Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Ulm

Abteilung Transfusionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Kubanek)

Häufigkeit nicht-funktionaler Allele des *RHD*-Gens und Ursachen der fehlenden Antigen-Expression

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

> Alexander Frohmajer geboren in Heidenheim an der Brenz

> > 1999

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Gierschik

- 1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Flegel
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Terinde

Tag der Promotion: 2

26.04.2001

Meiner Frau und meinem Sohn gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

| | | Seite |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Inhalts | sverzeichnis | 4 |
| Abkür | zungsverzeichnis | 6 |
| 1. El | NLEITUNG | 8 |
| 1.1 | Die Rhesus-Blutgruppe | 8 |
| 1.2 1.2 1.2 1.2 | Klinische Bedeutung des Rhesus D-Antigens2.1 Transfusion2.2 Morbus haemolyticus neonatorum (MHN)2.3 Rh _{null} -Syndrom | 11 11 12 12 |
| 1.3 | Klinische Bedeutung der RHD-Genotypisierung | 13 |
| 1.4 | Molekulargenetik des Rhesus-Genlocus | 15 |
| 1.5 | Wissenschaftliche Bedeutung des Rhesus-Genlocus | 16 |
| 1.6 1.6 1.6 1.6 | Varianten des Antigen D 5.1 Partial D-Phänotypen 5.2 Weak D 5.3 D _{el} | 18 18 19 20 |
| 1.7 | RhD-negativer Phänotyp, nicht-funktionale Allele | 20 |
| 1.8 | Fragestellung: Wie häufig treten nicht-funktionale Allele des <i>RHD</i> -Gens bei RhD-negativem Phänotyp auf? | 22 |
| 2. M/ | ATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 2.1 | Studienaufbau | 23 |
| 2.2 | Serologische Phänotypisierung | 23 |
| 2.3 | Probanden | 24 |
| 2.4 | DNA-Extraktion und -Asservation | 25 |
| 2.5 | Molekularbiologische Reihenuntersuchung | 25 |
| 2.6 | "Exon-Screening" | 29 |
| 2.7 | Nukleotid-Sequenzierung aller zehn <i>RHD</i> -Exons aus genomi- scher DNA | 30 |
| 2.8 | Serologische Aufarbeitung | 33 |
| 2.9 2.9 2.9 2.9 2.9 2.9 | Untersuchung von Sonderproben0.1Blutproben des Instituts Baden-Baden0.2Blutproben des Instituts Ulm0.3DNA-Proben des SCARF-Programms0.4DNA-Proben aus Taiwan0.5CdE-Haplotyp | 35 36 36 37 37 |
| 2.10 | Statistische Analyse | 38 |
| 3. EF | RGEBNISSE | 41 |

| | | Inhaltsverzeichnis | 5 |
|----|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| | 3.1 | Auffällige Proben der molekularbiologischen Reihenuntersuchung | 41 |
| 3 | 3.2 | Im "Exon-Screening" identifizierte Typen | 41 |
| 3 | 3.3 | Nukleotid-Sequenzierung | 45 |
| 3 | 3.4 | Serologische Aufarbeitung | 48 |
| 3 | 3.5 3.5 3.5 3.5 | Untersuchung von Sonderproben .1 Blutproben der Institute Baden-Baden und Ulm .2 DNA-Untersuchung der Sonderproben aus anderen Populationen .3 DNA-Untersuchung des CdE-Haplotyps | 51 51 53 56 |
| | 8.6 | Frequenz der identifizierten RHD-Allele | 56 |
| 4. | DI | SKUSSION | 62 |
| 2 | I .1 | Verteilung in den verschiedenen Rhesus-Haplotypen | 62 |
| 2 | 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 | Zuordnung zu bereits beschriebenen, nicht-funktionalen Allelen des RHD-Gens .1 PCR-Muster Typ 1/Typ 8 .2 PCR-Muster Typ 2 .3 PCR-Muster Typ 4 .4 PCR-Muster Typ 5 .5 PCR-Muster Typ 6 .6 RHD(M295I) .7 RHD(G385A) | 63 63 66 65 66 67 68 69 |
| 4 | 4.3 4.3 4.3 | Molekulare Ursachen der neu identifizierten, nicht-funktionalen <i>RHD</i> -Allele.1.1Hybridallele/Deletionen.2Punktmutationen | 69 69 70 |
| 4 | 4.4 | D _{el} -Varianten | 71 |
| 2 | 4.5 4.5 4.5 | Validierung gängiger PCR-Strategien.1Entwicklung einer Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR.2Vergleich mit anderen Typisierungsstrategien | 73 73 73 |
| 4 | 1.6 | Bedeutung möglicher neuer PCR-Strategien | 74 |
| 4 | 1.7 | Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Populationen | 75 |
| 4 | 4.8 4.8 4.8 | Suppressiver Effekt durch das C-Allel .1 C in <i>trans</i> -Stellung .2 C in <i>cis</i> -Stellung | 77 77 77 |
| 4 | 1.9 | Schlußfolgerungen | 79 |
| 5. | ZU | ISAMMENFASSUNG | 81 |
| Ę | 5.1 | Zusammenfassung | 81 |
| Ę | 5.2 | Summary | 82 |
| 6. | LIT | TERATUR | 84 |
| 7. | DA | NKSAGUNG | 92 |
| 8. | LE | BENSLAUF | 95 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| А | Adenosin | LISS | "low ionic strength solu- |
|------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| А | Alanin | | tion" |
| AIHA | Autoimmunhämolytische | Μ | Methionin |
| | Anämie | Μ | Molarität, Stoffmengen- |
| bp | "base pairs" | | konzentration in Mol/Liter |
| С | Cystein | max | maximal |
| С | Cytidin | MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| °C | Temperatur in Grad | MHN | Morbus haemolyticus |
| | Celsius | | neonatorum |
| cDNA | (zu mRNA) komplemen- | μM | Stoffmengenkonzen- |
| | täre DNA | | tration in Mikromol/Liter |
| D _{el} | "D-elute" | min | minimal |
| del | Deletion | mМ | Stoffmengenkonzen- |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | | tration in Millimol/Liter |
| dNTP | 2', 3'-Didesoxynukleosid- | Mr | relative Molekülmasse |
| | triphosphat | mRNA | Messenger-Ribonuklein- |
| EDTA | Ethylendiamintetraessig- | | säure |
| | säure | Ν | Asparagin |
| et al. | et alii | n | Anzahl |
| Ex | Exon | n.a. | nicht anwendbar |
| G | Glycin | NaCl | Natriumchlorid |
| G | Guanosin | neg | negativ |
| ges. | gesamt | nex | "not-expressed" |
| HCI | Salzsäure | NH₄CI | Ammoniumchlorid |
| HGH | "human growth hormone" | NH ₄ HCO ₃ | Ammoniumhydrogen- |
| HLA | Humanes Leukozyten | | carbonat |
| | Antigen | o.n.A. | ohne nähere Angaben |
| H ₂ O | Wasser | PCR | Polymerase-Ketten- |
| I | Isoleucin | | Reaktion |
| In | Intron | PCR-SSP | Polymerase-Ketten- |
| К | Lysin | | Reaktion mit sequenz- |
| kb | Kilobasen | | spezifischen Primern |

| pos | positiv |
|--------|------------------------|
| Prom | Promotor |
| Q | Glutamin |
| RFLP | Restriktions-Fragment- |
| | Längen-Polymorphismus |
| RhC/c | Rhesus C/c-Antigen |
| RHCE | Rhesus CE-Gen |
| RhD | Rhesus D-Antigen |
| RHD | Rhesus D-Gen |
| RhE/e | Rhesus E/e-Antigen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase- |
| | PCR |
| SCARF | "Serum, Cells And Rare |
| | Fluids" |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| S.O. | siehe oben |
| SSP | sequenzspezifischer |
| | Primer |
| Т | Threonin |
| Т | Thymidin |
| Taq | Thermus aquaticus |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)- |
| | aminomethan |
| tRNA | Transfer-Ribonuklein- |
| | säure |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | "untranslated region" |
| V | Valin |
| var | variant |
| vgl. | vergleiche |
| W | Tryptophan |
| Х | Stopkodon |
| Y | Tyrosin |

1. EINLEITUNG

1.1 Die Rhesus-Blutgruppe

Die Rhesus-Blutgruppe stellt aufgrund ihrer großen Bedeutung für die klinische Medizin und insbesondere der Transfusionsmedizin eines der am besten untersuchten Blutgruppensysteme des Menschen dar [83]. Das Rhesusblutgruppensystem wurde 1939 von Landsteiner und Wiener entdeckt. Nach heutigem Wissen setzt es sich aus über 45 Antigenen zusammen, von denen die Blutgruppenantigene C, c, D, E und e am wichtigsten sind. Diese Antigene stellen integrale Membranproteine mit 12, die Zellmembran durchziehenden Segmenten dar und besitzen sechs extrazelluläre Proteinschlaufen. Sie wurden bisher nur in der Membran von Zellen der erythroiden Reihe gefunden [29]. Als größtenteils homologe Polypeptide bestehen sie aus 416 Aminosäuren (M_r=45.500), deren Primärstruktur sich lediglich in 36 Aminosäuren unterscheidet [63]. Menschliche Erythrozyten werden derzeit in Rh-positiv und Rh-negativ eingeteilt, in Abhängigkeit einer Expression des Antigen D (ISBT 004.001; RH1) auf der Erythrozytenoberfläche. Bei ungefähr 17% der weißen Bevölkerung ist das Antigen D nicht vorhanden [107]. Für Rh-negative Individuen stellt das Antigen D folglich eine körperfremde Proteinstruktur dar, was eine Voraussetzung für die starke Immunisierung nach Kontakt mit Rh-positiven Erythrozyten ist [10]. In Anlehnung an die Antigene C, c, E und e bezeichnet man in der CDE-Nomenklatur nach Fisher eine fehlende Antigen D-Expression mit "d", wobei dies nicht wie bei den CE-Antigenen für ein eigenständiges Antigen steht. Neben der in Europa üblichen Nomenklatur nach Fisher ist vor allem im angloamerikanischen Raum die Nomenklatur nach Wiener weit verbreitet (Tab. 1.1).

Zwei Gene, das *RHD*- sowie das *RHCE*-Gen, die auf Nukleotidebene eine Homologie von 96% aufweisen, kodieren für diese Proteine [4]. Beide liegen eng benachbart auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 im Bereich 1p36.13-p34.3 [83]. Sie setzen sich aus 10 Exons zusammen und umfassen jeweils einen Bereich von circa 75 kb. Der Erbgang des Rhesusgenkomplexes folgt streng den Mendelschen Regeln. Die enge Nachbarschaft der beiden Gene ist dafür verantwortlich, daß sie *en bloc* vererbt werden [30]. Dabei ergeben sich 8 mögliche Haplotypen mit unterschiedlichen Frequenzen (Tab. 1.1). Die Nukleotidsequenzen der beiden Gene sind zum größten Teil aufgeklärt und einige nicht-homologen Abschnitte bekannt. Abweichungen einzelner Aminosäuren bedingen die unterschiedlichen antigenen

| CDE- Nomenklatur | Wienersche Nomenklatur | Haplotyp- |
|---------------------|---------------------------|-----------|
| - tomornatar | Homonidatai | |
| CDe | R ₁ | 0.431 |
| cde | r | 0.394 |
| cDE | R ₂ | 0.136 |
| cDe | R_0 | 0.021 |
| Cde | r' | 0.011 |
| cdE | r'' | 0.0056 |
| CDE | R _z | 0.0015 |
| CdE | r _y | <0.0001 |
| | | |

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung der Nomenklatur nach Fisher mit der nach Wiener.

¹ Angabe der Haplotypfrequenz für die Bevölkerung Baden-Württembergs [107].

Gruppen bekannt [21].

Eigenschaften der Antigene C, c, E und e [21]. Dagegen ist bei den meisten Weißen mit RhD-negativem Phänotyp das RHD-Gen vollständig deletiert. wodurch die fehlende Expression des Antigen D erklärt ist [4;32;63]. Es wurden in der Vergangenheit jedoch einige Fälle beschrieben, bei denen trotz fehlendem Antigen D Teile des RHD-Gens nachgewiesen werden konnten Ebenso (siehe 1.7). sind große Unterschiede in Bezug auf Haplotypfrequenzen, Allelverteilung und Variationen auf molekularer Ebene innerhalb der einzelnen ethnischen

Seit Entdeckung der Blutgruppenantigene erfolgt ihre Bestimmung durch serologische Methoden mit Antikörpern, die gegen die jeweiligen Antigenepitope gerichtet sind. Diese Verfahren wurden ständig verfeinert und stellen heute die Standardmethoden für die Bestimmung der einzelnen Blutgruppen in der Medizin dar. Dem enormen Wissenszuwachs im Bereich der Molekularbiologie der letzten Jahre und der Aufklärung der Nukleotidsequenzen von fast allen Blutgruppensystemen ist es zu verdanken, daß eine Blutgruppenbestimmung durch Genotypisierung mittels PCR-Techniken möglich wurde. Diese Methode ist für mehrere Blutgruppensysteme beschrieben worden und ist insbesondere auch für die Typisierung der RH-Gene möglich [45]. Die bereits erwähnte, ausgeprägte Homologie des RHCE- und RHD-Gens, sowie bestehende Polymorphismen dieser Gene erschweren jedoch die sichere Vorhersage des Phänotyps mittels DNA-Typisierung. Von verschiedenen Untersuchern sind falsch-positive [93] sowie falsch-negative [16;93] Ergebnisse beschrieben worden. Dies führte dazu, daß mehrere Polymorphismen zwischen RHCE- und RHD-Gen für die Genotypisierung mit unabhängigen Gensonden untersucht wurden [47]. Zur Bestimmung des RhD-Phänotyps mittels PCR-Techniken hat die Untersuchung von mehreren unterschiedlichen Bereichen

Einleitung

des *RHD*-Gens exaktere Ergebnisse erbracht. Dennoch kann die Gruppe von phänotypisch RhD-Antigen negativen Individuen mit wider Erwarten vorhandenen, nicht-funktionalen Allelen des *RHD*-Gens zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Genotypisierung führen. Einzelne Beobachtungen hierzu und die Notwendigkeit weiterer Abklärung in diesem Bereich sind beschrieben (Tab. 1.2 und 1.3), systematische Untersuchungen liegen jedoch nicht vor [45]. Daher existieren bisher keine genauen Daten über die Wahrscheinlichkei, mit der *RHD*-positive Allele bei phänotypisch RhD-Antigen negativen Individuen zu finden sind. Mögliche Ursachen für die fehlende Antigenexpression in diesen Fällen sind bisher nicht experimentell gesichert.

| Allel | Bereich | molekulare Ursache | Haplotyp | Population | Autor |
|------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------------------------|
| RHD(Q41X) | Exon 1 | Punktmutation C121T "non-sense"-Mutation | Cde | Weiße | Avent <i>et al.</i> [9] |
| <i>RHD-CE/</i> del(2-9)- <i>D</i> ¹ | Exon 2-9 | Hybridallel/Deletion | Cde | Weiße ³ | Hyland <i>et al.</i> [57] Andrews <i>et al.</i> [1] |
| RHD-CE(2-9)-D ¹ | Exon 2-9 | Hybridallel | Cde | Afrikaner | Huang [52] |
| RHD-CE/del(3-7)-D ² | Exon 4- Intron 7 ⁴ | Hybridallel/Deletion | (C)de ^s | Afrikaner | Blunt <i>et al.</i> [18] Tippet <i>et al.</i> [101] |
| | | | Cde | Weiße | Carritt et al. [20] |
| RHD-CE(3-7)-D ² | Exon 3(3')- Exon 7 | Hybridallel | (C)de ^s | Afrikaner | Faas <i>et al.</i> [39;40] |
| <i>RHD</i> (488del4) | Exon 4 | Deletion von 4 bp | Cde | Weiße | Hyland <i>et al.</i> [57] Andrews <i>et al.</i> [1;2] |
| RHD(G600del) | Exon 4 | Deletion von 1 bp | Cde | Weiße | Chérif-Zahar et al. [31] |
| RHD-CE(4-7)-D | Exon 4-7 | Hybridallel | cdE, G-pos | Weiße | Faas <i>et al.</i> [38;39;40] |
| <i>RHD</i> (Ex5var)- - <i>del(7-9)-D</i> | Exon 5 Exon 7-9 | "non-sense"-Mutation ⁵ Deletion | cde | o.n.A. ⁶ | Carritt <i>et al.</i> [20] |
| <i>RHD</i> (G314V) | Exon 7 | Punktmutation G941T zusätzlich C654G | Cde | Asiaten | Okuda <i>et al.</i> [81] |
| <i>RHD</i> (Ex9var) | Exon 9 | unbekannt | Cde | Weiße | Gassner <i>et al.</i> [47] |

Tabelle 1.2: Bekannte nicht-funktionale Allele des RHD-Gens

^{1,2} Die dargestellten Ergebnisse erlauben den Schluß, daß es sich hier um identische Allele handelt.

