ein einzelnes Nukleotid verändert ist, spricht man von Einzelnukleotidpolymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP). Deletionen, Insertionen, Duplikationen von Nukleotiden oder Gensegmenten und Splice Stellen-Mutationen werden oft beobachtet. Eine Deletion des gesamten Gens ist die häufigste Ursache des D negativen Phänotyps. Genkonversionen kommen insbesondere beim Rh- und MNS-System vor. Die molekularbiologische Diagnostik von Blutgruppen-Allelen beruht auf der Identifizierung solcher spezifischer Unterschiede in der Nukleotidsequenz. Von der Struktur des Blutgruppen-Gens schließt man auf das entsprechende Antigen. Zu einem hohen Prozentsatz trifft diese Vorhersage zu. Allerdings kommen gelegentlich zusätzliche Veränderungen in dem betreffenden Gen vor, die falsch positive oder falsch negative Ergebnisse und somit eine Diskrepanz zwischen Phänotyp und Genotyp zur Folge haben. Beispielsweise kann ein Ergebnis falsch negativ sein, wenn auf der DNA in Nachbarschaft zu dem Blutgrup-

pen-spezifischen SNP eine weitere, bisher nicht bekannte Mutation vorhanden ist.

Dann wird die Bestimmungsmethode gestört. Falsch negative Genotypisierungsergebnisse sind insbesondere im Rahmen der Blutspendertypisierung oder der fötalen Blutgruppenbestimmung klinisch relevant. Falsch positive Ergebnisse können entstehen, wenn beispielsweise eine zusätzliche bisher nicht bekannte Mutation ein Stopcodon einführt, so dass die Translation unterbrochen und kein biologisch aktives Protein synthetisiert wird. Als Folge kann in die Erythrozytenmembran kein Protein eingebaut werden, es liegt ein Null-Allel vor. Die Null-Allele stellen für die Typisierung der Blutspender kein Risiko dar, sind aber bei der Typisierung von Patienten problematisch. Eine noch höhere Stufe der Genauigkeit ist mit der Sequenzierung des gesamten Gens zu erreichen. Aber auch in DNA-Bereichen außerhalb des Gens können Mutationen auftreten, die das Gen und damit die Expression des Proteins beeinflussen.

Die Unsicherheiten der molekularbiologischen Vorhersage und deren Konsequenzen muss man bei der spezifischen Befunderstellung kennen und berücksichtigen. Je besser eine ethnische Gruppe hinsichtlich



der vorkommenden Allele durchtypisiert ist, desto genauer ist die Phänotyp-Vorhersage. Bisher nicht bekannte Diskrepanzen zwischen Genotyp und Phänotyp sind immer verdächtig für das Vorliegen eines neuen Allels. Zwar ist für die Bestimmung des Phänotyps nach wie vor die Serologie der Goldstandard, dennoch sind molekularbiologische Methoden zu Hilfsmitteln in der Transfusionsmedizin geworden, auf die kein größeres Labor mehr verzichten möchte und für die Zukunft gilt deshalb: "Blood making goes genetic" (20).

Für die molekularbiologische Bestimmung klinisch relevanter Blutgruppenallele stehen kommerzielle Testsysteme und in-house Methoden zur Verfügung. Die käuflichen, derzeit in der Routinetypisierung eingesetzten Testkits erfassen die meisten Blutgruppenvarianten, die gemäß den Richtlinien zur Hämotherapie (21) auf Antikörpersuchzellen vertreten sein müssen, sowie einige weitere Blutgruppen, die in hoher Frequenz in unserer Bevölkerung vorkommen. Auch eine umfassende Diagnostik der *RHD*- und *ABO*-Allele ist bereits mit kommerziellen Systemen möglich. Zur molekularbiologischen Bestimmung werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt, die sämtlich auf der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain

reaction, PCR) basieren (19). Die PCR-Methoden unter Verwendung sequenzspezifischer Primer (PCR-SSP) und Weiterentwicklungen (TaqMan, Light Cycler) werden derzeit in der Routinediagnostik häufig verwendet. Auch Biochips für die Blutgruppenbestimmung wurden bis zur kommerziellen Anwendung entwickelt (BLOODchip, BeadChip) (22, 23). Diese erlauben die Bestimmung einer sehr hohen Anzahl von Allelen im Rahmen eines einzigen Tests, so dass mit dieser Methode auch eine Vielzahl seltener Allele erfasst werden können (z. B. Allele des Rh-Systems, Null-Allele). Eine Reihe weiterer PCR-basierter Methoden ist in Entwicklung, insbesondere um eine Hochdurchsatztypisierung von Spendern zu ermöglichen. Einige transfusionsmedizinische Einrichtungen haben eine weitergehende molekulare Blutgruppendiagnostik mit in-house Methoden etabliert, die auch die Bestimmung seltener Varianten und die Sequenzierung einschließt. Die Abklärung sehr seltener Varianten bleibt Speziallabors vorbehalten, die Blutgruppengenotypisierungen unter Forschungsaspekten durchführen. Bei einigen seltenen Blutgruppen ist die molekulare Basis allerdings noch nicht bekannt; dazu zählen beispielsweise die klinisch relevanten hochfrequenten Antigene Vel, LAN, Jr(a), AnWj und At(a).