³ Persönliche Korrespondenz, Flegel et al. [45].

⁶ ohne nähere Angaben. Es wurden keine Angaben zur ethnischen Abstammung gemacht.

⁴ Exon 3 wurde nicht untersucht. In welchem Ausmaß Intron 7 von der Hybridbildung/Deletion betroffen ist, wurde nicht genau bestimmt.

⁵ Es wurde ein vorhandenes UGA Stopkodon beschrieben, nähere Angaben über dessen molekulare Ursache wurden nicht gemacht. Seither wurde dieses Allel nicht mehr näher bestimmt.

| als <i>RHD</i> -positiv bestimmter Bereich | angewandte Methode und untersuchte Bereiche | Haplotyp | Population | Autor |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Exon 3 + 10 Exon 10 | Rh-SSP-PCR für Exon 3,5,7,10 und Intron 4 | Cde Cde | Asiaten | Okuda <i>et al.</i> [81] |
| Intron 4 + Exon 10 Intron 4 Exon 10 | Intron 4/Exon 10 Multiplex- PCR | Cde,cdE CcddEe Cde | Weiße | Avent <i>et al.</i> [9] |
| 3' UTR + Exon 7 3' UTR | Rh-SSP-PCR für 3' UTR, Exon 7 und Intron 4 | Cde Cde | o.n.A. ¹ | Simsek <i>et al.</i> [95] |
| Exon 10 Exon 10 | Rh-SSP-PCR für Exon 4,7,10 und Intron 4 | Cde,cdE cde | Weiße Afrikaner+ | Aubin <i>et al.</i> [6] |
| Exon 4,7,10 + Intron 4 | | cde,Cde Cde | Afrikaner Asiaten | |
| 3' UTR | Rh-SSP-PCR für Exon 4,5,7 und 3' UTR | o.n.A. | Asiaten | Sun <i>et al.</i> [100] |
| 3' UTR | Rh-SSP-PCR für 3' UTR und Intron 4 | Cde, C ^{weak} de | o.n.A. ¹ | Simsek <i>et al.</i> [93] |
| 3' UTR | Intron 4/3' UTR Multiplex- PCR | Cde | o.n.A. ² | Pope <i>et al.</i> [82] |
| Exon 2,3,7,10 + Intron 4 Exon 10 | Rh-SSP-PCR für Exon 2,3,7 Intron 4/Exon 10 Multiplex- PCR | Cde ^s ,cde Cde ^s | Afrikaner Afrikaner | Daniels <i>et al.</i> [33] |
| Exon 3,7, 10 + Intron 4 | Rh-SSP-PCR für Exon 3,7,10 und Intron 4 | o.n.A. | o.n.A. ³ | Hessner <i>et al.</i> [51] |

Tabelle 1.3: Berichte über RHD-positive Genotypisierungen bei RhD-negativem Phänotyp

¹ Keine Angaben zur ethnischen Abstammung. Es handelte sich um Blutspender der niederländischen Blutbank.

² Keine Angaben zur ethnischen Abstammung, in England akquirierte Proben.

1.2 Klinische Bedeutung des Rhesus D-Antigens

1.2.1 Transfusion

Das Antigen D ist neben den Antigenen des ABO-Blutgruppensystems das für die Transfusion wichtigste Erythrozytenantigen. Die sehr starke antigene Wirkung führt bei Transfusion von RhD-positivem Blut an einen RhD-negativen Empfänger in 80% der Fälle zu einer Immunisierung [103]. Selbst bei nur geringen Mengen von RhD-positiven Erythrozyten, die in die Zirkulation von RhD-negativen Individuen gelangen, ist eine Immunisierung möglich. Dadurch kann es bei wiederholter Transfusion mit RhD-positiven Erythrozyten zu einer hämolytischen Transfusionsreaktion kommen.

1.2.2 Morbus haemolyticus neonatorum (MHN)

Die wichtigste Ursache für einen Morbus haemolyticus neonatorum stellen Blutgruppenunverträglichkeiten zwischen Mutter und Fetus dar, wobei dem Rhesus D-Antigen die größte Bedeutung zukommt. Kinder von Paaren, bei denen die Frau RhD-negativ, der Mann jedoch RhD-positiv ist und diese Eigenschaft an das Kind weitergegeben hat, sind von dieser Erkrankung am häufigsten betroffen. Abhängig vom Schweregrad können hierbei bei RhD-positiven Feten als Ausdruck einer intrauterinen Hämolyse Anämie, Icterus gravis, Hepatosplenomegalie und als maximale Ausprägung ein generalisierter Hydrops fetalis auftreten. Nach der Geburt kann sich beim Neugeborenen ein Kernikterus mit Bilirubinencephalopathie entwickeln [97]. Ein ausgeprägtes Krankheitsbild des MHN zeigt sich erst nach vorheriger Alloimmunisation der Mutter mit dem RhD-Antigen, wie sie bei vorausgegangenen Geburten stattgefunden haben kann. Demnach sind zumeist nur zweit- und später geborene RhD-positive Kinder betroffen. Der konsequenten Prophylaxe durch Gabe von Anti-D-Immunglobulin während der Schwangerschaft und unmittelbar nach der Geburt ist es zu verdanken, daß in den letzten 25 Jahren die Inzidenz der MHN-Erkrankungen stark zurückgegangen ist. Dennoch kommt es aufgrund fehlgeschlagener Prophylaxe oder anderweitiger Alloimmunisation der Mutter vor der Geburt auch heute noch zu diesem, den Feten vital gefährdenden Krankheitsbild [19;28;43]. Insbesondere in Fällen, in denen der Vater heterozygoter Träger des RHD-Gens ist, das Kind folglich mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% einen RhD-positiven Phänotyp besitzt, ist es bei bereits alloimmunisierter RhDnegativer Mutter von größter Wichtigkeit, frühzeitig den vorliegenden Rhesus-Phänotyp des Feten zu bestimmen. Nur so läßt sich eine Aussage über die Notwendigkeit zur weiteren invasiven Diagnostik und Therapie treffen.

1.2.3 Rh_{null}-Syndrom

Das Rh_{null}-Syndrom ist eine sehr seltene, genetisch bedingte Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang, bei der die Rhesus-Antigene C, c, D, E und e vollständig fehlen. Dieses Krankheitsbild hat viel für das Verständnis der Rhesus-Antigene und der Erforschung ihrer Funktion beigetragen [25]. Man unterscheidet zwei ätiologische Kategorien, den amorphen und den Regulator-Typ. Der amorphe Typ scheint durch eine Mutation im *RHCE*-Gen bedingt zu sein, die eine Expression der CE-Antigene unterbindet. Bei bestehendem RhD-negativem Phänotyp werden somit keine Rhesus-Antigene in die Erythrozytenmembran integriert [55]. Für den Regulator-Typ wurden Mutationen im *RH50*-Gen beschrieben. Dieses Gen kodiert für ein Glykoprotein, welches für die Expression der RhD- und RhCE-Antigene Voraussetzung ist, da es mit diesen interagiert und einen funktionellen Komplex in der Erythrozytenmembran bildet [56;58;72]. Das Rh_{null}-Syndrom geht mit einer latenten hämolytischen Anämie einher, die Erythrozyten haben eine verminderte osmotische Resistenz sowie eine verkürzte Überlebenszeit. Dies führte zu der Vermutung, daß der Rhesus-Antigenkomplex möglicherweise eine Transport- oder Kanalfunktion hat und für die Stabilisierung der Erythrozytenmembran eine Rolle spielt [25].

1.3 Klinische Bedeutung der *RHD*-Genotypisierung

Die erste klinische Anwendung fand die RHD-Genotypisierung in der pränatalen Bestimmung des fetalen RhD Status bei alloimmunisierten, RhDnegativen Schwangeren mit RhD-positivem Partner. Mit ihrer Hilfe konnte frühzeitig die Notwendigkeit einer Anti-D-Prophylaxe erkannt sowie die weitere klinische Betreuung festgelegt werden [15;65]. Die Vorteile einer Bestimmung anhand fetaler DNA liegen zum einen in der geringen Menge fetalen Gewebes, die für eine Untersuchung mittels PCR-Techniken nötig ist. Hierbei kann jedes fetale Gewebe mit kernhaltigen Zellen zur DNA-Präparation herangezogen werden, so zum Beispiel Amnionflüssigkeit [105], Chorionzottenbiopsate oder Nabelschnurblut. Bei einer Nabelvenenpunktion kann es in 1-3% der Fälle zu einem Fruchtabgang kommen [48;74], außerdem können die invasiven Techniken zu einer Boosterung der Antikörperproduktion der Mutter führen. Daher stellt der Ansatz, fetale Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter zu isolieren und anzureichern, eine Methode ohne Risiko für den Feten dar. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß diese Methode zu einem weit früheren Zeitpunkt in der Schwangerschaft angewandt werden kann als invasive Techniken wie Amniozentese und Umbilikalvenenpunktion [93]. In neueren Untersuchungen konnte sogar frei zirkulierende fetale DNA in Plasma und Serum der Mutter nachgewiesen werden [66]. Genotypisierungen sind demnach auch ohne kostenintensive und zeitaufwendige Isolation fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut möglich. Fetale DNA wird innerhalb von Stunden postpartal im Serum der Mutter abgebaut [68]. Daher ist diese Methode bei bereits vorausgegangenen Schwangerschaften mit RhD-positiven Kindern weniger störanfällig als Genotypisierungen anhand fetaler Zellen, die noch Jahre nach der Geburt im Kreislauf der Mutter gefunden werden können [17]. Die *RHD*-Genotypisierung anhand frei zirkulierender fetaler DNA wurde für die Zeit ab der 16. Schwangerschaftswoche als sehr sensitiv beschrieben [41;67].

Weitere Anwendung findet die *RHD*-Genotypisierung bei Vaterschaftsuntersuchungen sowie in der forensischen Medizin. Auch hierbei kann eine Genotypisierung aus allen Arten menschlichen Gewebes, das kernhaltige Zellen enthält, durchgeführt werden. Insbesondere für die forensische Medizin sind hierbei DNA-Untersuchungen von Blut, Serum, Plasma, Haut, Haaren, Haarfollikeln, Knochen, Sperma und Urin von Bedeutung [59].

Einen großen Vorteil gegenüber serologischen Methoden bietet die Genotypisierung in Fällen, in denen serologische Bestimmungen nur bedingt durchführbar sind. Nach massiver Transfusion allogener Blutkomponenten kommt es durch Verdünnungseffekte und Vermischung der Erythrozyten des Empfängers mit den Spenderzellen noch Wochen später zu Überlagerungen und falschen Ergebnissen bei serologischen Antigenbestimmungen [112]. Obwohl auch Leukozyten des Spenders bei Transfusionen in den Kreislauf des Empfängers gelangen, erbrachten Genotypisierungen vor und nach Transfusion in bisherigen Untersuchungen übereinstimmende Ergebnisse [37;92]. Bei Sonderformen des Antigen D, insbesondere bei den unterschiedlichen D-Kategorien, kann die serologische Bestimmung durch mangelnde Antikörper-Sensitivität erschwert sein. Auch hier konnte ein deutlicher Vorteil der Genotypisierung gezeigt werden, wie es für die unterschiedlichen D^{VI}-Kategorien beschrieben ist (siehe 1.6.1) [109]. Dem derzeitigen, die serologischen Methoden unterstützenden Einsatz der Genotypisierung im Bereich der Transfusionsmedizin kann aber durch den rasanten Wissenszuwachs auf diesem Gebiet schon bald eine weitaus größere Bedeutung zukommen. Es besteht die Überzeugung, daß die Genotypisierung eines Tages die vorherrschenden Phänotypisierungsverfahren selbst für viele Routineaufgaben in der Transfusionsmedizin ersetzen wird [79].

Die klinische Bedeutung der RHD-Genotypisierung hängt entscheidend von der genauen Vorhersage des Rhesus-Phänotyps ab. Nur wenn diese verläßliche

Ergebnisse liefert, kann sie für klinische Entscheidungen verwendet werden. Das Hauptproblem hierbei sind Allelvarianten, vor allem *RHD/CE*-Hybridallele und Punktmutationen, die eine fehlende oder sehr schwache Antigenexpression bedingen und zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen serologisch bestimmtem Phänotyp und molekular bestimmtem Genotyp führen [45]. Populationsbezogene, randomisierte Untersuchungen zur Bestimmung der Allelfrequenzen sind notwendig, um eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit vorzunehmen, mit der bei Genotypisierungen mit falsch positiven Ergebnissen zu rechnen ist. Dies würde die Aussagekraft verbessern und somit auch die klinische Bedeutung der *RHD*-Genotypisierung erweitern.

1.4 Molekulargenetik des Rhesus-Genlocus

Die RH-Gene sind auf Nukleotidebene zu 96% homolog und liegen in enger Nachbarschaft auf einem Chromosom [4]. Die Anordnung und der Exon-Intron Aufbau der beiden Gene ist komplex (Abb. 1.1). Es wird angenommen, daß ihr Polymorphismus aus einer Genduplikation entstanden ist, die in der Evolution vor etwa 8,5 (+/- 3,4) Millionen Jahren stattgefunden hat [73]. Wesentlich später entstand der RhD-negative Phänotyp durch eine Deletion, die das gesamte RHD-Gen betraf [21;25]. Durch abweichende serologische Reaktionsmuster wurde schon früh die Vermutung nach einer Reihe von unterschiedlichen Rhesus-Allelen geäußert. In erster Linie waren es aber molekularbiologische Ansätze, die diese Vermutungen bestätigten und darüber hinaus noch viele weitere Allele aufzeigten. die durch serologische Methoden nicht zu unterscheiden waren. Die derzeit bekannten und untersuchten Allele weisen auf zahlreiche Rekombinationsvorgänge und Genkonversionen zwischen den beiden RH-Genen hin. Hierbei kam es zu Austauschen von einzelnen Exonabschnitten bis hin zu größeren, mehrere Exons umspannenden Bereichen. Desweiteren sind derzeit schon zahlreiche Punktmutationen beschrieben worden, die zu veränderten antigenen Eigenschaften der Rh-Proteine führen [24;54;109;110].

Für eine molekularbiologische Differenzierung der homologen *RH*-Gene werden Polymorphismen in der Nukleotidsequenz, sogenannte diagnostische Stellen, untersucht. Dies sind zum Teil einzelne Nukleotide, die einen Sequenzunterschied zwischen *RHD*- und *RHCE*-Gen bedingen und sowohl in Exon- als auch

in Intronbereichen beschrieben sind [45;110]. Es sind keine unterschiedlichen Nukleotide in der kodierenden Sequenz von Exon 1 und Exon 8 zwischen RHD- und RHCE-Gen bekannt, Exon 2 ist bei RHD und dem C-Allel des RHCE-Gens identisch. Daher sind diese Bereiche für Genotypisierungen zur Vorhersage des RhD-Phänotyps nicht, beziehungsweise nicht bei gleichzeitig RhC-positivem Phänotyp verwendbar [47]. Ein größerer Unterschied zwischen den beiden RH-Genen besteht im Intron 4 [4], das eine 651 Nukleotide umfassende Deletion beim RHD-Gen aufweist [9]. Die korrekte Vorhersage des Phänotyps mit Hilfe von Genotypisierungsstrategien ist durch sporadische nicht-funktionale Allele, die grundsätzlich in allen Genen vorkommen, nicht immer möglich [108]. Bei diesen Allelen können noch nicht bekannte Polymorphismen, die nicht im Bereich der untersuchten diagnostischen Stellen liegen, zu einem Funktionsverlust des Gens und falsch-positiven Ergebnissen bei der Genotypisierung führen [44;108]. Für die RHD-Genotypisierung sind daher derzeit wenigstens zwei, voneinander getrennt liegende diagnostische Stellen zur Untersuchung empfohlen [16;45;64;93]. Insbesondere die Untersuchung der zwei diagnostischen Stellen im Exon 4/Intron 4 und Exon 7 deckt die klinisch wichtigsten Partial D-Phänotypen D^{VI} und D^{IV} (siehe 1.6.1), sowie die durch *RHD*-CE-D Hybride, die den Bereich Exon 4 bis 7 betreffen, bedingten RhD-negativen Allele ab und wurden als zuverlässige Genotypisierungsstrategie von Flegel et al. [45] empfohlen.

1.5 Wissenschaftliche Bedeutung des Rhesus-Genlocus

Unterschiedliche molekulare Mechanismen und deren Effekt auf den *RH*-Genlocus führten zu veränderten antigenen Eigenschaften der daraus entstandenen Proteine. Die weitere Erforschung dieser Mechanismen würde es ermöglichen, potentielle Ursachen für eine fehlende Rh-Antigenexpression in der Erythrozytenmembran zu finden [101]. Dieses Wissen könnte Einblick in die Strukturen geben, die für die Zellmembranintegration transmembranaler Proteine wichtig sind, und somit auch auf andere integrale Membranproteine übertragen werden.



Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der chromosomalen Anordnung und des Aufbaus der *RH*-Gene. Die gesamte Länge des *RH*-Genlocus umfaßt weniger als 450 kb und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1. Das *RHD*-Gen liegt in 3'-Richtung vom *RHCE*-Gen, wobei der genaue Abstand zwischen den beiden Genen nicht bekannt ist [21]. In dieser Abbildung symbolisieren Rechtecke Exonbereiche, horizontale Linien Intronabschnitte. Die Ausdehnungen der einzelnen Bereiche sind in einem annähernd maßstabsgetreuen Verhältnis zueinander dargestellt. Grau ausgefüllte Exonbereiche stellen die nicht-translatierten Abschnitte (UTR) dar. Die feinen vertikalen Linien innerhalb der Exons markieren die Stellen, an denen polymorphe Aminosäuren entdeckt wurden, die zu Unterschieden zwischen der Sequenz des *ce*-Allels des *RHCE*-Gens und des *RHD*-Gens führten. Die Stellen des *RHD*-Gens, an denen Intronbereiche im Vergleich zum *CE*-Gen fehlen (Intron 2, 3 und 4), wurden durch Pfeile markiert und erläutert. Sterne markieren einen Bereich molekularer Identität um Exon 2 zwischen *C*-Allel des *RHCE*-Gens und dem *RHD*-Gens (Abbildung in Anlehnung an Flegel *et al.* [45], Abbildung 1).

Einleitung

Serologische Methoden für die Rhesus-Antigenbestimmung sind etabliert und die Sequenzen der Rhesus-Gene weitestgehend bekannt. Dies stellt einen großen Vorteil des Rhesus-Systems gegenüber anderen Proteinfamilien dar, der die Erforschung der komplizierten molekularbiologischen Ursachen, die für die Entstehung von Polymorphismen bei Proteinen verantwortlich sind, möglich macht.

Die *RH*-Gene und Rh-Proteine können als ein gut geeignetes Modellsystem für eine Reihe von homologen, in enger Nachbarschaft auf einem Chromosom gelegenen Genen dienen, von denen zahlreiche Vertreter im Genom aller Spezies vorkommen. Nach den *HLA*-Genen stellen die *RH*-Gene schon jetzt die am besten untersuchten Vertreter dieser Gruppe dar. Im Gegensatz zu den HLA-Proteinen waren die Rh-Proteine offensichtlich keinem starken Selektionsdruck ausgesetzt gewesen. Daher läßt das Rhesus-System verläßlichere Aussagen über Mutationen zu, die während der molekularen Evolution zu Veränderungen im Genom führen [45]. Diese Ergebnisse könnten auf viele Gene übertragen werden, die keinem starken Selektionsdruck ausgesetzt waren.

1.6 Varianten des Antigen D

Man nimmt an, daß das RhD-Antigen aus mindestens neun Epitopen (epD1 bis epD9) mosaikartig zusammengesetzt ist. Die Expression des RhD-Antigens kann qualitativ oder quantitativ verändert sein [84].

1.6.1 Partial D-Phänotypen

Partial D-Phänotypen sind qualitativ veränderte Phänotypen, die einzelne Epitope des RhD-Antigens nicht exprimieren [73]. Diese Abweichungen von der normalen Epitopstruktur können mit gegen einzelne Epitope gerichteten, monoklonalen Antikörpern erkannt und unterschieden werden [23]. Man teilte diese Partial D-Phänotypen in sechs Hauptkategorien, D^{II} bis D^{VII} (D^I ist obsolet), ein. Neben diesen sind heute noch weitere Varianten von Partial D bekannt (DFR, DBT, D^{HMi}, DNU, R₀^{Har}). Serologische Untersuchungen von Partial D-Phänotypen mit monoklonalen Anti-D Antikörpern ergaben mehr als 30 unterschiedliche Reaktionsmuster [61]. Dies führte zu der Vermutung, daß das RhD-Antigen aus bis zu 30 Epitopen zusammengesetzt sein könnte [91]. Als molekulare Ursachen für die fehlende Expression einzelner Epitope wurden zum einen Genkonversion zwischen

RHCE- und RHD-Gen beschrieben, die ein RHD-CE-D Hybridgen bildeten [9]. Ohne funktionales RHD-Gen in trans-Stellung führt dies zum Verlust einzelner Epitope des RhD-Antigens. Die ausgetauschten Bereiche reichen dabei von einem Nukleotid (D^{II}) [7] bis zu vier Exons (D^{VI} Typ III) [109]. Eine andere Ursache scheinen spontane Punktmutationen gewesen zu sein, wie sie zum Beispiel für die Kategorien D^{VII} oder DNU beschrieben wurden [7]. Über die genauen Zusammenhänge zwischen veränderten Gensequenzen und ihrer Folgen für die Epitopexpression ist derzeit jedoch nur wenig bekannt. Es scheint aber, daß die Exons 4, 5 und 7 eine entscheidende Funktion für die Bildung der Epitope haben, während die Exons 1, 2, 3, 9 und 10 für die Expression von Epitopen weniger wichtig sind [13;101]. Partial D-Phänotypen können nach Kontakt mit D-positiven Erythrozyten eine Allo-Antikörperbildung gegen die ihnen fehlenden Epitope des RhD-Antigens zeigen. Von großer klinischer Bedeutung ist dies vor allem bei Schwangeren der D-Kategorie VI (D^{VI}), die durch Übertritt von RhD-positiven Erythrozyten ihres Kindes alloimmunisiert worden sind [109]. Sehr schwere Verläufe unter dem Vollbild eines Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) wurden hierbei schon beschrieben [62]. Auch für weniger häufige Partial D liegen Berichte über Fälle von MHN, jedoch mit einem milderen Verlauf, vor. So zum Beispiel für D-Kategorie IIIc [12], R₀^{Har} [50] und D-Kategorie IVa [5]. Die Antigenexpression kann bei einzelnen Partial D auch quantitativ verändert sein. Dies kann sich in einer erhöhten Antigendichte, wie für D^{IVa} gezeigt wurde, sowie in einer reduzierten Antigendichte, wie es bei D^{VI} der Fall ist, äußern [49].

1.6.2 Weak D

Weak D-Varianten (früher D^u) sind Phänotypen mit quantitativ veränderter Antigenexpression, bei denen eine im Vergleich zur regulären Antigendichte reduzierte Anzahl von RhD-Antigenen an der Erythrozytenoberfläche exprimiert werden [60]. Dies äußert sich in einer abgeschwächten Reaktion mit monoklonalen Anti-D Antikörpern, ein sicherer Nachweis gelingt nur im indirekten Antiglobulintest (Coombs-Test). Weak D kommt bei 0,2% bis 1% der weißen Bevölkerung vor [110]. Es bestand die Auffassung, daß bei Weak D-Varianten strukturell intakte RhD-Antigene exprimiert werden [14;88]. Gründe für die stark abgeschwächte Reaktion mit monoklonalen Anti-D Antikörpern wurden einerseits als ein suppressiver Effekt (Ceppellini-Effekt) eines C in *trans*-Stellung beschrieben [26]. Als Ursache konnte für diesen Fall durch Messungen der Antigendichte mit indirekter Immunfluoreszenz-

Einleitung

messung eine reduzierte RhD-Antigendichte gezeigt werden [106]. Auch für ein C in *cis*-Stellung wurde ein ähnlicher suppressiver Effekt auf die exprimierten D-Epitope vermutet [3]. Ein anderer Grund wurde auf Transkriptionsebene oder bei der prämRNA Bildung angenommen, da bei Weak D-Varianten auch eine reduzierte Menge an *RHD* mRNA gefunden wurde [11]. Zu einem sehr geringen Anteil können auch Partial D-Phänotypen, das heißt qualitativ veränderte RhD-Proteine, mit reduzierter Antigendichte (siehe 1.6.1) Ursache für Weak D-Varianten sein [110]. Neuere Untersuchungen bewiesen hingegen, daß bei fast allen Weak D-Phänotypen Punktmutationen in der *RHD*-Gensequenz vorliegen, die zu einem oder mehreren Aminosäureaustauschen in der Primärstruktur des RhD-Proteins führten. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß bei vielen oder sogar allen Weak D-Varianten auch strukturell veränderte RhD-Proteine als Ursache zu finden sind [110].

1.6.3 D_{el}

Bei D_{el}-Varianten zeigt sich keine Reaktion mit polyklonalen sowie monoklonalen Anti-D Antikörpern. Selbst mit dem indirekten Antiglobulintest (Coombs-Test) gelingt kein Nachweis. Somit stellen diese Proben RhD-Varianten mit einer äußerst schwachen Antigen D-Expression dar, die mit serologischen Routinemethoden als RhD-negativ bestimmt werden. Lediglich mittels äußerst sensitiver Adsorption-Elution-Verfahren kann die sehr stark herabgesetzte RhD-Antigenexpression nachgewiesen werden. In der asiatischen Bevölkerung scheinen diese Phänotypen zu einem großen Anteil unter serologisch RhD-negativen Spendern vertreten zu sein [46;71;80;100]. Als eine molekulare Ursache für Del in der Bevölkerung Taiwans wurde eine Deletion im Bereich zwischen Intron 8 und Intron 9 des RHD-Gens beschrieben [27], für andere Populationen konnte dies jedoch noch nicht gezeigt werden. Über die Häufigkeit des Auftretens von D_{el}-Varianten in der weißen Bevölkerung liegen keine genauen Angaben vor. Da diese Phänotypen mit serologischen Routinemethoden RhD-negativ bestimmt werden, jedoch ein zumindest zu großen Teilen intaktes RHD-Gen besitzen [27;100], können sie derzeit ein Problem für Genotypisierungsstrategien darstellen.

1.7 RhD-negativer Phänotyp, nicht-funktionale Allele

Bei ungefähr 17% der weißen Bevölkerung wird kein RhD-Antigen auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert [107]. Als Hauptursache für die fehlende

Antigenexpression wurde eine Deletion des *RHD*-Gens beschrieben [4;32]. Im Rahmen von molekularbiologischen Untersuchungen zeigte sich aber, daß auch bei RhD-negativem Phänotyp Teile des *RHD*-Gens, beziehungsweise nicht-funktionale Allele davon vorhanden sein können (Tab 1.2 und 1.3). Diese wurden in erster Linie bei Cde- und cdE-Haplotypen beobachtet und führten zu der Vermutung, daß vielfältige genetische Varianten des *RHD*-Gens vor allem bei diesen Haplotypen zu finden sein könnten [9;57]. Es besteht derzeit die Auffassung, daß die Exons 4, 5 und 7 des *RHD*-Gens für eine Antigenexpression essentiell sind und eine Deletion oder ein Austausch dieses Bereiches mit den analogen Bereichen des *RHCE*-Gens zum Verlust nahezu aller [38] oder der gesamten [40] RhD-Antigeneigenschaften führt [45;109].

Insbesondere in anderen ethnischen Gruppen, wie Afrikanern und Asiaten, findet man nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens bei RhD-negativem Phänotyp viel häufiger als in der weißen Bevölkerung [33;34;46;81]. Eine teilweise Erklärung hierfür könnte die geringere Prävalenz des RhD-negativen Phänotyps in diesen Populationen sein (0,3% [71] - 0,5% bei Asiaten [99;100], 3% bei Afrikanern [33]). Daher müssen Ergebnisse von *RHD*-Genotypisierungen bei diesen ethnischen Gruppen zur Zeit noch unter großem Vorbehalt interpretiert werden [6].

Es ist bekannt, daß nicht-funktionale Allele in den meisten Genen aller Spezies vorkommen. Für den Menschen wurde dies am Beispiel des *FUT1*-Blutgruppengens gezeigt und diese Ergebnisse lassen sich auch auf andere Genloci übertragen. Die Mehrzahl der nicht-funktionalen Allele können auf Mutationen in der kodierenden Sequenz, Defekten im Promotorbereich, den Verlust von Start-Kodons oder Veränderungen an Spleißstellen, die die Exon/Intron-Schnittstellen innerhalb eines Gens darstellen, zurückgeführt werden. Sind dadurch für die Funktionalität des Gens wichtige Bereiche verändert, die kurzen Nukleotidsequenzen, die mit Oligonukleotidprimern untersucht werden, aber unverändert, so haben diese Allele Auswirkungen auf die Spezifität jeglicher Genotypisierungsstrategie zur Vorhersage des möglichen Phänotyps und stellen die Hauptursache für falsch-positive Ergebnisse dar [44]. Um daher verläßliche Genotypisierungsstrategien zu entwickeln, ist es von herausragender Bedeutung, die Häufigkeit in der Population sowie die Ursache für nicht-funktionale Allele zu bestimmen [108]. Durch seine große klinische Bedeutung gilt dies insbesondere auch für das *RHD*-Gen. Populationsbezogene, randomisierte Untersuchungen für nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens bei RhD-negativen Individuen wurden daher zur Entwicklung robusterer Genotypisierungsstrategien bereits gefordert [45]. Ein ähnlicher Untersuchungsansatz anhand Proben aus unterschiedlichen Populationen ist derzeit im Gange [70], wurde jedoch noch nicht abgeschlossen. Somit könnte die vorliegende Arbeit lange erwartete Ergebnisse auf dem Gebiet der klinischen *RHD*-Genotypisierung liefern.

1.8 Fragestellung: Wie häufig treten nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens bei RhD-negativem Phänotyp auf?

Ziel der Untersuchung war es, die Häufigkeit von nicht-funktionalen Allelen des *RHD*-Gens unter Blutproben mit serologisch festgestelltem RhD-negativem Phänotyp für die Bevölkerung Baden-Württembergs anzugeben. Mögliche Unterschiede in der Verteilung dieser Allele auf einzelne Haplotypen sollten aufgezeigt werden. Es sollte, sofern möglich, eine Zuordnung zu bereits beschriebenen nicht-funktionalen Allelen erfolgen, beziehungsweise die Abklärung der molekularen Ursachen für bisher unbekannte nicht-funktionale Allele angestrebt werden.

Mit den so gewonnenen Daten kann geklärt werden, wie robust die derzeit angewandten *RHD*-Genotypisierungsstrategien in bezug auf die in der Bevölkerung von Baden-Württemberg gefundenen nicht-funktionalen Allele sind und ob ihre Spezifität von diesen Allelen begrenzt wird. Durch möglicherweise neu gefundene molekulare Ursachen für diese Allelie könnten neue diagnostische Stellen für die Erkennung dieser nicht-funktionalen Allele zur Primerkonzeption verwendet werden. Dadurch könnten zukünftig bessere Genotypisierungsverfahren zur Erkennung nichtfunktionaler Allele des *RHD*-Gens eingesetzt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienaufbau

Es wurde von 1.039 serologisch RhD-negativen Blutproben des Instituts Ulm des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg DNA extrahiert und asserviert. Eine PCR-gestützte, molekularbiologische Reihenuntersuchung wurde mit sequenzspezifischen Primern an vier diagnostischen Stellen des RHD-Gens (Promotor, Intron 4, Exon 7, 3' UTR von Exon 10) durchgeführt. Zeigten sich in einem oder mehreren der untersuchten Bereiche RHD-spezifische Banden, wurden diese Proben zusätzlich mit einer SSP-PCR mit sequenzspezifischen Primern für die Bereiche der Exons 3, 4, 5, 6, 7 und 9 sowie für Intron 7 des RHD-Gens untersucht. Anhand des hierbei erhaltenen Bandenmusters erfolgte eine Einteilung in unterschiedliche Typen. Bei den Proben, die in allen untersuchten Bereichen für das RHD-Gen spezifische Banden erbrachten, wurden alle 10 Exons des RHD-Gens entweder vollständig sequenziert oder bis eine bereits bekannte Mutation in einem der sequenzierten Exons entdeckt wurde. Eine weitere Unterteilung dieses Typs erfolgte mit Hilfe der so gefundenen molekularen Abweichungen von der RHD-Gensequenz. Stellvertretend für jeden einzelnen der gefundenen Typen schloß sich für jeweils eine vollständig molekular charakterisierte Probe eine serologische Aufarbeitung mit mono- und oligoklonalen Anti-D Antikörpern, sowie ein Adsorption-Elution-Verfahren an.

2.2 Serologische Phänotypisierung

Die serologische RhD-Phänotypisierung erfolgte mit dem vollautomatischen Analysensystem PK7200 (Olympus, Hamburg, Deutschland) im Rahmen der Routineuntersuchung der Blutspender. Dabei wurden die monoklonalen Antikörper BS226 (Biotest, Dreieich, Deutschland) und RUM-1 (Immucor, Rödermark, Deutschland) eingesetzt. Es wurde mit einer Antikörpermischung von 1:200 (BS226), beziehungsweise 1:100 (RUM-1) in einer Lösung aus Immusol (Baxter, München, Deutschland) und Rinderalbumin (Ortho Diagnostic Systems, Neckargmünd, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 0,22% Rinderalbumin gearbeitet. Eine 1,6%ige Erythrozytensuspension in Immusol und Bromelin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 0,1% Bromelin wurde für die Untersuchung benutzt. Dabei wurden 25µl Erythrozytensuspension mit 25µl der entsprechenden Antikörperlösung gemischt, bei +25°C für 1 Stunde inkubiert und automatisch ausgewertet.