## Anwendungsbereiche der Blutgruppen-Genotypisierung

Die Phänotyp-Vorhersage mit molekularbiologischen Methoden ist insbesondere nützlich für die Antikörperdiagnostik und die Auswahl kompatibler Präparate zur Transfusion. Die Hämotherapie-Richtlinien (21) schreiben im Rahmen von Schwangerschaften oder bei Bluttransfusionen die Bestimmung erythrozytärer Alloantikörper vor. Wenn ein Antikörper nachgewiesen wird, ist die Spezifität des Antikörpers zu klären. Da normalerweise keine Antikörper gegen Antigene gebildet werden, die man selbst besitzt, kann die Phänotyp-Vorhersage die Antikörperdifferenzierung unterstützen. Am häufigsten wird die molekularbiologische Blutgruppenbestimmung angewendet, wenn bei Vortransfusion des Patienten oder bei Vorliegen von Autoantikörpern die serologische Antigenbestimmung kein verlässliches Ergebnis liefert. Zudem stehen für die Bestimmung einiger Antigene keine kommerziellen Seren zur Verfügung. Seren von Antikörperträgern können zur Antigenbestimmung entweder ungeeignet (z. B. Dombrock) oder schwierig zugänglich sein. Eine Reihe von Antiseren ist nur im internationalen Austausch der Referenzlabore zu erhalten. Die Blutgruppengenotypisierung erlaubt Patienten mit Vortransfusionen und



Autoantikörpern bei chronischer Transfusionsbedürftigkeit kompatibel bezüglich der klinisch wichtigsten Antigene zu versorgen. Dies gilt insbesondere für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen wie Thalassämie oder Sichelzellenanämie.

In Zukunft wird die Blutgruppen-genotypisierung als Reihenuntersuchung bei Blutspendern zunehmend eine Rolle spielen. Bereits heute werden in Deutschland beim DRK-Blutspendedienst NSTOB etwa 16.000 Spender pro Jahr auf 16 Antigene mittels eines PCR-Verfahrens (24) typisiert. Beim DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen wird derzeit ein PCR-Screening durchgeführt, um nach den seltenen Blutgruppen Kp(a-), Lu(b-), Co(a-) und Yt(a-) bei Spendern zu suchen (25). Ziel dieser Projekte ist es einerseits, die Versorgung mit seltenen Blutgruppen zu verbessern und andererseits bezüglich „normaler Blutgruppen“ typisierte Spenden vorzuhalten. Die Kenntnis der „normalen“ Allele erlaubt einen raschen Zugriff auf Präparate für Antikörper-Träger, insbesondere bei schwierigen Antigenkonstellationen. Die Transfusion von Patienten mit seltenen Blutgruppen bereitet logistische Probleme und es werden daher kryokonservierte Erythrozytenpräparate vorgehalten. Es



wäre wirtschaftlich sinnvoll und für die Patientenversorgung günstig, wenn möglichst viele frische Präparate eingesetzt werden könnten. Dieses Ziel ist bei einer hinreichenden Durchtypisierung der Spender für die Blutgruppen Lu(b-), Yt(a-) und Co(a-) mit einer Prävalenz zwischen 1:500 und 1:1.000 prinzipiell erreichbar. Die Kryokonservierung von Erythrozytenpräparaten mit seltenen Blutgruppen bleibt allerdings nach wie vor unverzichtbar.

Die molekulare Blutgruppenbestimmung ist auch ein Hilfsmittel zur Identifizierung von Schwangerschaften, bei denen mütterliche Antikörper ein Risiko für eine kindliche Erythroblastose darstellen. Die Blutgruppengenotypisierung mit fötaler DNA aus Amnionzellen ist eine etablierte Methode. Zunehmend wird auch fötale DNA aus zellfreiem mütterlichem Plasma eingesetzt (26, 27). RhD ist das Blutgruppenprotein mit der weitaus höchsten Immunität und Anti-D für die fetale Erythroblastose immer noch der größte Risikofaktor. Bei Vätern von Risikoföten kann molekularbiologisch eine Zygotiebestimmung für *RHD* vorge-

nommen werden, um die Wahrscheinlichkeit einer Problemschwangerschaft vorherzusagen (28).