RhD-negative Proben wurden zum Ausschluß von Weak D- beziehungsweise Partial D-Phänotypen zusätzlich mit oligoklonalem Anti-D Serum (Anti-D Blend, IgG BS221/H41, IgM BS232; Biotest) in ID-Gel (LISS-Coombs 37°C, DiaMed-ID Micro Typing System; DiaMed, Cressier sur Morat, Schweiz) oder Röhrchentechnik untersucht. Bei schon bekannten Mehrfachspendern wurde auf vorhandene Untersuchungsergebnisse bereits durchgeführter Gel- oder Röhrchentests zurückgegriffen.

2.3 Probanden

Es wurden im Zeitraum von fünf Monaten (Spendedatum 05.01.1998 bis 15.05.1998) aus den freiwilligen Blutspenden des Instituts Ulm 725 unterschiedliche Proben gesammelt, die bei RhD-negativem Phänotyp in der serologischen Routinebestimmung RhC- und/oder RhE-positiv getestet worden sind. Zusätzlich wurden 314 Blutproben der Rhesusformel ccddee (Spendedatum 09.03.1998 bis 26.03.1998) als Vergleichsgruppe gesammelt (Tab. 2.1). Um bei dieser Gruppe lokale Häufungen zu vermeiden, wurden von jedem Blutspendeort maximal 10 Proben für die Untersuchung bereitgestellt. Somit konnte auch bei diesen häufigen RhD-negativen Proben ein für die Bevölkerung Baden-Württembergs repräsentatives Kollektiv untersucht werden. Die einzelnen Phänotypen wurden in die

| Tabelle 2.1: Prob | penübersicht |
|-------------------|--------------|
|-------------------|--------------|

| Phänotyp | Anzahl | Frequenz 1 |
|----------|--------|------------|
| Ccddee | 433 | 0,83 % |
| CCddee | 7 | 0,012 % |
| CcddEe | 12 | 0,014 % |
| ccddEe | 271 | 0,43 % |
| ccddEE | 2 | 0,0021 % |
| ccddee | 314 | 15,81 % |
| gesamt | 1.039 | |

Tabelle 2.2: Untersuchte Haplotypen

| Haplotyp | Anzahl | Frequenz ¹ |
|----------|--------|-----------------------|
| Cde | 459 | 0,011 |
| cdE | 287 | 0,0056 |
| cde | 1.332 | 0,394 |
| gesamt | 2.078 | |

¹ Angabe der Frequenz f
ür die Bev
ölkerung Baden-W
ürttembergs [106]. zugrundeliegenden Haplotypen aufgeteilt (Tab. 2.2). Hierbei wurde für den Phänotyp CcddEe die weitaus wahrscheinlichere Konstellation der Haplotypen Cde/cdE vorausgesetzt und die Konstellation CdE/cde aufgrund des sehr seltenen Haplotyps CdE (Frequenz <0,0001 [107]) vernachlässigt.

2.4 DNA-Extraktion und -Asservation

Die DNA-Extraktion erfolgte aus "buffy coat" (Leukozytenüberstand) von EDTA-antikoaguliertem Blut mit einer Aussalzmethode in Anlehnung an die von Miller et al. beschriebene Technik [75]. In einem ersten Schritt erfolgte die Lyse der Erythrozyten mittels einer 1:10 verdünnten Pufferlösung (207,2 g NH₄Cl, 19,77 g NH₄HCO₃, 0,925 g EDTA NH₄Cl und 2.500 ml H₂O). Nach Zentrifugation bei 1.800 upm wurde der hämolytische Überstand dekantiert und das leukozytenhaltige Sediment mit einem Kernlysepuffer (2,44 g Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan, 46,72 g NaCl, 1,48 g EDTA, 2.000 ml H₂O, Puffer auf pH 8,2 eingestellt), 10% SDS (100 g SDS in 1.000 ml H₂O) und Proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland; 1mg/ml) über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde zu der abgekühlten Probe eine 5 M NaCI-Lösung zugegeben und kräftig geschüttelt. Der ausfallende Proteinanteil wurde 15 Minuten bei 3.000 upm abzentrifugiert und anschließend als Sediment verworfen. Der abgesetzte Überstand wurde mit der doppelten Volumenmenge Ethanol (100%) versetzt und solange geschwenkt, bis die DNA als Faden sichtbar präzipitierte. Dieser Faden wurde mit einer Pasteurpipette in 70% Ethanol überführt, kurz geschwenkt und in einem Kryo-Röhrchen in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Die so erhaltenen DNA-Proben wurden bei -20°C tiefgefroren gelagert.

2.5 Molekularbiologische Reihenuntersuchung

Eine PCR-gestützte molekularbiologische Reihenuntersuchung mit sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern (SSP-PCR) wurde mit allen gesammelten Proben durchgeführt. Es wurden die von Flegel *et al.* [45] empfohlenen Bereiche von Exon 4/Intron 4 und Exon 7, sowie darüber hinaus die Promotorregion und der Genbereich 3' UTR des Exon 10 nach Sequenzen, die für das *RHD*-Gen spezifisch sind, einzeln untersucht. Bei 710 Proben (396 RhC-/RhE-positive Proben, 314 mit Phänotyp ccddee) wurde der Bereich von Intron 4 und Exon 7 mit einem, im Zuge dieser Arbeit von uns neu konzepierten Multiplex-PCR-Ansatz anstelle der

Es hierfür dieselben Einzelreaktionen untersucht. wurden Primer der Einzelreaktionen verwendet, die Konzentrationen der Reagenzien mußten jedoch durch systematische PCR-Ansätze mit titrierten DNA-Proben auf die festgelegten Reaktionsbedingungen adaptiert werden. Mit den durchgeführten Untersuchungen sollte auch die Verläßlichkeit dieses neuen Multiplex-Ansatzes kontrolliert werden, da dieser als kosteneffiziente und materialsparende Methode durch halbierten Bedarf an Reagenzien deutliche Vorteile gegenüber den bisher eingesetzten Einzelreaktionen aufweist. Zusätzlich wurde in jedem der PCR-Ansätze ein 434 bp langes Fragment des HGH-Gens ("human growth hormone") wie bereits beschrieben als Positivkontrolle amplifiziert [47]. Bei Amplifikation RHD-spezifischer Sequenzen kann die HGH-Bande abgeschwächt sein oder fehlen. Weitere Angaben zu den verwendeten Primern sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

| Genbereich | Name | Nukleotidsequenz | Position ¹ | Orien- tierung | <i>RHD</i> - spezifisch | Produkt- länge |
|------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
| Promotor | re012 | tccactttccacctccctgc | -1137 bis -1119 | 5'-3' | ja | 255 bp |
| Promotor | re011d | gcagccaacttcccctgtg | -883 bis -901 | 3'-5' | ja | |
| Exon 4 | re41 | cgatacccagtttgtctgccatgc | 608 bis 631 | 5'-3' | nein | 226 bp |
| Intron 4 | rb12 ² | tcctgaacctgctctgtgaagtgc | 198 bis 175 | 3'-5' | ja | |
| Exon 7 | ga71 ³ | gttgtaaccgagtgctggggatt | 944 bis 967 | 5'-3' | nein | 123 bp |
| Exon 7 | ga72 ³ | tgccggctccgacggtatc | 1066 bis 1048 | 3'-5' | ja | |
| 3' UTR | rea7 | tgttgcctgcatttgtacgtgag | 1310 bis 1333 | 5'-3' | nein | 232 bp |
| 3' UTR | rr4 ² | agcttactggatgaccacca | 1541 bis 1522 | 3'-5' | ja | |
| HGH HGH | hgh1 ³ hgh2 ³ | tgccttccccaaccattccctta ccactcacggatttctgttgtgtttc | 665 bis 686 1098 bis 1073 | 5'-3' 3'-5' | | 434 bp |

Tabelle 2.3: Primer der molekularbiologischen Reihenuntersuchung

¹ Angaben zur Position erfolgten für alle im Promotorbereich sowie in Exons gelegenen Primer relativ zur Entfernung ihres ersten Nukleotids vom ATG-Startkodon, für alle in Intronbereichen gelegenen Primer vom Exon/Intron-Übergang.

² nach Wagner *et al.* [110]

³ nach Gassner *et al.* [47]

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden mit standardisierten Primerkonzentrationen durchgeführt. Pro Einzelansatz lagen die Primer für das *RHD*-Gen in einer Konzentration von $0,2 \mu$ M, die HGH-Kontrollprimer in einer Konzentration von $0,05 \mu$ M beziehungsweise $0,075 \mu$ M bei der Exon 10-Reaktion vor. Bei dem Intron 4/



Abbildung 2.1. Fotodokumentation eines Exon 7-PCR Ansatzes der molekularbiologischen Reihenuntersuchung. Hier wurden die Proben III-40 bis IV-29 auf *RHD*-spezifische Banden für den Bereich von Exon 7 (123 bp) untersucht. Als Kontrolle der PCR-Reaktion wurde ein Genstück des HGH-Gens (434 bp) amplifiziert. In Bande A wurde für jede Kammreihe eine RhD-positive Kontrollprobe aufgetragen. Die Proben der Auftragestellen B1, C1 und D1 zeigten zwar *RHD*-spezifische Banden, zählten aber nicht zu den für die Untersuchungen gesammelten Proben, sondern waren Kontrollen. *RHD*-spezifische Banden lieferten außerdem die Proben III-59 an der Auftragestelle D4, Probe III-72 an der Auftragestelle G5 und Probe III-86 an der Auftragestelle E7. Diese Proben wurden in der Abbildung markiert. An der Auftragstelle A11 zeigte sich sehr wahrscheinlich aufgrund eines technischen Problems weder eine *RHD*-spezifische Bande, noch die HGH-Kontrollbande (wurde wiederholt).



Abbildung 2.2. Fotodokumentation eines Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR Ansatzes der molekularbiologischen Reihenuntersuchung. Hier wurden die Proben IV-34 bis IV-85 auf *RHD*-spezifische Banden für die Bereiche Intron 4 (226 bp) und Exon 7 (123 bp) untersucht. Als Kontrolle der PCR-Reaktion wurde ein Bereich des HGH-Gens (434 bp) amplifiziert. In Bande A wurde für jede Kammreihe eine RhD-positive Kontrollprobe aufgetragen. *RHD*-spezifische Banden lieferte in diesem Beispiel die Probe IV-66 an der Auftragestelle B9, sie wurde in der Abbildung markiert. Ebenfalls markiert wurden Proben die schwache, aber dennoch erkennbare Banden für das HGH-Gen zeigten. Dies waren die Proben IV-35 (Auftragestelle C1) und IV-58 (Auftragestelle H5). Exon 7-Multiplexansatz lagen die *RHD*-Primer re41 und rb12 (Intron 4) in einer Konzentration von 0,1 μ M vor.

Die PCR-Reaktion wurde pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Enthalten waren 1 µl DNA-Lösung, 0,2 µl Glycerin, 0,1 µl Cresolrotlösung (10 mg/ml Cresolrot), 1 µl PCR Puffer 10x (Qiagen, Hilden, Deutschland), 0,1 µl dNTP-Mix (entsprechend jeweils 200 µM der einzelnen dNTPs pro Ansatz), 4 Einheiten (units) Tag DNA Polymerase (Qiagen) und pro Ansatz eine entsprechende Restmenge H₂O. Alle Reaktionen wurden unter identischen PCR-Bedingungen, wie von Gassner et al. beschrieben [47], auf dem Programmable Thermal Controller PTC-100[™] (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) durchgeführt. Initial erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 94°C über 2 Minuten, gefolgt von 10 Zyklen mit 10 Sekunden bei 94°C und 1 Minute bei 65°C, daran anschließend 20 Zyklen mit 30 Sekunden bei 94°C, 1 Minute bei 61°C und 30 Sekunden bei 72°C. Die PCR-Fragmente wurden elektrophoretisch auf dem MICRO SSP Gel System (One Lambda, Canoga Park, Kanada) getrennt. Das verwendete Gel enthielt 2,5% Agarose (Seakem LE; FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) in 50 ml 1x Tris-Borat-EDTA Puffer und 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml; Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die so markierten PCR-Produkte wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotodokumentiert (Abb. 2.1 und 2.2).

2.6 "Exon-Screening"

Alle Proben, die bei der molekularbiologische Reihenuntersuchung Banden, die für das *RHD*-Gen spezifisch sind, erbrachten, wurden zusätzlich in den Bereichen Exon 3, 4, 5, 6, 7, 9 sowie Intron 7 des *RHD*-Gens untersucht. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls das 434 bp Genfragment des HGH-Gens amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Ein Großteil der Primer wurde zwar schon in der Literatur beschrieben, jedoch wurden alle Primerkombinationen und die Konzentrationen der Einzelkomponenten im Zuge dieser Arbeit durch systematische PCR-Ansätze mit RhD-positiven Kontrollproben sowie mit titrierten DNA-Proben verifiziert und auf die festgelegten Reaktionsbedingungen adaptiert. Es wurden standardisierte Primerkonzentrationen von 0,2 µM für die *RHD*-spezifischen Primer eingesetzt, mit Ausnahme der Exon 6 Reaktion mit 0,1 µM, sowie den Reaktionen für Intron 7 und Exon 9 mit jeweils 0,4 µM. Die HGH-Primer lagen in

| Genbereich | Name | Nukleotidsequenz | Position ¹ | Orien- tierung | <i>RHD</i> - spezifisch | Produkt- länge |
|-----------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
| Exon 3 | ga31 ³ | ttgtcggtgctgatctcagtgga | 361 bis 383 | 5'-3' | ja | 154 bp |
| Intron 3 | rb21 ² | aggtccctcctccagcac | 28 bis 11 | 3'-5' | nein | |
| Exon 4 | ga41 ³ | acatgatgcacatctacgtgttcgc | 503 bis 527 | 5'-3' | nein | 123 bp |
| Exon 4 | ga42 ³ | cagacaaactgggtatcgttgctg | 625 bis 602 | 3'-5' | ja | |
| Intron 4 | rb24 ² | agacctttggagcaggagtg | -53 bis -34 | 5'-3' | nein | 228 bp |
| Intron 4/Exon 5 | ga51 ³ | ctgctcaccttgctgatcttccc | 8 bis 787 | 3'-5' | ja | |
| Exon 6 | ga62 ³ | ttatgtgcacagtgcggtgttgg | 804 bis 826 | 5'-3' | nein | 133 bp |
| Exon 6 | ga61 ³ | caggtacttggctcccccgac | 936 bis 916 | 3'-5' | ja | |
| Intron 6 | rb26 ² | aggggtgggtagggaatatg | -62 bis -43 | 5'-3' | nein | 130 bp |
| Exon 7 | re71 ² | acccagcaagctgaagttgtagcc | 1008 bis 985 | 3'-5' | ja | |
| Intron 7 | rb52 ² | ccaggttgttaagcattgctgtacc | 51110 bis 51134 | 5'-3' | ja | 169 bp |
| Intron 7 | rb51 | gcatgacgtgttctgcctcttg | 51278 bis 51257 | 3'-5' | ja | |
| Intron 8 | re83 ² | gagattaaaaatcctgtgctcca | -56 bis -34 | 5'-3' | nein | 119 bp |
| Exon 9 | re94 | cttggtcatcaaaatatttagcct | 1216 bis 1193 | 3'-5' | ja | |
| HGH HGH | hgh1 ³ hgh2 ³ | tgccttccccaaccattccctta ccactcacggatttctgttgtgtttc | 665 bis 686 1098 bis 1073 | 5'-3' 3'-5' | | 434 bp |

Tabelle 2.4: Primer des "Exon-Screenings"

¹ Angaben zur Position erfolgten für alle im Promotorbereich sowie in Exons gelegenen Primer relativ zur Entfernung ihres ersten Nukleotids vom ATG-Startkodon, für alle in Intronbereichen gelegenen Primer vom Exon/Intron-Übergang. Für die Position der Primer im Intron 7 und Intron 8 wurde die *RHCE*-Sequenz zugrundegelegt.

² nach Wagner *et al.* [110]

³ nach Gassner *et al.* [47]

einer Konzentration von 0,1 μ M bei der Intron 7 Reaktion, 0,15 μ M bei den Reaktionen für Exon 3, 4, 7 und 9 und 0,2 μ M bei den Reaktionen für Exon 5 und 6 vor.

Die Ansätze der Einzelreaktionen sowie die PCR-Bedingungen entsprachen denen der molekularbiologischen Reihenuntersuchung. Als Ausnahme waren zusätzlich pro Ansatz bei der Exon 6 Reaktion 2 µl Q-solution 5x (Qiagen) und bei der Intron 7 Reaktion 1 µl einer 25 mM Magnesiumchloridlösung (MgCl₂-solution; Qiagen) enthalten.