### ***RHD* und *ABO* Genotypisierung**

Die Deletion des *RHD*-Gens hat keine ungünstigen Folgen für die Rh negativen Individuen. Dies ist möglicherweise der Grund für die rasche Evolution des *RHD*-Gens, bei dem bisher eine große Anzahl an Polymorphismen bekannt ist. Die D Varianten können pragmatisch eingeteilt werden in D mit schwacher Antigenausprägung (weak D) und D mit Antigendefekt (partial D). Dabei gibt es auch Überschneidungen: einige partial D Varianten gehen mit einer sehr schwachen Ausprägung des Antigens D einher. Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass in der süddeutschen Bevölkerung eine schwache D-Expression zu etwa 90 % mit dem Vorhandensein der Allele weak D Typ 1, Typ 2 und Typ 3 korreliert ist, obwohl bisher mehr als 70 weak D Allele bekannt sind. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens werden Träger von weak D Typ 1 bis Typ 3 durch normales D nicht alloimmuni-

siert (29). Individuen mit partial D können sich dagegen bei Kontakt mit normalem D im Rahmen von Transfusionen oder Schwangerschaft immunisieren. Bei schwach ausgeprägter oder diskrepanter serologischer Reaktion kann eine molekularbiologische Abklärung durchgeführt werden. Dies vermittelt bei Vorliegen von weak D Typ 1 bis Typ 3 die Sicherheit, dass D positiv transfundiert und auf eine D-Prophylaxe verzichtet werden kann. Andererseits kann bei Vorliegen eines partial D insbesondere bei Mädchen und gebärfähigen Frauen vorsorglich D negativ transfundiert und bei Schwangerschaft eine D-Prophylaxe empfohlen werden.

Auch Blutspender, die mit den serologischen Routinemethoden für die D-Bestimmung (einschließlich des indirekten Antiglobulintests) als D negativ bestimmt werden, können *RHD*-Gen Träger sein. In Süddeutschland trägt etwa jeder tausendste D negative Spender ein DEL, d.h. ein D-Allel, das eine äußerst geringe, nur durch die spezielle Methode der Adsorption und Elution nachweisbare D Antigenexpression zeigt. Beim DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen werden derzeit alle serologisch D negativen Erstspender einem molekularbiologischen Screeningverfahren unterworfen (30), um DEL

Träger unter den Spendern zu identifizieren und als D positiv zu deklarieren, denn gemäß Literaturberichten ist eine Immunisierung D negativer Individuen durch DEL Erythrozyten prinzipiell möglich.

Beim ABO-System werden die 4 Phänotypen A, B, AB und 0 unterschieden; das System ist jedoch ebenfalls hochpolymorph. Häufig liegt eine schwache Ausprägung der A oder B Antigene vor. Wenn Diskrepanzen zwischen der serologischen ABO Antigenbestimmung und den im Plasma nachweisbaren Isoagglutininen vorliegen, sind oft *ABO*-Allele die Ursache, sofern kein anderer Grund wie beispielsweise eine Stammzelltransplantation vorliegt.

Die *ABO*-Genotypisierung ist sehr nützlich für die Aufklärung von Varianten und die Erklärung diskrepanter Ergebnisse. Auf eine „normale“ serologische ABO-Typisierung wird jedoch in absehbarer Zukunft nicht verzichtet werden, da die rasch durchführbare molekularbiologische Abklärung mittels PCR wegen der sehr hohen Anzahl der möglichen Polymorphismen Unsicherheiten aufweist; zudem können Transfusionsreaktionen aufgrund einer ABO-Inkompatibilität tödlich sein und die serologische Typisierung ist auch im Notfall schnell und kostengünstig durchzuführen.

## Funktion und Pathophysiologie der Blutgruppen

Die Funktion der erythrozytären Membranproteine und -kohlenhydrate (**Abbildung 2**) ist nur zum Teil bekannt (31). Kohlenhydrate bilden den Glycocalyx, der durch die negative Ladung und die Wasserhülle zum Schutz des Erythrozyten vor mechanischer Beanspruchung und vor Mikroorganismen beiträgt. Null-Varianten, können als natürliche „knock out“ Varianten zur Kenntnis der Funktion von Blutgruppen beitragen. Allerdings ist bei der Zuordnung von klinischen Krankheitsbildern zu Blutgruppendifekten Vorsicht geboten, da einige Blutgruppenproteine in makromolekularen Komplexen assoziiert sind. Beispielsweise besitzt ein Teil der  $Rh_{null}$ -Träger normale *RHD*- und *RHCcEe*-Gene; der Defekt ist in diesem Fall auf eine Mutation des *RHAG*-Gens zurückzuführen. Grund dafür ist, dass die Proteine RhD, RhCcEe und RhAG nicht nur eng miteinander verwandt, sondern auch in der Membran eng assoziiert sind.