2.7 Nukleotid-Sequenzierung aller zehn RHD-Exons aus genomischer DNA

Bei den Proben, die in sämtlichen, im "Exon-Screening" untersuchten Bereichen *RHD*-spezifische Banden aufwiesen, wurden alle zehn Exons des *RHD*-Gens mit bereits etablierten Methoden vollständig sequenziert. Wurde bei einer Probe eine Mutation festgestellt, die bereits von einer anderen, schon in allen Exons sequenzierten Probe bekannt war, wurde auf die vollständige Sequenzierung der restlichen Exons verzichtet. Es erfolgte eine initiale Amplifikation des zu untersuchenden Exonbereiches (Periexon-PCR), gefolgt von einem DNA-Reinigungsschritt. Anschließend wurde die PCR zur genomischen Sequenzierung durchgeführt und die erhaltenen Amplifikate als Vorbereitung für die Sequenzanalyse gereinigt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.5 dargestellt. Sie lagen sowohl bei der Periexon-PCR als auch bei der Sequenzierreaktion in einer Konzentration von 0,5 µM vor. Die Primerkombinationen für die genomische Sequenzierung sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Alle PCR-Reaktionen wurden auf dem Programmable Thermal Controller PTC-100 durchgeführt. Die Periexon-PCR wurde pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Enthalten waren 1 µl DNA-Lösung, 5 µl PCR Puffer 10x (Qiagen), 0,5 µl dNTP-Mix (entsprechend jeweils 200 µM der einzelnen dNTPs pro Ansatz), 1,75 Einheiten ("units") High Fidelity Tag DNA Polymerase (Expand High Fidelity Taq; Boehringer Mannheim) und 42 µl H₂O. Die PCR-Bedingungen der Periexon-PCR waren für Exon 1 und Exon 3-10 identisch. Initial erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 92°C über 2 Minuten, gefolgt von 10 Zyklen mit 20 Sekunden bei 92°C, 30 Sekunden bei 60°C und 10 Minuten bei 68°C. Es folgten daran anschließend 35 Zyklen mit 20 Sekunden bei 92°C, 30 Sekunden bei 60°C und 10 Minuten 20 Sekunden bei 68°C. Der letzte Schritt bei 68°C verlängerte sich pro Zyklus um 20 Sekunden. Abschließend wurde für 10 Minuten auf 72°C erhitzt. Die Bedingungen der Periexon-PCR für Exon 2 waren ebenfalls ein initialer Denaturierungsschritt bei 92°C über 2 Minuten, danach 35 Zyklen mit 20 Sekunden bei 92°C, 30 Sekunden bei 65°C und 1 Minute 30 Sekunden bei 68°C. Als letzter Schritt wurde für 10 Minuten auf 72°C erhitzt. Von den erhaltenen Amplifikaten wurden jeweils 5µl als Erfolgskontrolle der PCR auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und fotodokumentiert. Bei erfolgreicher Amplifikation des entsprechenden Genabschnittes zeigte sich eine einzelne Bande. Die zugehörigen Proben wurden daraufhin mit einem PCR-Reinigungskit (QIAquick PCR Purification Kits; Qiagen) gemäß Anleitung des Herstellers aufbereitet.

| | | | 2 | Orien- | RHD- |
|--------|----------------------------|------------|-----------------------|---------|------------|
| Name | Nukleotidsequenz | Genbereich | Position ² | tierung | spezifisch |
| ra21 | ataccacttgacttgggact | Intron 2 | 2823 bis 2842 | 5'-3' | nein |
| rb11 | tacctttgaattaagcacttcacag | Intron 4 | 161 bis 185 | 5'-3' | ja |
| rb12 | tcctgaacctgctctgtgaagtgc | Intron 4 | 198 bis 175 | 3'-5' | ja |
| rb20d | tcctggctctccctctct | Intron 2 | -25 bis -8 | 5'-3' | ja |
| rb21d | cccaggtccctcctcccagcac | Intron 3 | 32 bis 11 | 3'-5' | nein |
| rb25 | agcagggaggatgttacag | Intron 5 | -111 bis -93 | 5'-3' | nein |
| rb44 | gcttgaaatagaagggaaatgggagg | Intron 7 | ≈ 3000 | 3'-5' | nein |
| rb46 | tggcaagaacctggaccttgacttt | Intron 3 | -1279 bis -1255 | 5'-3' | nein |
| rb52 | ccaggttgttaagcattgctgtacc | Intron 7 | 51110 bis 51134 | 5'-3' | ja |
| re01 | atagagaggccagcacaa | Promotor | -149 bis -132 | 5'-3' | ja |
| re012 | tccactttccacctccctgc | Promotor | -1137 bis -1119 | 5'-3' | ja |
| re11d | agaagatgggggaatctttttcct | Intron 1 | 129 bis 106 | 3'-5' | nein |
| re12d | attagccgggcacggtggca | Intron 1 | -1188 bis -1168 | 5'-3' | ja |
| re13 | actctaatttcataccaccc | Intron 1 | -72 bis -53 | 5'-3' | nein |
| re23 | aaaggatgcaggaggaatgtaggc | Intron 2 | 251 bis 227 | 3'-5' | nein |
| re31 | tgatgaccatcctcaggt | Exon 3 | 472 bis 455 | 3'-5' | ja |
| re615 | gtaactcatagtgtggtccgtag | Intron 6 | -281 bis -258 | 5'-3' | nein |
| re621 | catcccctttggtggcc | Intron 6 | -102 bis -85 | 5'-3' | ja |
| re71 | acccagcaagctgaagttgtagcc | Exon 7 | 1008 bis 985 | 3'-5' | ja |
| re73 | cctttttgtccctgatgacc | Intron 7 | -67 bis -48 | 5'-3' | nein |
| re75 | aaggtaggggctggacag | Intron 7 | ≈ 120 | 3'-5' | ja |
| re83 | gagattaaaaatcctgtgctcca | Intron 8 | -56 bis -34 | 5'-3' | nein |
| re91 | caagagatcaagccaaaatcagt | Intron 9 | ≈ -40 | 5'-3' | nein |
| re93 | cacccgcatgtcagactatttggc | Intron 9 | ≈ 300 | 3'-5' | nein |
| rez2 | ccttggtctgccagaattttca | 3' UTR | 2738 - 2717 | 3'-5' | ja |
| rf51 | caaaaacccattcttcccg | Intron 5 | -332 bis -314 | 5'-3' | nein |
| rh2n ³ | agaagggatcaggtgacacg | Exon 6 | 870 bis 851 | 3'-5' | nein |
| rr4 | agcttactggatgaccacca | 3' UTR | 1541 bis 1522 | 3'-5' | ja |

¹ nach Wagner *et al.* [110,111]

³ beschrieben als "R870 antisense" von Beckers *et al.* [12].

Die Sequenzier-Reaktion wurde pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 8 µl durchgeführt. Enthalten waren 4,5 µl gereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl PCR Puffer 10x (Qiagen), 1 µl BigDye Mix (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits; PE Applied Biosystems) und 1,5 µl H₂O. Die PCR-Bedingungen der Sequenzier-PCR waren 25 Zyklen mit 15 Sekunden bei 94°C, 15 Sekunden bei 58°C und 4 Minuten bei 60°C. Die erhaltenen Amplifikate wurden anschließend wie folgt gereinigt: 8 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl H₂O, 1 µl Natriumacetat und 25 µl Ethanol (100%) per Vortexer gemischt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Es folgten 30 Minuten Zentrifugation bei 14.000 upm, danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 125 µl Ethanol (70%) versetzt. Erneute Zentrifugation für 10 Minuten, danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet

² Angaben zur Position erfolgten für alle im Promotorbereich sowie in Exons gelegenen Primer relativ zur Entfernung ihres ersten Nukleotids vom ATG-Startkodon, für alle in Intronbereichen gelegenen Primer vom Exon/Intron-Übergang. Für die Position der Primer im Intron 7 und Intron 8 wurde die *RHCE*-Sequenz zugrundegelegt.

im Trockenschrank 30 Minuten getrocknet. Die Proben wurden daraufhin tiefgekühlt bei -20°C bis zur Sequenzanalyse gelagert.

| | Periexon-PCR | | Sequenzierreaktion | | |
|----------|--------------|-------------|--------------------|--------|----------------|
| | Primer | | | | |
| RHD Exon | "sense" | "antisense" | RHD-spezifisch | Primer | RHD-spezifisch |
| Exon 1 | re012 | re11d | ја | re01 | ja |
| Exon 2 | re12d | re23 | ja | re13 | nein |
| Exon 3 | ra21 | rb21d | nein | re31 | ja |
| | | | | rb20d | ja |
| Exon 4 | rb46 | rh2n | nein | rb12 | ja |
| Exon 5 | rb46 | rh2n | nein | rb11 | ja |
| Exon 6 | rf51 | re71 | ja | rb25 | nein |
| Exon 7 | re615 | rb44 | nein | re621 | ja |
| Exon 8 | rb52 | re93 | ja | re73 | nein |
| Exon 9 | rb52 | re93 | ja | re83 | nein |
| Exon 10 | re91 | rez2 | ja | rr4 | ja |

Tabelle 2.6: PCR-Schema zur genomischen Sequenzierung¹

¹ Methode in Anlehnung an Wagner *et al.* [110].

Die Sequenzanalysen erfolgten auf dem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) und wurden von Mitarbeiterinnen der Abteilung Serologie des Instituts Ulm, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg durchgeführt. Die tiefgekühlten Proben wurden hierzu mit einer Pufferlösung im Verhältnis 5:1 aus deionisiertem Formamid und 25 mM EDTA (pH 8.0) mit Dextran Blau (50 mg/ml) resuspendiert und zur elektrophoretischen Trennung auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.8 Serologische Aufarbeitung

Von jedem der mit den molekularbiologischen Untersuchungsmethoden gefundenen Typen wurde jeweils eine vollständig molekular charakterisierte Probe repräsentativ mit sehr sensitiven Methoden auf eventuell vorhandene Antigen D-Expression untersucht. Dies erfolgte zum Ausschluß qualitativ oder quantitativ veränderter Varianten des Antigen D (siehe 1.6), die möglicherweise in der serologischen RhD-Phänotypisierung nicht erkannt wurden.

Ein Milliliter EDTA-antikoaguliertes Blut wurde in Immusol (Baxter) dreimal gewaschen (suspendiert, eine Minute bei 5.000 upm zentrifugiert, Überstand abgesaugt). Danach wurden 10 µl Erythrozyten aus dem Sediment mit 1.000 µl ID-Diluent 2 (DiaMed) verdünnt. Jeweils 50 µl dieser Erythrozytensuspension wurden mit 25 µl Antikörperlösung im ID-Gel (LISS-Coombs 37°C, DiaMed-ID Micro Typing System; DiaMed) laut Anweisung des Herstellers untersucht. Es erfolgte zunächst eine Kontrolle der Blutgruppe und der Rhesusformel mit Anti-B, Anti-A und Anti-c (Seraclone; Biotest), Anti-C und Anti-e (Immucor, Rödermark, Deutschland), Anti-E (Ortho Diagnostic Systems). Der direkte Coombs-Test wurde mit einem Rhesus-Kontrollserum (Kontroll-Rh; Biotest) durchgeführt. Zusätzlich wurde mit oligoklonal polyspezifischen (Seraclone Anti-D Blend; Biotest) und monoklonalen (Seraclone Anti-D (BS226); Biotest. Frekaclone Anti-D II (MS201); Gull, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland) Anti-D Antiseren im ID-Gel untersucht.

Um mögliche D_{el}-Varianten zu erkennen, wurde jede der für die einzelnen Gruppen repräsentativen Proben von Mitarbeiterinnen der Abteilung Serologie mit einem Adsorption-Elution-Verfahren in Chloroformtechnik untersucht.

Hierbei wurden von der zu untersuchenden Probe, sowie als Referenzproben von einer Weak D Typ 2 als Positivkontrolle und einer RhD-negativen Probe (0 Rh neg, ccddee) als Negativkontrolle nach dreimaligem Waschen in Immusol jeweils 500 µl Erythrozytensediment mit 500 µl polyklonalem Anti-D Serum (Human incomplete; Lorne Laboratories, Reading, Großbritannien) bei 37°C für eine Stunde inkubiert (Adsorption). Anschließend wurden die Proben zur Beseitigung freier, nicht gebundener Antikörper achtmal in Immusol gewaschen. Ein Volumenteil des erhaltenen Erythrozytensedimentes wurde mit einem Volumenteil Immusol in einem Glasröhrchen gemischt. Daraufhin erfolgte die Elution durch Zugabe zweier Volumenteile Chloroform. Durch kräftiges Schütteln für zehn Sekunden und vorsichtiges Schwenken des Gefäßes für eine Minute wurden die Komponenten gemischt und anschließend exakt fünf Minuten bei 56°C inkubiert. An der Gefäßwand adhärentes Material wurde mit einem Holzspatel entfernt und danach das Gefäß bei 3.500 upm für zehn Minuten zentrifugiert. Der wäßrige Überstand, in

dem bei vorhandener Antigen D-Expression die zunächst adsorbierten und anschließend eluierten Antikörper vorliegen, wurde im ID-Gel sowie im Capture-R Ready-ID (Immucor, Norcross, Georgia, USA) mit der Erythrozyten-ID-Diluent 2-Suspension einer RhD-positiven Standardsuchzelle (DiaMed Suchzelle II, ccD.EE; DiaMed) untersucht.

Zeigte sich eine positive Reaktion in einem der oben beschriebenen Verfahren, wurde die entsprechende Probe zum Ausschluß eines Partial D-Phänotyps mit einem kommerziellen Identifikationskit für Kategorie D (D-Screen; Diagast, Jülich, Deutschland) im ID-Gel untersucht. Der Kit besteht aus 9 monoklonalen Anti-D Testreagenzien, die gegen verschiedene Epitope des Antigen D gerichtet sind. Damit kann laut Hersteller eine Unterscheidung der Partial D-Phänotypen II, III, IVa, IVb, Va, VI, VII und DFR erfolgen. Zusätzlich wurde in diesen Fällen mit einem insbesondere für D-Kategorie VI sehr sensitiven monoklonalen Anti-D Antiserum (H41 11 B7, IgG; Biotest) im ID-Gel untersucht.

2.9 Untersuchung von Sonderproben

2.9.1 Blutproben des Instituts Baden-Baden

Es wurden im Zeitraum vom 27.02.1998 bis 30.09.1998 (Tag der Blutspende) 21 Blutproben mit seltener Rhesusformel (Tab. 2.7) aus dem Einzugsbereich des Instituts Baden-Baden des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg

| Tabelle2.7:Sonderprobendes InstitutsBaden-Baden | | | |
|-------------------------------------------------|--------|-----------------------|--|
| Phänotyp | Anzahl | Frequenz ¹ | |
| CCddee | 11 | 0,012 % | |

| CCadee | 11 | 0,012 % |
|--------|----|-----------|
| CcddEe | 7 | 0,014 % |
| ccddEE | 2 | 0,0021 % |
| CcddEE | 1 | 0,00016 % |
| gesamt | 21 | |

¹ Angabe der Frequenz für die Bevölkerung Baden-Württembergs [107]. gesammelt und DNA daraus extrahiert. Entsprechend dem Versuchsaufbau wurden auch diese Proben der molekularbiologischen Reihenuntersuchung unterzogen und bei *RHD*spezifischen Banden zusätzlich mit der "Exon-Screening"-Methode untersucht. Anhand des Bandenmusters erfolgte eine Zuordnung zu bereits identifizierten Gruppen. Zeigte eine Probe ein bisher noch nicht gefundenes Bandenmuster, schloß sich eine serologische Aufarbeitung wie beschrieben an. Bei Proben die in allen untersuchten Bereichen Banden,

die für das RHD-Gen spezifisch sind, zeigten, wurden entweder ebenfalls alle zehn

Exons des *RHD*-Gens vollständig sequenziert oder zumindest soweit, bis eine bereits bekannte Mutation gefunden wurde.

2.9.2 Blutproben des Instituts Ulm

Außerhalb des Zeitraums für die Probensammlung (siehe 2.3) wurden zusätzlich acht Proben mit seltener Rhesusformel (6 x CCddee; 2 x ccddEE) aus dem Einzugsbereich des Instituts UIm des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg gesammelt. Mit diesen Proben wurde analog zu den Sonderproben des Instituts Baden-Baden (siehe 2.9.1) verfahren.