Der Komplex aus RhD, RhCcEe und RhAG ist zudem Teil von makromolekularen Komplexen, die auch noch eine Reihe weiterer Proteine enthalten (**Abbildung 2**) und möglicherweise in den  $O_2/CO_2$ -Transport involviert sind (32). Insbesondere

RhAG und Bande 3 (Diego-System) tragen als Haftpunkte zur vertikalen Verankerung der Membran mit dem Zytoskelett bei. Bei der hereditären Spärozytose, die mit hämolytischer Anämie assoziiert ist, liegt ein Defekt im Bande 3- oder RhAG-Protein vor oder in Zytoskelett-Proteinen. Die hereditäre Ovalozytose konnte auf eine Deletion von 9 Aminosäuren im Bande 3-Protein zurückgeführt werden. Bei den betroffenen Patienten ist die Erythrozytenmembran ungewöhnlich starr, aber es tritt meist nur eine geringgradige Hämolyse auf. Eine Defizienz von Rh ( $Rh_{null}$ ), die unterschiedliche Ursachen haben kann, ist teilweise mit einer kompensierten hämolytischen Anämie assoziiert. Bei Vorliegen von  $Gerbich_{null}$  werden Elliptozyten beobachtet und es kann eine milde hämolytische Anämie auftreten.

Einige Blutgruppenproteine sind mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (**Abbildung 2**) mit der Erythrozytenmembran verbunden. Bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie Typ III (PNH III) weist ein Teil der Erythrozyten einen Defekt des GPI-Ankers auf, so dass die entsprechenden Blutgruppen (Cromer, Dombrock, Cartwright, JMH) fehlen. Das komplementregulatorische Protein DAF (Cromer-System) ist somit auch von diesem Defekt betroffen. Bei der isolierten Abwe-

senheit von DAF ( $Cromer_{null}$ , Inab Phänotyp) werden allerdings keine Zeichen einer komplementvermittelten Hämolyse beobachtet. Erst wenn die beiden komplementregulatorischen Proteine DAF und CD59 fehlen, treten die charakteristischen hämolytischen Schübe auf, da die Komplementaktivierung nicht ausreichend durch membranständige Regulatoren unterbunden wird (**33**).

Einige Proteine und Kohlenhydrate dienen als Rezeptoren für Mikroorganismen und begünstigen so die Zellinvasion. Deshalb korrelieren Null-Varianten mit der geographischen Verbreitung von Erregern. Das Duffy Glycoprotein stellt den Rezeptor für *Plasmodium vivax* dar.  $Duffy_{null}$  Erythrozyten sind daher resistent gegen den Erreger. In Gebieten von Afrika, in denen durch diesen Erreger verursachte Malaria endemisch ist, kommt der  $Duffy_{null}$  Phänotyp daher sehr häufig vor. Eine relative Resistenz gegenüber *Plasmodium falciparum* ist bei Erythrozyten zu beobachten, denen Glycophorine fehlen, oder die eine Variante des Komplement Rezeptor 1 (Knops-System) aufweisen. Zudem wird vermutet, dass der Selektionsdruck hinsichtlich der Blutgruppe 0 über eine relative Resistenz von 0-Erythrozyten gegenüber *Plasmodium falciparum* vermittelt wurde. P und Globosid-Kohlenhydrate sind

Rezeptoren für *E. coli* bzw. *Parvovirus B19*.

Bei einigen Blutgruppenproteinen ist eine vollständige Defizienz offenbar letal oder mit einem gesunden Leben nicht vereinbar (z. B. Diego, Yt). Eine Reihe der bekannten Null-Varianten haben für die Allelträger jedoch keine beeinträchtigenden Konsequenzen (z. B. Blutgruppe 0, RhD Defizienz, Glycophorin A und B Defizienz,  $Lutheran_{null}$ ,  $Kell_{null}$ ,  $Duffy_{null}$ ,  $Kidd_{null}$ ,  $Colton_{null}$ ,  $LW_{null}$ ). Nachgewiesene Nachteile beziehen sich oft nicht auf die Erythrozytenfunktion, sondern auf Organmanifestationen.

Der Grund dafür ist, dass viele Blutgruppen nicht nur auf Erythrozyten, sondern auch auf einer Reihe von Körpergeweben exprimiert sind (**34**). Blutgruppen können zudem auf Erythrozyten fehlen, aber auf anderen Geweben exprimiert sein (z. B. Duffy). Bei vielen Blutgruppenantigenen wird aufgrund von Strukturverwandtschaften eine Funktion vermutet, die aber insbesondere für Erythrozyten noch nicht bewiesen ist. Vielleicht haben in der Tat einige Blutgruppen keine biologische Funktion, sind Relikte der Erythrozytenentwicklung oder der Evolution. Auch das Prinzip von Pleiotropie und Redundanz, das nicht selten Dysfunktionen des Organismus verhindert, kann das Fehlen von nach-



tische Bestimmung der HPA-Merkmale entwickelt werden (40).

Da die HPA-Merkmale auf einzelnen Basen-Unterschieden in der DNA-Sequenz des jeweiligen Glykoproteingens beruhen, kommen spezielle Nukleinsäuretechniken zum Einsatz, die schnell und kostengünstig ein entsprechendes Ergebnis liefern. Ein häufig angewandtes Verfahren ist die sogenannte PCR (*Polymerase Chain Reaction*) unter Verwendung Sequenz-spezifischer Pri-

mer (PCR-SSP), die für die Diagnostik der wichtigsten HPA-Merkmale etabliert werden konnten (Tabelle 1). Bei Fragestellungen im Rahmen der pränatalen Diagnostik der NAIT können ebenfalls PCR-SSP Verfahren eingesetzt werden, da durch die optimierte Sensitivität und Spezifität nur geringe Mengen genetischen Materials (z. B. aus Fruchtwasser) benötigt werden (41). Modernere PCR-basierte Verfahren für die HPA-Typisierung beruhen auf der sogenannten allelischen Diskriminie-

rung (AD). Dabei werden fluoreszenz-markierte allelspezifische DNA-Sonden eingesetzt (42). Weitere technische Entwicklungen im Bereich der genetischen Diagnostik zielen auf Optimierungen des Probendurchsatzes und die Erhöhung der Analysekomplexität, d.h. höhere Zahl an Parametern, die in einem Test bestimmt werden können. Wichtige Fortschritte konnten hier vor allem durch die DNA-Chiptechnologien erzielt werden. Das Prinzip der Array-basierten Typisierung der HPA-Merkmale konnte bereits erfolgreich getestet werden (43). Insgesamt stehen eine Reihe verschiedener Testsysteme für die Genotypisierung der HPA-Merkmale zur Verfügung (Tabelle 1).

### Antigensysteme der Granulozyten

Die Granulozyten stellen die mengenmäßig größte Population weißer Blutzellen dar. Sie üben ihre Hauptfunktion in der unspezifischen Immunabwehr und den Entzündungsreaktionen aus, wobei die neutrophilen Granulozyten den wichtigsten Zelltyp darstellen. Auch die Neutrophilen tragen Strukturen auf ihrer Oberfläche, die Auto- oder Alloimmunreaktionen hervorrufen können. Insbesondere im Zusammenhang mit lymphoproliferativen Erkrankungen (z. B. Morbus Hodgkin oder

**Humane Alloantigene der Thrombozyten (HPA) und Neutrophilen (HNA) und verfügbare Testsysteme für die Diagnostik**

System	Protein	Antigen	Original-Name	Häufigkeit (%) <sup>*</sup>	Diagnostische Testsysteme <sup>**</sup>
<b>Thrombozytenantigene</b>					
HPA-1	Glykoprotein IIIa (CD61)	HPA-1a	PI <sup>A1</sup>	98	PCR-SSP, PCR-AD, Oligo-Array
		HPA-1b	PI <sup>A2</sup>	29	
HPA-2	Glykoprotein Iba (CD42b)	HPA-2a	Ko <sup>b</sup>	99	PCR-SSP, PCR-AD, Oligo-Array
		HPA-2b	Ko <sup>a</sup>	13	
HPA-3	Glykoprotein IIb (CD41)	HPA-3a	Bak <sup>a</sup>	81	PCR-SSP, PCR-AD, Oligo-Array
		HPA-3b	Bak <sup>b</sup>	70	
HPA-5	Glykoprotein Ia (CD49b)	HPA-5a	Br <sup>b</sup>	99	PCR-SSP, PCR-AD, Oligo-Array
		HPA-5b	Br <sup>a</sup>	15	
HPA-15	CD109	HPA-15a	Gov <sup>b</sup>	76	PCR-SSP, PCR-AD, Oligo-Array
		HPA-15b	Gov <sup>a</sup>	74	
<b>Neutrophilenantigene</b>					
HNA-1	Fcγ-Rezeptor IIIb	HNA-1a	NA1	57-62	PCR-SSP
		HNA-1b	NA2	88-89	
		HNA-1c	SH	5	
HNA-3	SLC44A2	HNA-3a	5b	95	PCR-SSP
		HNA-3b	5a	37	
HNA-4	MAC-1 (CD11b)	HNA-4a	MART	99	PCR-SSP
HNA-5	LFA-1 (CD11a)	HNA-5a	OND	86-92	PCR-SSP

**Tabelle 1**

<sup>\*</sup>Quellen: IPD - HPA Database ([www.ebi.ac.uk/ipd/hpa](http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa)) und Ref. (43).

<sup>\*\*</sup>Testsysteme, die im Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen gGmbH zur Verfügung stehen: PCR-SSP, PCR mit sequenz-spezifischen Primern (40); PCR-AD, PCR mit allelspezifischen Sonden zur allelischen Diskriminierung (41); Oligo-Array, Hybridisierung von Oligoarrays mit allelspezifischen Sonden (42).

chronisch lymphatische Leukämie) können autoantikörperbedingte Neutropenien beobachtet werden **(35)**. Häufig ist dabei der neutrophilenspezifische Fcγ-Rezeptor IIIb das Zielmolekül der Autoantikörper.