2.9.3 DNA-Proben des SCARF-Programms

Der SCARF Exchange (Serum, Cells And Rare Fluids) ist ein Programm für den internationalen Austausch seltener Blutproben, seltener Antikörper und anderer serologisch wertvoller Substanzen unter den einzelnen Mitgliedern (siehe SCARF "homepage": http://scarf.uth.tmc.edu). Aus diesem Programm wurden vier DNA-Proben mit seltenem Rhesusphänotyp (Tab. 2.8) zum Vergleich der erhaltenen Ergebnisse aus der Bevölkerung Süddeutschlands mit möglichen Allelen in anderen Populationen der molekularbiologischen Reihenuntersuchung unterzogen. Wurden *RHD*-spezifische Banden mit der "Exon-Screening"-Methode erhalten, so wurde die entsprechende Probe weiter molekular charakterisiert. Da lediglich DNA-Proben jedoch keine Erythrozyten verfügbar waren, konnte keine serologische Aufarbeitung erfolgen. Die Angaben zum Phänotyp wurden vom SCARF Exchange übernommen. Die Probe 95-009 stellt durch ihren RhD-negativen Phänotyp bei positivem Antigen

Tabelle 2.8: SCARF-Proben

| | Phänotyp | | |
|--------|--------------------------|--------|--|
| Probe | Wiener | Fisher | |
| 94-009 | r''r'' | ccddEE | |
| 94-023 | r _y r | CcddEe | |
| 95-009 | r ^G r ccddee, | | |
| | | G pos | |
| 96-001 | r''r'' | ccddEE | |

G eine äußerst seltene Konstellation dar. Von Smythe *et al.* [96] wurde gezeigt, daß das *RHD*-Gen sowohl für das Antigen D als auch für das Antigen G kodiert. Mouro *et al.* [76] beschrieben einen r^Gr-Phänotyp, bei dem sehr wahrscheinlich der Bereich um Exon 2 des *RHD*-Gens durch einen segmentalen DNA-Austausch zwischen dem *ce*-Allel des *RHCE*-Gens und dem *RHD*-Gen vorhanden und Grund für die Antigen G-Expression war.
2.9.4 DNA-Proben aus Taiwan

Um die Stabilität der verwendeten PCR-Methoden in bezug auf D_{el}-Varianten zu überprüfen, wurden vom Department of Clinical Pathology am Chang Gung Memorial Hospital, Lin-Kou Medical Center, Taiwpi, Taiwan, DNA-Proben von acht D_{el}-Varianten sowie von zwei RhD-negativen Proben, bei denen der Bereich 3' UTR des *RHD*-Gens vorhanden zu sein schien, aus der Bevölkerung Taiwans zur Verfügung gestellt (siehe Tab. 2.9). Die Proben waren Teil der Untersuchungen von

| Tabelle 2.9: Taiwar | 1-Proben |
|---------------------|----------|
|---------------------|----------|

| Probe | CE- Genotyp | Adsorption- Elution |
|-------|----------------|------------------------|
| Rh199 | CCee | positiv |
| Rh204 | CCee | positiv |
| Rh208 | CCee | positiv |
| Rh214 | Ccee | positiv |
| Rh215 | CCee | positiv |
| Rh217 | Ccee | positiv |
| Rh218 | Ccee | positiv |
| Rh219 | Ccee | positiv |
| Rh233 | Ccee | negativ |
| Rh267 | Ccee | negativ |

Sun et al. [100]. Analog zu den DNA-Proben des SCARF-Programms wurden auch diese Proben der molekularbiologischen Reihenuntersuchung unterzogen, sowie bei RHD-positiven Banden mit dem "Exon-Screening" weiter charakterisiert. Da eine Deletion im Bereich zwischen Intron 8 und Intron 9 des RHD-Gens von Chang et al. [27] als Ursache für D_{el}-Varianten in dieser Population beschrieben wurde, war es von Interesse, ob diese Deletion des Bereichs um Exon 9 des RHD-Gens mit der "Exon-Screening"-Methode erkannt werden könnte. Da ebenfalls keine Erythrozyten für eine serologische Aufarbeitung vorlagen, wurden die

Angaben zum Phänotyp sowie den Adsorption-Elution-Verfahren vom Department of Clinical Pathology übernommen.

2.9.5 CdE-Haplotyp

Dem Institut Ulm wurde im Zeitraum der Untersuchungen Blut einer RhDnegativen Mutter und ihres RhD-negativen Neugeborenen zur Abklärung einer fraglichen Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind zugeschickt. Da sowohl bei der Mutter als auch beim Kind die Rhesusformel CcddEe festgestellt wurde, war es statistisch sehr wahrscheinlich, daß hier der äußerst seltene Rhesus-Haplotyp CdE (Haplotypfrequenz <0,0001 bezogen auf die Bevölkerung Baden-Württembergs [107]) vorlag. Die Blutprobe der Mutter wurde analog zu den Untersuchungen von Sonderproben (siehe 2.9.1) behandelt.

2.10 Statistische Analyse

Die Angaben zur Häufigkeit der gefundenen Typen und Allele sind bezogen auf die Anzahl der insgesamt untersuchten Proben des jeweiligen Phänotyps. Die Häufigkeit der einzelnen Typen oder Allele errechnete sich aus Formel 1.1.

Formel 1.1:

Anzahl der Proben eines Typs/Allels Gesamtzahl aller Proben des zugehörigen Phänotyps = beobachtete Häufigkeit

Der 95%-Vertrauensbereich wurde unter der Annahme einer Poisson-Verteilung für seltene Ereignisse berechnet [89]. Die Rohdaten für die Berechnung der Grenzwerte wurden aus der Tabelle 80 [89] für die jeweilige gefundene Probenzahl (x) eines Typs/Allels entnommen. Die angegebenen Grenzen errechneten sich aus den entnommenen Werten für den unteren/oberen Grenzwert dividiert durch die Anzahl aller untersuchten Proben des zugehörigen Phänotyps.

Alle Frequenzabschätzungen erfolgten unter Berücksichtigung der Daten von Wagner *et al.* [107] für die Bevölkerung Baden-Württembergs. Die Phänotypfrequenz eines Typs/Allels errechnete sich mit diesen Daten aus Anzahl der von Wagner *et al.* beobachteten Proben des jeweiligen Phänotyps und der Gesamtzahl aller von ihnen untersuchten Proben (n=624.163) sowie der von uns beobachteten Häufigkeit (Formel 1.1) gemäß Formel 1.2.

Formel 1.2:

Anzahl der beobachteten Proben eines Phänotyps Gesamtzahl aller untersuchter Proben (n=624.163) x beobachtete Häufigkeit

= Phänotypfrequenz des Typs/Allels

Die Haplotypfrequenz für einen Typ oder ein Allel errechnete sich aus den von Wagner *et al.* angegebenen Frequenzen der einzelnen Haplotypen sowie der von uns gefundenen Anzahl von Haplotypallelen eines Typs/Allels und der Gesamtzahl aller von uns untersuchten zugehörigen Haplotypallele nach Formel 1.3.

Formel 1.3:

Haplotypfrequenz x Anzahl der Haplotypallele eines Typs/Allels Gesamtzahl der untersuchten Haplotypallele

= Haplotypfrequenz des Typs/Allels

Aus einzelnen Haplotypfrequenzen wurde eine Phänotypfrequenz bezogen auf die Gesamtbevölkerung nach Formel 1.4 berechnet. Insbesondere für die Berechnung der populationsbezogenen Phänotypfrequenzen wurden die von uns beobachtete Haplotypfrequenz eines Typs/Allels (Formel 1.3) sowie die von Wagner *et al.* bestimmten Frequenzen der Haplotypen verwendet, die in Kombination zu einem RhD-negativen Phänotyp führten. Die errechneten Frequenzen für RhDnegative Phänotypen, die den/das entsprechende/n Typ/Allel aufweisen, wurden addiert und bildeten die zu erwartende Frequenz, mit der der/das zugrundeliegende Typ/Allel innerhalb der Bevölkerung Süddeutschlands unter RhD-negativen Proben zu finden ist.

Formel 1.4:

Frequenz_{erster Haplotyp} x Frequenz_{zweiter Haplotyp} x $2 = Frequenz_{Phänotyp}$

Frequenzangaben für Untergruppen aus der Gesamtbevölkerung, zum Beispiel für RhD-negative Proben oder Proben des Phänotyps ccddee und andere, wurden anhand der berechneten Phänotypfrequenz für die Gesamtbevölkerung (Formel 1.4) sowie den Frequenzangaben von Wagner *et al.* für die betreffende Untergruppe für die Bevölkerung Süddeutschlands nach Formel 1.5 berechnet.

39

Formel 1.5:

 $\frac{100\%}{\text{Frequenz der Untergruppe in \%}} \text{ x Frequenz}_{\text{Phänotyp}} = \text{Frequenz der Untergruppe}$

3. ERGEBNISSE

3.1 Auffällige Proben der molekularbiologischen Reihenuntersuchung

In der Gruppe der 725 RhD-negativen Proben mit Antigen C- und/oder E-

| Tabelle | 3.1: | Molekularbiologische | Reihenunter- |
|---------|------|----------------------|--------------|
| suchung | g | | |

| | | untersucht | e Bereich | e des <i>RHI</i> | D-Genlocus |
|--------|----------|------------|-----------|------------------|------------|
| Anzahl | Phänotyp | Promotor | Intron 4 | Exon 7 | 3'UTR |
| 20 | Ccddee | + | + | + | + |
| 3 | CCddee | + | + | + | + |
| 1 | ccddEe | + | + | + | + |
| 1 | CcddEe | + | - | + | + |
| 1 | ccddEe | + | - | + | + |
| 13 | Ccddee | + | - | - | + |
| 3 | ccddEe | + | - | - | + |
| 1 | Ccddee | - | - | - | + |
| 399 | Ccddee | - | - | - | - |
| 4 | CCddee | - | - | - | - |
| 11 | CcddEe | - | - | - | - |
| 266 | ccddEe | - | - | - | - |
| 2 | ccddEE | - | - | - | - |
| 314 | ccddce | - | - | - | - |
| 1.039 | gesamt | | | | |

+ *RHD*-spezifische Bande nachgewiesen.

keine *RHD*-spezifische Bande nachgewiesen.

positivem Phänotyp konnten mittels der molekularbiologischen Reihenuntersuchung 43 Proben identifiziert werden, die in einem oder in mehreren der untersuchten Bereiche für das RHD-Gen spezifische Banden erbrachten (Tab. 3.1). In der Vergleichsgruppe der 314 Proben mit ccddee-Phänotyp konnten bei keiner der untersuchten Proben RHDspezifische Banden beobachtet werden. Somit standen von insgesamt 1.039 gesammelten Proben 43 für eine genauere Charakterisierung mittels der "Exon-Screening"-Methode zur Verfügung.

3.2 Im "Exon-Screening" identifizierte Typen

Mit Hilfe der "Exon-Screening"-Methode konnten die 43 auffälligen Proben in sieben Typen eingeteilt werden, die jeweils unterschiedliche PCR-Muster lieferten (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.1, Typ 1-7). Die einzelnen Frequenzen wurden wie in Kapitel 2.10 beschrieben kalkuliert (siehe Tab. 3.3).

Der häufigste Typ mit 21 Proben (20 Ccddee, 1 ccddEe) war der Typ 7, der in allen untersuchten Bereichen für das *RHD*-Gen spezifische Banden zeigte. Um mögliche molekulare Ursachen für die fehlende oder zumindest stark reduzierte RhD-Express-

| | | _ | untersuchte Bereiche des RHD-Genlocus ¹ | | | | | | | | | | |
|---------------------|---------|-----------------------|----------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| PCR-Muster | Anzahl | Phänotyp ² | Prom | Ex3 | Ex4 | In4 | Ex5 | Ex6 | Ex7 | ln7 | Ex9 | 3'UTR | |
| Тур 1 | 1 | Ccddee | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| Тур 2 | 9 | Ccddee | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | |
| Тур З | 4 | Ccddee | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | |
| Тур 4 | 3 | ccddEe | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | |
| Тур 5а | 1 | CcddEe | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | |
| Typ 5b ³ | 1 | ccddEe | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | |
| Тур 6 | 3 | CCddee | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | |
| Typ 7 ⁴ | 20 1 | Ccddee ccddEe | + + | + + | + + | + + | + + | + + | + + | + + | + + | + + | |

Tabelle 3.2: PCR-Ergebnisse des "Exon-Screenings"

¹ Prom – Promotor; Ex – Exon; In – Intron.

² Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

³ Entspricht einer klassischen D-Kategorie VI Typ I [8;53], tatsächlicher Phänotyp cc(D).Ee.

⁴ Weitere Analyse siehe Tabelle 3.4.

ion zu finden, wurden die Proben dieses PCR-Musters, wie im Kapitel 2.7 beschrieben, einer Sequenzanalyse aller zehn Exons des *RHD*-Gens unterzogen.

Der zweithäufigste Typ mit neun Proben (Ccddee) war der Typ 2. Er zeigte *RHD*-spezifische Banden im Promotorbereich und dem in 3' Richtung gelegenen, nicht-translatierten Bereich von Exon 10 (3'UTR). Mit vier Proben (Ccddee) war der Typ 3 der dritthäufigste der gefundenen Typen. Diese Proben erbrachten *RHD*-spezifische Banden im Promotorbereich, im Exon 9 sowie in 3'UTR von Exon 10. Jeweils drei Proben zeigten ein PCR-Muster des Typs 4 (ccddEe) und des Typs 6 (CCddee). Bei Typ 4 zeigten sich *RHD*-spezifische Banden im Promotorbereich, im Exon 3 und 9 sowie in 3'UTR. Der Typ 6 erbrachte ein PCR-Muster mit *RHD*-spezifischen Banden in allen untersuchten Bereichen mit Ausnahme von Intron 7 und Exon 9. Alle in der molekularbiologischen Reihenuntersuchung gefundenen Proben dieses Typs stammten von blutsverwandten Personen aus einer Familie. Der Phänotyp CCddee machte eine Abschätzung, ob beide Allele homozygot oder heterozygot für die gefundene Veränderung sind, unmöglich. Bei der statistischen Auswertung wurde daher sowohl eine minimale Abschätzung der Haplotypfrequenz unter der Annahme der Heterozygotie für dieses Allel, als auch eine maximale

| | | | | | | Frequenz | | | | | | | | | |
|---------------------|---------|----------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| PCR- Muster | Anzahl | n ¹ | Phänotyp ² | wahrscheinlicher Haplotyp | beobachtete Häufigkeit ³ | 95% Vertrauensbereich ⁴ | Phänotyp- frequenz (%) | Abschätzung der Haplotypfrequenz ⁵ | | | | | | | |
| Тур 1 | 1 | 433 | Ccddee | Cde | 0,0023 | 0,00012-0,01229 | 0,0019 | 1:41.727 | | | | | | | |
| Тур 2 | 9 | 433 | Ccddee | Cde | 0,0208 | 0,0103-0,03873 | 0,017 | 1:4.636 | | | | | | | |
| Тур З | 4 | 433 | Ccddee | Cde | 0,0092 | 0,00315-0,02217 | 0,0076 | 1:10.432 | | | | | | | |
| Тур 4 | 3 | 271 | ccddEe | cdE | 0,0111 | 0,00302-0,02990 | 0,0012 | 1:17.024 | | | | | | | |
| Тур 5а | 1 | 12 | CcddEe | Cde/cdE(/CdE) | 0,0833 | 0,00425-0,44358 | 0,0012 | n.a. ⁶ | | | | | | | |
| Typ 5b ⁷ | 1 | 271 | ccddEe | cdE | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | | | | | | | |
| Typ 6 ⁸ | 3 | 7 | CCddee | Cde | 0,2143 | 0,05842-0,57871 | 0,0051 | 1:13.909 minimal 1:6.955 maximal | | | | | | | |
| Тур 7 | 20 1 | 433 271 | Ccddee ccddEe | Cde cdE | 0,0462 0,0037 | 0,0296-0,06932 0,00019-0,01964 | 0,038 0,0016 | 1:2.086 1:51.071 | | | | | | | |
| gesamt | 43 | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 3.3: Frequenz der einzelnen PCR-Muster des "Exon-Screenings"

¹ Anzahl aller untersuchten Proben dieses Phänotyps.

² Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

³ Häufigkeit in der beobachteten Rhesusformel.

⁴ Kalkuliert unter der Annahme einer Poisson-Verteilung.

⁵ Abschätzung anhand Daten aus der Bevölkerung Baden-Württembergs [107].

⁶ Nicht anwendbar. Für Typ 5a wurde keine Haplotypfrequenz angegeben, da es sich bei der gefundenen Probe dieses Typs um eine RhD-positive Probe (D Kategorie VI Typ 1) handelte, die wahrscheinlich nur aufgrund der Konstellation eines Cde-Allels in *trans*-Position und dem daraus resultierenden suppressiven Effekt in dem Bestand der untersuchten RhD-negativen Proben zu finden gewesen ist.

⁷ Der Typ 5b entsprach der klassischen D-Kategorie VI Typ 1. Für diese falsch RhD-negativ geführte Probe wurde keine Frequenz kalkuliert [107;109].

⁸ Alle Proben des Typs 6 stammten von Personen einer Familie. Der Phänotyp CCddee erlaubte keine Abschätzung, ob Homozygotie oder Heterozygotie vorlagen. Es erfolgte daher eine Abschätzung der minimalen Haplotypfrequenz unter Annahme eines heterozygoten, sowie der maximalen unter Annahme eines homozygoten Erbganges.