Alloimmune Reaktionen gegen die Neutrophilen können bei Schwangerschaft beobachtet werden, wobei im mütterlichen Blutkreislauf Antikörper gegen kindliche Neutrophilenantigene gebildet werden. In der Folge treten die Antikörper in den kindlichen Kreislauf über und führen zur Zerstörung der Neutrophilen (neonatale Immunneutropenie, NIN). Eine weitere Alloimmunreaktion gegen Neutrophile trägt wesentlich zur Entstehung der transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI) bei, die eine bedeutende unerwünschte Nebenwirkung bei Bluttransfusionen darstellt. Sowohl bei NIN als auch bei TRALI können sich die Alloantikörper gegen verschiedene Antigene (Human Neutrophil Alloantigen, HNA) auf neutrophilen Granulozyten richten **(Tabelle 1) (44)**. Neben dem Nachweis und der Charakterisierung der Antikörperspezifitäten **(45)**, spielt die molekulargenetische Bestimmung der HNA-Merkmale in der Diagnostik eine wichtige Rolle. Nachdem kürzlich auch die molekulare Grundlage des HNA-3 Antigensystems aufgeklärt werden konnte **(46)**, ist eine Typisie-

rung von Blutspendern und Patienten zu diagnostischen Zwecken möglich. Es wurden Testsysteme auf der Basis der PCR-SSP Methode etabliert und kommen bei der Typisierung der wichtigsten HNA-Merkmale zum Einsatz.

### **Beispiel 3: Differentialdiagnostik und Pharmakogenetik in der Hämostaseologie**

#### **Genetisch bedingte Erkrankungen der Blutgerinnung**

Die Blutgerinnung (Hämostase) stellt ein hochkomplexes Netzwerk von mehr als 70 Proteinen dar, welche einerseits die Fließfähigkeit des Blutes garantieren und zum anderen eine unmittelbar einsetzende Gerinnung des Blutes bei Gefäßverletzungen sicherstellen. Praktisch alle beteiligten Proteine können von genetischen Veränderungen (Mutationen) betroffen sein, die – je nach Funktion des Proteins – entweder zu einer erblichen Form der Blutungsneigung (Hämorrhagische Diathese) oder der Thromboseneigung (Thrombophilie) führen oder aber die Interaktion mit Medikamenten der Blutgerinnung (Pharmakogenetik) betreffen können **(Tabelle 2)**.

#### **Hämophilie A (Faktor-VIII-Mangel) und Hämophilie B (Faktor-IX-Mangel)**

Die Hämophilie A und die Hämophilie B werden X-chromosomal rezessiv vererbt. Die Inzidenz der Hämophilie A wird mit 1:5.000 und die der Hämophilie B mit 1:30.000 der männlichen Neugeborenen angegeben. Ursächlich sind Mutationen im FVIII-Gen (*F8*) bzw. FIX-Gen (*F9*), die zu einer Verminderung oder völligem Fehlen des Gerinnungsfaktors führen. Schweregrad und Häufigkeit der Blutungen sind abhängig vom Ausmaß der Verminderung. Die Therapie der Hämophilie A erfolgt in Abhängigkeit vom Schweregrad und der Blutungsmanifestation durch die Gabe von aus Plasma oder gentechnisch hergestellten FVIII-Konzentraten oder DDAVP (Desmopressin, synthetisches ADH-Analogon). Bei der Hämophilie B kommen aus Plasma oder gentechnisch hergestellte FIX-Konzentrate zum Einsatz.

Die häufigste *F8*-Mutation mit einem Anteil von fast 50 % ist die Intron-22-Inversion. Sie beruht auf einer intragenen Rekombination des FVIII-Gens. Weitere wichtige Mutationstypen mit einem Anteil von jeweils 10-15 % sind Nonsense-Mutationen, Missense-Mutationen und kleine Deletionen oder Insertionen. Bei den weniger schweren Verlaufs-



Tabelle 2

**Hämostaseologische Krankheitsbilder (Faktoren, Gene)****Prokoagulatorische Faktoren**

- Afibrinogenämie (*FGA, FGB, FGG*)
- Hypofibrinogenämie (*FGA, FGB, FGG*)
- Dysfibrinogenämie (*FGA, FGB, FGG*)
- Faktor II-Mangel (*F2*)
- Faktor V-Mangel (*F5*)
- Faktor VII-Mangel (*F7*)
- Faktor VIII-Mangel (Hämophilie A) (*F8*)
- Faktor IX-Mangel (Hämophilie B) (*F9*)
- Faktor X-Mangel (*F10*)
- Faktor XI-Mangel (*F11*)
- Faktor XII-Mangel (*F12*)
- Faktor XIII-Mangel (*F13A, F13B*)
- Kombiniertes FII-/ FVII-/ FIX-/ FX-Mangel (VKCFD) (*VKORC1, GGCX*)
- Kombiniertes FV-/ FVIII-Mangel (F5F8D) (*LMAN1, MCFD2*)

**Inhibitorische Faktoren**

- Antithrombin-Mangel (*SERPINC1*)
- Protein C-Mangel (*PROC*)
- Protein S-Mangel (*PROS1*)

**Pharmakogenetik**

- Cumarinresistenz (partielle) (*VKORC1, CYP2C9*)
- Cumarinsensitivität (*VKORC1, CYP2C9*, ggf. *F9* Exon 2)

**Primäre Hämostase**

- Von Willebrand-Syndrom Typ (*VWF*)
- Bernard-Soulier-Syndrom (BSS) (*GP1BA, GP1BB, GP9*)
- Morbus Glanzmann (*ITGA2B, ITGB3*)

**Sonstige Gene**

- ADAMTS13-Mangel (Hereditäre TTP) (*ADAMTS13*)
- Kininogen (HMWK)-Mangel (*KNG*)
- Präkallikrein-Mangel (*KLKB1*)
- PAI1-Mangel (*PAI1*)
- Plasminogen-Mangel (*PLG*)
- TAFI-Mangel (*CPB2*)

formen kommen fast ausschließlich Missense-Mutationen vor. Alle bisher publizierten Mutationen sind in einem internationalen Mutationsregister aufgeführt (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>).

Der Mutationstyp ist entscheidend für das Risiko der Hemmkörperbildung, welche die schwerste Komplikation der Hämophiliebehandlung darstellt und bei etwa 20-30 % aller schwer betroffenen Patienten unter Substitutionstherapie mit FVIII-Konzentraten auftritt. Die Hemmkörperprävalenzen reichen von 3 % bei bestimmten Missense-Mutationen bis zu 88 % bei großen, mehrere FVIII-Proteindomänen umfassenden Deletionen (47). Im Gegensatz zur Hämophilie A liegen den meisten F9-Mutationen Nukleotidaustausche zu Grunde, die zu Missense-Mutationen (68 %) und Nonsense-Mutationen (14 %) führen. Alle anderen Mutationstypen sind selten und weisen Häufigkeiten von unter 5 % auf. Die verschiedenen Mutationen sind in einem internationalen Mutationsregister im Internet verfügbar (<http://www.umds.ac.uk/molgen/haemB-database.htm>).

**Von Willebrand Erkrankung**

Die von Willebrand Erkrankung (VWE) ist, unter Berücksichtigung auch der leichten Verlaufsformen,

die häufigste erbliche Blutungsneigung mit einer geschätzten Prävalenz von ca. 1 % der Bevölkerung. Das klinische Bild dieser Erkrankung ist äußerst heterogen. Die Phänotypen werden in drei Hauptkategorien eingeteilt. Typ 1 und Typ 3 bezeichnen qualitative Mängel mit partiellem (Typ 1) oder komplettem (Typ 3) Fehlen des VWF-Proteins, während Typ 2 sich durch ein qualitativ verändertes, dysfunktionelles VWF-Protein auszeichnet.

Bei mehr als 80 % der Patienten liegt ein VWE Typ 1 vor, 15-20 % haben eine VWE Typ 2 und nur bei einer sehr kleinen Gruppe von etwa 1 % der Patienten kann eine VWE Typ 3 diagnostiziert werden. Entsprechend der Funktion des VWF als Vermittler der Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion einerseits und als Transportmolekül des FVIII andererseits, wird sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase beeinträchtigt. Typische klinische Manifestationen der VWE sind Schleimhautblutungen wie Epistaxis und Menorrhagie, bei schweren Formen auch Gelenkblutungen. Die Behandlung erfolgt in Abhängigkeit von Schweregrad und klinischer Blutungsmanifestation mit DDAVP und/oder einem VWF-haltigen Gerinnungskonzentrat.

Hauptursache für die VWE sind Mutationen des VWF-Gens (48). Bis heute konnte eine große Anzahl von Mutationen in allen Domänen des VWF-Gens aufgeklärt und in einer Datenbank zusammengefasst werden (<http://mmg2.im.med.umich.edu/v/VWF/>).

### Seltene Mangelzustände anderer Gerinnungsfaktoren

Schwerwiegende Mangelzustände oder funktionelle Defekte anderer Gerinnungsfaktoren (z. B. Fibrinogen, Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor X, Faktor XI oder Faktor XIII) sind sehr selten, da es sich um autosomal rezessive Erbgänge handelt und für eine klinische Manifestation beide Allele betroffen sein müssen. Entsprechend weisen diese Hämorrhagien Inzidenzen von 1:500.000 bis 1:>1.000.000 auf und kommen vorwiegend in Bevölkerungsgruppen vor, in denen konsanguine Ehen verbreitet sind.

### Thrombophilien

Arterielle und venöse thromboembolische Ereignisse sind im Gegensatz zu den hämorrhagischen Diathesen sehr häufig, wobei die Inzidenz mit dem Alter deutlich zunimmt, im Bereich der venösen Thrombose von 1:100.000 im Kindesalter zu 1:1.000 Individuen bei über 60-jährigen.