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Ergebnisse des "Exon-Screenings"



Abschätzung unter der Annahme der Homozygotie angegeben. Zwei Proben mit unterschiedlichem Rhesus-Phänotyp (CcddEe und ccddEe) zeigten das PCR-Muster Typ 5 mit *RHD*-spezifischen Banden in den Bereichen von Promotor, Exon 3, 6 und 7, Intron 7, Exon 9 und 3'UTR. Keine *RHD*-spezifische Banden erhielten wir für die Bereiche Exon 4, Intron 4 und Exon 5. Aufgrund der unterschiedlichen Rhesus-Phänotypen wurde der Typ 5 weiter unterteilt in Typ 5a (CcddEe) und Typ 5b (ccddEe). Lediglich eine Probe wurde mit dem PCR-Muster Typ 1 (Ccddee) gefunden. Sie zeigte *RHD*-spezifische Banden in den Bereichen Exon 3, Intron 7, Exon 9 und 3'UTR.

3.3 Nukleotid-Sequenzierung

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse der 21 Proben mit PCR-Muster Typ 7 wurden angegeben und dargestellt (Tab. 3.4). In allen 21 Proben wurde eine mögliche molekulare Ursache des RhD-negativen Phänotyps identifiziert. Insgesamt wurden acht unterschiedliche molekulare Ursachen für die fehlende oder zumindest stark reduzierte RhD-Expression beobachtet. Darunter wurde zweimal ein vorzeitiges Stopkodon, zweimal eine "missense"-Mutation und viermal eine veränderte Spleißstelle gefunden. Jede der 21 Proben konnte einer dieser acht molekularen Ursachen zugeordnet werden, wobei alle Proben eines Allels den gleichen Phänotyp hatten. Die Angaben zur Haplotypfrequenz wurden für jedes Allel berechnet und angegeben (Tab. 3.5).

Die zwei Allele, bei denen die entdeckten Punktmutationen ein vorzeitiges Stopkodon erzeugten, waren *RHD*(W16X) und *RHD*(T330X). Das Allel *RHD*(W16X) zeigte im Exon 1 bei Position 48 einen Basenaustausch von Guanosin nach Adenosin. Dies änderte das Basentriplet TGG (kodiert für Tryptophan an Position 18 der Aminosäuresequenz) zu einem TGA-Stopkodon. Es konnten zwei Proben mit Phänotyp Ccddee diesem Allel zugeordnet werden. Bei dem Allel *RHD*(T330X) führte ein Basenaustausch von Cytosin nach Guanosin im Exon 7 an Position 990 zu einer Veränderung des Basentriplets TAC (kodiert für Threonin an Position 330 der Aminosäuresequenz), resultierend in einem TAG-Stopkodon. Es wurde eine Probe (Ccddee) mit dieser Veränderung gefunden.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Sequenzanalyse der Allele mit PCR-Muster Typ 7

| Allel ¹ | Mutation ² | Bereich | Auswirkung ³ | n ⁴ | Phänotyp 5 |
|-------------------------|-----------------------|----------|-------------------------------------------------|----------------|------------|
| <i>RHD</i> (W16X) | G48A | Exon 1 | Stopkodon W16X | 2 | Ccddee |
| <i>RHD</i> (Ex3 5'G1A) | g486+1a | Intron 3 | veränderte Spleißstelle ACgt→ACat | 3 | Ccddee |
| <i>RHD</i> (G212V) | G635T | Exon 5 | veränderte Spleißstelle agGC \rightarrow agTC | 1 | Ccddee |
| <i>RHD</i> (C285Y) | G854A | Exon 6 | Aminosäureaustausch C285Y | 1 | ccddEe |
| <i>RHD</i> (M295I) | G885T | Exon 6 | Aminosäureaustausch M295I | 7 | Ccddee |
| <i>RHD</i> (T330X) | C990G | Exon 7 | Stopkodon T330X | 1 | Ccddee |
| <i>RHD</i> (Ex8 5'G1A) | g1153+1a | Intron 8 | veränderte Spleißstelle AGgt→AGat | 1 | Ccddee |
| <i>RHD</i> (G385A) | G1154C | Exon 9 | veränderte Spleißstelle agGT→agAT | 1 | CcddEe |
| <i>RHD</i> (Ex9 5'G-1A) | G1227A | Exon 9 | veränderte Spleißstelle AGgt→AAgt | 5 | Ccddee |
| | | | | | |

¹ Die Nomenklatur der angegebenen Allele ist bezogen auf die von der Mutation betroffene Aminosäure und deren Position im Protein. Vor der Positionsangabe steht die erwartete Aminosäure, danach die durch die Mutation entstandene. Aminosäuren wurden gemäß internationaler Nomenklatur abgekürzt [42]. Bei Mutationen in Intronbereichen (veränderte Spleißstellen) ohne direkte Auswirkung auf die Aminosäuresequenz wurde auf die von Nakai *et al.* [78] benützte Nomenklatur für Nukleotidpositionen bei Mutationen in "splice site regions" zurückgegriffen.

² Zahlen geben die Position des veränderten Nukleotids relativ vom ATG-Startkodon an. Für in Intronbereichen gelegene Mutationen wurde die Position des letzten benachbarten Nukleotids im Exon + dessen Entfernung angegeben. Der Buchstabe vor der Zahl entspricht der erwarteten *RHD*-Sequenz an dieser Position, der Buchstabe nach der Zahl gibt das gefundene, veränderte Nukleotid an. Großbuchstaben geben Nukleotide in Exons, Kleinbuchstaben Nukleotide in Introns an.

³ Aminosäuren wurden gemäß internationaler Nomenklatur abgekürzt [42]. Bei den angegebenen Nukleotiden stehen Großbuchstaben für Exonbereiche, Kleinbuchstaben für Intronbereiche.

⁴ Anzahl der beobachteten Proben des jeweiligen Allels.

⁵ Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

Die zwei Allele, deren gefundene Mutationen einen Aminosäureaustausch bewirkten und dadurch zu einer veränderten Primärstruktur des Proteins führten, waren *RHD*(C285Y) und *RHD*(M295I). Bei dem Allel *RHD*(C285Y) führte ein Basenaustausch von Guanosin nach Adenosin an Position 854 im Exon 6 zu einer Veränderung des Basentriplets TGT zu TAT. Dies bewirkt einen Aminosäureaustausch an Position 285 der Aminosäuresequenz von Cystein nach Tyrosin. Diese Mutation fanden wir bei einer Probe mit Phänotyp ccddEe. Für das Allel *RHD*(M295I) konnte ein Basenaustausch von Guanosin zu Thymidin an Position 885 im Exon 6 beschrieben werden. Es resultierte eine Änderung des Basentriplets ATG zu ATT und daraus folgend ein Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin an Position 295 der Aminosäuresequenz. Mit sieben gefundenen Proben (Ccddee) stellt dieses Allel das häufigste aller identifizierten Allele mit PCR-Muster Typ 7 dar.

| | | | | | Fre | equenz | |
|-------------------------|--------|-----|----------------------------|--------------|-----------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|
| Allel ¹ | Anzahl | n ² | Phäno- typ ³ | Häufigkeit 4 | 95% Vertrauens- bereich ⁵ | Phänotyp- frequenz (%) | Abschätzung der Haplotypfrequenz ⁶ |
| <i>RHD</i> (W16X) | 2 | 433 | Ccddee | 0,0046 | 0,0008 -0,01544 | 0,0038 | 1:20.864 |
| <i>RHD</i> (Ex3 5'G1A) | 3 | 433 | Ccddee | 0,0069 | 0,0018 -0,01871 | 0,0057 | 1:13.909 |
| <i>RHD</i> (G212V) | 1 | 433 | Ccddee | 0,0023 | 0,0001 -0,01299 | 0,0019 | 1:41.727 |
| <i>RHD</i> (C285Y) | 1 | 271 | ccddEe | 0,0037 | 0,0001 -0,01964 | 0,0016 | 1:51.071 |
| <i>RHD</i> (M295I) | 7 | 433 | Ccddee | 0,0162 | 0,0075 -0,03179 | 0,013 | 1:5.961 |
| <i>RHD</i> (T330X) | 1 | 433 | Ccddee | 0,0023 | 0,0001 -0,01299 | 0,0019 | 1:41.727 |
| <i>RHD</i> (Ex8 5'G1A) | 1 | 433 | Ccddee | 0,0023 | 0,0001 -0,01299 | 0,0019 | 1:41.727 |
| <i>RHD</i> (Ex9 5'G-1A) | 5 | 433 | Ccddee | 0,0116 | 0,0045 -0,02582 | 0,0095 | 1:8.345 |

| Tabelle 3.5: Frequenzen der beobachteten <i>R</i> | RHD-Allele mit PCR-Muster T | ур 7 |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|------|
|---------------------------------------------------|-----------------------------|------|

¹ Für das Allel *RHD*(G385A) wurde keine Haplotypfrequenz berechnet, da es unter den Sonderproben des Instituts Baden-Baden und nicht unter den Proben der molekularbiologischen Reihenuntersuchung entdeckt worden ist.

² Anzahl aller untersuchten Proben dieses Phänotyps.

³ Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

⁴ Beobachtete Häufigkeit in der jeweiligen Rhesusformel.

⁵ Kalkuliert unter der Annahme einer Poisson-Verteilung.

⁶ Abschätzung anhand Daten aus der Bevölkerung Baden-Württembergs [106].

Die restlichen vier Allele, die Mutationen im Bereich von Spleißstellen zeigten waren die Allele RHD(G212V), RHD(Ex3 5'G1A), RHD(Ex8 5'G1A) und RHD(Ex9 5'G-1A). Das Allel RHD(G212V) zeigte einen Basenaustausch von Guanosin nach Thymidin an Position 635 im Exon 5. Dies resultiert zum einen in einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Valin an Position 212 der Aminosäureseguenz. Da aber die Position 635 das erste Nukleotid im Exon 5 darstellt und somit zur Spleißstelle zählt, resultiert aus dieser Mutation zum anderen eine Veränderung der 3' (tRNA-Orientierung) Spleißstelle von agGC nach agTC. Es konnte eine Probe mit Phänotyp Ccddee diesem Allel zugeordnet werden. Bei dem Allel RHD(Ex3 5'G1A) konnte eine stille Mutation des ersten Nukleotids im Intron 3 (Guanosin zu Adenosin) festgestellt werden, was eine Veränderung der Spleißstelle des Exon 3/Intron 3-Überganges von ACgt nach ACat darstellt. Da keine Vorschriften zur Nomenklatur von Allelen mit Mutationen in Intronbereichen vorlagen, wurde auf die von Nakai et al. [78] benützte Nomenklatur für Nukleotidpositionen bei Mutationen in "splice site regions" zurückgegriffen. Dem Allel RHD(Ex3 5'G1A) konnten drei Proben des Phänotyps Ccddee zugeordnet werden. Bei dem Allel RHD(Ex8 5'G1A) wurde eine

stille Mutation des ersten Nukleotides im Intron 8 (Guanosin zu Adenosin) festgestellt, die zu einer Veränderung der Spleißstelle des Exon 8/Intron 8-Überganges von AGgt nach AGat führt. Es wurde eine Probe des Phänotyps Ccddee, die diese Mutation aufwies, identifiziert. Für das Allel *RHD*(Ex9 5'G-1A) wurde eine stille Mutation des letzten Nukleotides im Exon 9 (Guanosin zu Adenosin an Position 1227) und eine dadurch veränderte Spleißstelle des Exon 9/Intron 9-Überganges von AGgt nach AAgt festgestellt. Mit fünf gefundenen Proben war dieses Allel das zweithäufigste der Allele mit PCR-Muster Typ 7.

3.4 Serologische Aufarbeitung

Die serologische Aufarbeitung erfolgte zum Ausschluß von Proben mit quantitativ oder qualitativ verändertem Antigen D, die möglicherweise in dem Bestand der untersuchten RhD-negativen Proben zu finden waren. Die Ergebnisse dieser serologischen Aufarbeitung wurden für die einzelnen Typen und Allele dargestellt (Tab. 3.6). Die Probe mit PCR-Muster Typ 4 wurde zusätzlich, da ein analoges Muster bereits von Faas *et al.* [38-40] ebenfalls für den Haplotyp cdE mit Antigen G-positiver Reaktion beschrieben worden war, mit zwei unterschiedlichen monoklonalen IgG Anti-G Antiseren (MS1; MS218; Dr. Thompson, IGRI, Oslo, Norwegen) untersucht. Diese wurden vom Workshop on Monoclonal Antibodies against Human Red Blood Cells and Related Antigens [86] bereitgestellt und wurden von Delsalle *et al.* [35] beschrieben. Es zeigten sich aber hierbei keine G-positiven Reaktionen (nicht in Tab. 3.6 dargestellt).

Bei den untersuchten Proben der PCR-Muster Typ 1 bis 6 zeigten sich lediglich beim Typ 5 positive Reaktionen, die restlichen Typen erbrachten auch mit den sehr sensitiven Untersuchungsmethoden der serologischen Aufarbeitung keine Antigen D-positiven Reaktionen. Der Typ 5a zeigte eine negative Reaktion mit den Anti-D Antiseren Anti-D Blend, BS226 und MS201 sowie im direkten Coombs- Test. Bei der Untersuchung mit dem Adsorption-Elution-Verfahren zeigten sich stark positive Reaktionen sowohl im ID-Gel als auch im Capture-R Ready-ID. Auch die daran anschließende Untersuchung mit dem sehr sensitiven Anti-D Antiserum H41 erbrachte eine eindeutig positive Reaktion. Im Gegensatz dazu lieferten alle

Tabelle 3.6: Befunde der serologischen Aufarbeitung

| | | | | | Anti-D A | ntiseren | | Adsorp | tion-Elution | | | | Ant | i-D-S | Scree | n | . <u></u> | | |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------------------------|----------|----------|----------|------|----------|--------------|---|------|---|-----|-------|-------|---|-----------|------|----------------------------------------|
| Typ/Allel | Probe ¹ | Phänotyp ² | direkter ² Coombs ³ | Blend | BS226 | MS201 | H41 | ID-Gel | Capture-R | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | serologischer Phänotyp ⁴ |
| Тур 1 | II-92 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| Тур 2 | IV-64 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| Тур З | V-10 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| Тур 4 | V-30 | ccddEe | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| Тур 5а | III-07 | CcddEe | - | - | - | - | ++' | +++' | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | D _{el} |
| Typ 5b | XI-34 | ccddEe | - | +++' | - | - | | | | - | - | - | - | - | +++' | - | - | +++ | D-Kat. VI ⁵ |
| Тур 6 | V-02 | CCddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| Тур 8 | XI-44 | CcddEe | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| Тур 9 | XII-34 | ccddEE | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| <i>RHD</i> (W16X) | III-72 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| <i>RHD</i> (Ex3 5'G1A) | II-01 | Ccddee | - | - | - | - | - | <u>•</u> | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | D_{el} |
| <i>RHD</i> (G212V) | VII-74 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| <i>RHD</i> (C285Y) | VII-04 | ccddEe | - | +++' | - | - | +++' | ++++ | ++++ | - | +++' | - | - | - | - | - | ++' | +++' | Partial D |
| <i>RHD</i> (M295I) | VII-18 | Ccddee | - | <u>•</u> | - | - | (+) | +++' | ++++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | D _{el} |
| <i>RHD</i> (T330X) | I-26 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| <i>RHD</i> (Ex8 5'G1A) | III-86 | Ccddee | - | - | - | - | | - | - | | | | | | | | | | RhD neg |
| <i>RHD</i> (G385A) | XII-16 | CcddEe | - | +++ | - | - | | | | | | | | | | | | | Weak D |
| <i>RHD</i> (Ex9 5'G-1A) | III-59 | Ccddee | - | - | - | - | - | +++ | ++++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | D _{el} |

- negativ • In Spuren (fraglich) positive Reaktion (+) schwach positiv +, +', ++, ++', +++, +++', ++++ Graduierung einer positiven Reaktion Für die jeweilige Gruppe repräsentativ untersuchte Probe. Bei den Allelen mit PCR-Muster Typ 7 wurden zumindest von der angegebenen Probe alle Exons des 1 *RHD*-Gens sequenziert. Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp. Direkter Antiglobulintest (Coombs-Test).

2

3

4 Mit den eingesetzten serologischen Zusatzuntersuchungen bestimmter Phänotyp.

5 Entspricht dem typischen Reaktionsmuster einer D-Kategorie VI. Weitere Untersuchungen mit H41 sowie ein Adsorption-Elution-Verfahren erübrigten sich. Untersuchungen mit den D-Screen Antiseren negative Testergebnisse und gaben somit keinen Aufschluß über einen eventuell vorliegenden Partial D-Phänotyp. Alle serologischen Ergebnisse deuteten daher auf einen Del-Phänotyp hin. Der Typ 5b zeigte eine stark positive Reaktion mit dem Anti-D Blend und negative Reaktionen mit den Antiseren BS226 und MS201. Bei der Untersuchung mit den D-Screen Antiseren zeigten sich positive Reaktionen mit den Seren 6 und 9, was dem typischen Reaktionsmuster einer D-Kategorie VI entsprach. Weitere Untersuchungen mit dem Antiserum H41 oder einem Adsorption-Elution-Verfahren erübrigten sich. Diese Probe hätte aufgrund des typischen Reaktionsmusters schon in der serologischen Routinebestimmung als RhD-positive Probe erkannt werden müssen.