### Seltene Mutationen in den Genen Antithrombin, Protein C und Protein S

Etwa 5 % der familiär auftretenden Thrombophilien sind bedingt durch einen Mangel der klassischen Inhibitoren Antithrombin, Protein C oder Protein S. Antithrombin ist der wichtigste direkte Inhibitor einer Reihe von prokoagulatorisch wirkenden Gerinnungsfaktoren (z. B. FII, FIX, FX). Eine große Zahl verschiedener Mutationen ist bisher bei Patienten mit Antithrombin-Mangel und Thrombosemanifestation identifiziert und in einem internationalen Register zusammenggeführt worden (<http://www.med.ic.ac.uk/divisions/7/antithrombin/>).

Protein C ist ein Vitamin-K-abhängiges Protein, das in seiner aktiven Form unter anderem die Gerinnungsfaktoren FV und FVIII inaktiviert. Die Prävalenz von Mutationen im Protein C-Gen wird mit bis zu 1,5:1.000 Individuen angegeben. Die Mutationen können praktisch alle Bereiche des Protein C-Gens betreffen und sind in einem internationalen Register verfügbar ([http://www.xs4all.nl/~reitsma/Prot\\_C\\_home.htm](http://www.xs4all.nl/~reitsma/Prot_C_home.htm)).

Protein S verstärkt als Kofaktor des Protein C dessen Bindung an Phospholipidoberflächen und damit dessen



Funktion bei der Inaktivierung von FV und FVIII. Auch hier ist ein breites Spektrum verschiedener Mutationen bei Patienten mit Protein-S-Mangel und gleichzeitiger Thrombosemanifestation beschrieben.

### Pharmakogenetik

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit den genetisch bedingten Ursachen für Arzneimittelunverträglichkeiten und Therapieresistenz. Die orale Antikoagulation mit Cumarinderivaten (z. B. Marcumar, Warfarin oder Acenocoumarol) stellt ein Beispiel dafür dar, wie die DNA-Analyse genetischer Dispositionsfaktoren die Therapie im Sinne einer individualisierten Medizin beeinflussen kann.

Cumarine werden seit mehr als 50 Jahren als orale Antikoagulanzen zur Prävention thromboembolischer Ereignisse bei Vorhofflimmern, künstlichen Herzklappen und zur Sekundärprophylaxe venöser Thromboembolien eingesetzt und gehören weltweit zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten. Obwohl die Cumarine als oral verabreichte Substanzen für die Patienten in Bezug auf Anwendung und Kosten günstig sind, wird die Therapie durch das enge therapeutische Fenster und das damit verbundene Risiko für Blutungen und Rethrombosen kompliziert. So liegt die Inzidenz für töd-

liche Blutungskomplikationen bei 0,25 % pro Behandlungsjahr (49). Hauptverantwortlich für die Komplikationen ist die breite inter- und intraindividuelle Variabilität der Dosis-Wirkungsbeziehung, die abhängig ist von einer Reihe erworbener und hereditärer Faktoren.

Die kürzlich identifizierten Haplotypen der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKORC1) sind für den Großteil der beobachteten interindividuellen und interethnischen Unterschiede in der Cumarindosis verantwortlich (50, 51). VKORC1, der molekulare Zielort für Cumarine, recycelt das bei der  $\gamma$ -Carboxylierung von Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren kontinuierlich entstehende Vitamin K. Der verbreitete Haplotyp *VKORC1\*2*, welcher mit einer um 50 % gegenüber dem Wildtyp verminderten Transkriptionsrate einhergeht, konnte weltweit in allen untersuchten Kollektiven als maßgeblich für die individuelle Cumarindosis identifiziert werden (51, 52). Darüber hinaus konnten einige seltene Aminosäuremutationen im VKORC1-Protein bestimmt werden, die zu einer partiellen bis vollständigen Cumarinresistenz führen (53). Die Kombination dieser neu entdeckten pharmakogenetischen Marker (einschließlich der schon länger bekannten *CYP2C9*-Genotypen, die v. a. für die Dosisvariation mit Warfarin

und Acenocoumarol verantwortlich sind) mit Umwelteinflüssen und patientenspezifischen Merkmalen (wie Alter, Geschlecht, Komedikation, Leberfunktion, nutritiver Vitamin-K-Status) erlaubt es, bisherige Dosisalgorithmen zu optimieren (54).

### Fazit

Die Anwendung der molekularen Medizin trägt entscheidend zum Fortschreiten hin zu einer zukünftigen individualisierten Medizin bei. In weiten Bereichen der Genomanalytik, beispielhaft bei der Ursachenforschung angeborener Erkrankungen, beim Einsatz von modernen molekularen Laborverfahren für die genetische Bestimmung der Antigenysteme von Blutzellen, und bei Routinekrankheits- und Screeningdiagnostik sind klare Fortschritte dokumentierbar. Die Verfügbarkeit neuer und vor allem billiger Hochdurchsatzsysteme im Bereich der Nukleinsäuresequenzierung und der Chipanalytik wird diesen Prozess unterstützen und beschleunigen.

Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)