Bei den Allelen mit PCR-Muster Typ 7 gaben die Allele *RHD*(W16X), *RHD*(G212V), *RHD*(T330X) und *RHD*(Ex8 5'G1A) sowohl in der Untersuchung mit Anti-D Antiseren als auch mit dem Adsorption-Elution-Verfahren keinen Anhalt auf eine Antigen D-Expression und wurden als Antigen D-negativ befundet. Somit zeigten beide Allele mit vorzeitigem Stopkodon und zwei der vier Allele mit veränderter Spleißstelle keine oder zumindest keine mit den verwendeten Methoden erfaßbare Expression des Antigen D.

Bei den Allelen *RHD*(Ex3 5'G1A) und *RHD*(Ex9 5'G-1A) zeigten sich negative Reaktionen bei der Untersuchung mit Anti-D Antiseren sowie im direkten Coombs-Test. Mit dem Adsorption-Elution-Verfahren erbrachte die Probe des Allels *RHD*(Ex3 5'G1A) im ID-Gel eine fraglich positive Reaktion, die des Allels *RHD*(Ex9 5'G-1A) eine stark positive Reaktion. Beide zeigten in der sensitiveren Auswertung mit dem Capture-R Ready-ID stark positive Reaktionen. Die Untersuchungen mit den D-Screen Antiseren sowie mit dem Anti-D Antiserum H41 lieferten bei beiden Proben negative Ergebnisse. Somit konnten die übrigen zwei der vier Allele mit veränderten Spleißstellen als D_{el}-Varianten identifiziert werden.

Die Probe des Allels *RHD*(M295I) zeigte eine in Spuren (fraglich) positive Reaktion bei der Untersuchung mit dem Anti-D Blend, die in der Routineauswertung nicht als positive Reaktion gewertet würde. Die Antiseren BS226 und MS201 erbrachten negative Ergebnisse. Mit dem Adsorption-Elution-Verfahren zeigten sich sowohl im ID-Gel als auch im Capture-R Ready-ID stark positive Reaktionen, hingegen blieben die Untersuchungen mit den D-Screen Antiseren ohne positive Reaktionen. Mit dem Anti-D Antiserum H41 zeigte sich nur eine schwach positive Reaktion. Diese Ergebnisse identifizierten dieses der beiden Allele mit resultierendem Aminosäureaustausch als D_{el}-Variante, da keine eindeutig positive Reaktion mit Anti-D Antiseren erhalten wurde.

Die untersuchte Probe des Allels RHD(C285Y) zeigte eine stark positive Reaktion mit dem Anti-D Blend, jedoch negative Reaktionen mit BS226 und MS201. Dennoch hätte auch diese Probe aufgrund der starken positiven Reaktion mit dem Anti-D Blend bereits in der serologischen Routinebestimmung als RhD-positive Probe erkannt werden müssen. Es scheint, daß in der Zeit der Ersttypisierung dieser Probe ältere und weniger sensitive Verfahren angewandt worden sind, mit denen der zugehörige Spender RhD-negativ befundet und in der Spenderdatei geführt worden ist. Mit dem Adsorption-Elution-Verfahren zeigten sich stark positive Testergebnisse, auch das Anti-D Antiserum H41 erbrachte eine stark positive Reaktion. Die Untersuchungen mit den D-Screen Antiseren zeigten positive Reaktionen mit den Seren 2, 8 und 9, die alle monoklonale IgG Antikörper enthielten. Alle übrigen Seren erbrachten negative Ergebnisse. Dieses Reaktionsmuster läßt sich keinem der bisher bekannten Partial D-Phänotypen zuschreiben. Es muß daher für dieses der beiden Allele mit Aminosäureaustausch angenommen werden, daß hier eventuell ein bisher nicht bekanntes Epitopmuster eines Partial D-Phänotyps mit zusätzlich reduzierter Antigendichte vorliegt. Diese Probe wurde in einer über die vorliegende Arbeit hinausgehenden Untersuchung unter der Bezeichnung DIM weiter untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind zur Veröffentlichung angenommen [111].

3.5 Untersuchung von Sonderproben

3.5.1 Blutproben der Institute Baden-Baden und Ulm

Von den 21 untersuchten Proben des Instituts Baden-Baden zeigten vier Proben in der molekularbiologischen Reihenuntersuchung Banden, die für das *RHD*-Gen spezifisch sind. Unter den acht Sonderproben des Instituts Ulm zeigte eine Probe *RHD*-spezifische Banden (Tab. 3.7). Diese Proben wurden daraufhin mit der "Exon-Screening"-Methode weiter charakterisiert. Die einzelnen PCR-Ergebnisse und die Typenzuordnung sind in Tabelle 3.8 wiedergegeben, eine schematische Darstellung der PCR-Ergebnisse erfolgte in Abbildung 3.1.

Zwei der vier Proben (CCddee, CcddEe) des Instituts Baden-Baden zeigten *RHD*-spezifische Banden im Promotorbereich und 3'UTR, die restlichen untersuchten Bereiche erbrachten keine *RHD*-spezifischen Banden. Dieses Muster entsprach dem bereits bekannten PCR-Muster Typ 2, die Proben wurden diesem Typ zugeordnet. Eine Probe (CcddEe) erbrachte *RHD*-spezifische Banden in allen untersuchten Bereichen und entsprach damit dem PCR-Muster Typ 7. Analog zu den bereits gefundenen Proben dieses Musters wurde diese Probe einer Sequenzanalyse aller zehn *RHD*-Exons unterzogen. Hierbei wurde die Mutation Guanosin nach Cytosin (G1154C) im Exon 9 an Position 1154 gefunden, mit einem resultierenden Aminosäureaustausch von Glycin nach Alanin an Position 385. Diese Veränderung bedingt außerdem eine veränderte 3' (tRNA-Orientierung) Spleißstelle im Exon 9 (agGT \rightarrow agAT). Dieselbe Mutation wurde bereits von Wagner *et al.* [110] als Weak D Typ 2 mit dem Haplotyp cDE beschrieben und konnte somit diesem Allel

Tabelle 3.7: Molekularbiologische Reihenuntersuchung der Sonderproben aus Baden-Baden und Ulm

| | | - | untersuchte | Bereiche | e des RHE | -Genlocus |
|----------|--------|-----------------------|-------------|----------|-----------|-----------|
| Institut | Anzahl | Phänotyp ¹ | Promotor | Intron 4 | Exon 7 | 3'UTR |
| Baden- | 1 | CCddee | + | - | - | + |
| Baden | 2 | CcddEe | + | - | - | + |
| | 1 | CcddEe | + | + | + | + |
| | 10 | CCddee | - | - | - | - |
| | 4 | CcddEe | - | - | - | - |
| | 2 | ccddEE | - | - | - | - |
| | 1 | CcddEE | - | - | - | - |
| | 21 | gesamt | | | | |
| Ulm | 1 | ccddEE | + | - | - | + |
| | 6 | CCddee | - | - | - | - |
| | 1 | ccddEE | - | - | - | - |
| | 8 | gesamt | | | | |

ordnet werden. In der serologischen Aufarbeitung dieser Probe zeigte sich eine deutlich positive Reaktion mit dem Anti-D Blend, jedoch negative Reaktionen BS226 mit und MS201. Der fehlenden Reaktivität mit monoklonalen Anti-D Antiseren ist es sehr wahrscheinlich zuzuschreiben, daß diese Probe trotz deutlich positiver Reaktion mit

RHD(G385A)

zuge-

¹ Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

| | | | _ | untersuchte Bereiche des RHD-Genlocus | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------|--------|-----------------------|---------------------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|--|
| Institut | PCR-Muster | Anzahl | Phänotyp ¹ | Prom | Ex3 | Ex4 | In4 | Ex5 | Ex6 | Ex7 | ln7 | Ex9 | 3'UTR | |
| Baden- Baden | Тур 2 | 1 1 | CCddee CcddEe | + + | - - | - | - | - | - | - | - | - | + + | |
| | Тур 7 | 1 | CcddEe | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Тур 8 | 1 | CcddEe | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| Ulm | Тур 9 | 1 | ccddEE | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | |

Tabelle 3.8: PCR-Ergebnisse des "Exon-Screenings" von Sonderproben der Institute Baden-Baden und Ulm

¹ Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

einem oligoklonalen polyspezifischen Anti-D im Bestand der RhD-negativen Proben geführt worden war. Ebenfalls läßt diese fehlende Reaktivität mit monoklonalen Anti-D einen suppressiven Effekt des Cde-Allels in *trans*-Stellung vermuten. Eine weitere serologische Abklärung für dieses bereits als Weak D beschriebene Allel erfolgte nicht. Die letzte der vier Proben (CcddEe) zeigte ein PCR-Muster, das in den bisherigen Untersuchungen noch nicht beobachtet worden war, das Muster wurde daher als Typ 8 bezeichnet. Es zeigte *RHD*-spezifische Banden im Bereich Promotor, Exon 3, 9 und 10. Für diese Probe schloß sich eine serologische Aufarbeitung an (Tab. 3.6). Es zeigten sich keine positiven Reaktionen bei der Untersuchung mit Anti-D Antiseren oder mit dem Adsorption-Elution-Verfahren, die Probe wurde Antigen D-negativ befundet.

Im "Exon-Screening" zeigte die Sonderprobe des Instituts Ulm (ccddEE) ein ebenfalls bis dahin noch nicht gefundenes PCR-Muster mit *RHD*-spezifischen Banden lediglich im Bereich 3'UTR. Dieses Muster wurde mit Typ 9 bezeichnet, die zugehörige Blutprobe wurde serologisch aufgearbeitet (Tab. 3.6). Hierbei zeigten sich keine positiven Testergebnisse, die Probe wurde Antigen D-negativ befundet.

3.5.2 DNA-Untersuchungen der Sonderproben aus anderen Populationen

Die Untersuchungen der DNA-Proben aus dem SCARF Programm mit den Methoden der molekularbiologischen Reihenuntersuchung erbrachten lediglich bei der Probe 94-023 (CcddEe) *RHD*-spezifische Banden (Tab. 3.9). Insbesondere die Probe 95-009 zeigte keine *RHD*-spezifische Banden in den untersuchten Bereichen und wurde daher nicht mehr weiter mit der "Exon-Screening"-Methode untersucht.

Von den zehn untersuchten DNA-Proben aus Taiwan zeigten die acht Proben mit D_{el}-Phänotyp erwartungsgemäß *RHD*-spezifische Banden in allen vier untersuchten Bereichen. Die beiden Proben, bei denen ein vorhandener *RHD*spezifischer Genabschnitt im Bereich 3'UTR beschrieben worden war, zeigten in den Untersuchungen sowohl im Bereich 3'UTR als auch im Promotor *RHD*-spezifische Banden, jedoch nicht im Intron 4 oder Exon 7 (Tab. 3.9).

Tabelle 3.9: Molekularbiologische Reihen-
untersuchung der Sonderproben aus
anderen Populationen

| | | | untersuchte Bereiche des <i>RHD</i> -Genlocus | | | | |
|----------|----------------|----------------|-----------------------------------------------|--------|--------|--------|--|
| | | CE- | | | | | |
| Herkunft | Probe | Genotyp | Prom | In4 | Ex7 | 3'UTR | |
| SCARF | 94-023 | CE/ce | + | + | + | + | |
| | 94-009 | cE/cE | - | - | - | - | |
| | 95-009 | ce/ce | - | - | - | - | |
| | 96-001 | cE/cE | - | - | - | - | |
| Taiwan | Rh199 Rh204 | Ce/Ce Ce/Ce | + + | + + | + + | + + | |
| | Rh208 | Ce/Ce | + | + | + | + | |
| | Rh214 | Ce/ce | + | + | + | + | |
| | Rh215 | Ce/Ce | + | + | + | + | |
| | Rh217 | Ce/ce | + | + | + | + | |
| | Rh218 | Ce/ce | + | + | + | + | |
| | Rh219 | Ce/ce | + | + | + | + | |
| | Rh233 | Ce/ce | + | - | - | + | |
| | Rh267 | Ce/ce | + | - | - | + | |
| | | | | | | | |

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den beschriebenen Methoden des "Exon-Screenings" sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Die Probe 94-023 aus dem SCARF Programm zeigte RHDspezifische Banden in den Bereichen Promotor, Exon 3 und 4, Intron 4, Exon 5, 6 und 7 sowie im Bereich 3'UTR von Exon 10. Die Bereiche Intron 7 und Exon 9 erbrachten keine Banden, die für das RHD-Gen spezifisch waren. Das so erhaltene PCR-Muster entsprach dem bekannten Muster Typ 6, das in den bisherigen Untersuchungen nur innerhalb einer Familie bei drei blutsver-

wandten Personen mit dem Haplotyp Cde entdeckt worden war. Für die Probe 94-023 wurde der Genotyp r_yr angegeben. Sollte diese Angabe des SCARF-Exchange für diese Probe zutreffen, so konnte ein analoges Allel des PCR-Musters Typ 6 auch unter Proben aus einer anderen Population mit dem Haplotyp CdE gefunden werden. Alternativ wäre der Genotyp r'r" für diese Probe denkbar. In diesem Fall wäre vermutlich dasselbe Allel wie das in der Bevölkerung Süddeutschlands

| | | | | untersuchte Bereiche des RHD-Genlocus | | | | | | | | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Herkunft | Probe | <i>CE</i> - Genotyp | PCR- Muster | Prom | Ex3 | Ex4 | In4 | Ex5 | Ex6 | Ex7 | ln7 | Ex9 | 3'UTR |
| SCARF | 94-023 | CE/ce | Тур 6 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| Taiwan | Rh199 Rh204 Rh208 Rh214 Rh215 Rh217 Rh218 Rh219 | Ce/Ce Ce/Ce Ce/Ce Ce/Ce Ce/Ce Ce/ce Ce/ce Ce/ce | Typ 7 Typ 7 Typ 7 Typ 7 Typ 7 Typ 7 Typ 7 Typ 7 | + + + + + + | + + + + + + + + | + + + + + + + + + + | + + + + + + | + + + + + + + + + | + + + + + + + + + | + + + + + + + + | + + + + + + | + + + + + + | + + + + + + + |
| | Rh233 Rh267 | Ce/ce Ce/ce | Тур 2 Тур 10 | + + | - + | - | - | - | - | - | - | - | + + |

beobachtete auch innerhalb einer anderen Population mit dem Haplotyp Cde gefunden worden.

Die acht Proben aus Taiwan mit beschriebenem D_{el}-Phänotyp zeigten *RHD*spezifische Banden in allen untersuchten Bereichen. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang der Bereich um Exon 9, der ebenfalls Banden erbrachte, die für das *RHD*-Gen spezifisch sind. Somit konnte die für diese Population vorbeschriebene Deletion zwischen Intron 8 und Intron 9 des *RHD*-Gens als Ursache für D_{el}-Varianten [27] unter den untersuchten Proben nicht beobachtet werden. Das erhaltene PCR-Muster entsprach dem Typ 7, eine weitere molekulare Charakterisierung mittels Sequenzanalyse aller Exons des *RHD*-Gens und eine daraus abzuleitende mögliche Zuordnung zu einem der im Zuge dieser Arbeit unter der Bevölkerung Süddeutschlands gefundenen Allele mit D_{el}-Phänotyp war nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit. Die entsprechenden Proben werden in einer Folgeuntersuchung aufgearbeitet.

Die Probe Rh233 zeigte *RHD*-spezifische Banden im Promotorbereich und im Bereich 3'UTR von Exon 10. Somit konnte das erhaltene PCR-Muster dem bereits bekannten Muster Typ 2 zugeordnet werden, das unter den Proben aus der Bevölkerung Süddeutschlands ebenfalls mit dem Haplotyp Cde gefunden wurde. Die Probe Rh267 erbrachte *RHD*-spezifische Banden in den Bereichen Promotor, Exon 3 und 3'UTR, alle anderen Bereiche zeigten keine Banden, die für das *RHD*-Gen spezifisch waren. Dieses Muster stellte ein in den bishererigen Untersuchungen noch nicht beobachtetes Bandenmuster dar und wurde mit PCR-Muster Typ 10 bezeichnet. Da lediglich DNA-Proben aber keine Erythrozyten für Untersuchungszwecke zur Verfügung gestellt worden sind, konnte keine serologische Aufarbeitung dieses Typs erfolgen. In der Untersuchung von Sun *et al.* [100] wurden jedoch alle Proben zum Ausschluß Antigen D-positiver Proben, Weak D-Varianten sowie D_{el}-Phänotypen mit monoklonalen IgM und IgG Anti-D Antiseren im ID-Gel, sowie mit einem Adsorption-Elution-Verfahren in Choroformtechnik, das mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden vergleichbar ist, untersucht. Daher kann angenommen werden, daß auch für das PCR-Muster Typ 10 kein D_{el}-Phänotyp, sondern ein serologisch RhD-negativer Phänotyp vorliegt. Eine schematische Darstellung dieses PCR-Musters erfolgte in Abbildung 3.1.

3.5.3 DNA-Untersuchung des CdE-Haplotyps

Bei der Untersuchung der DNA-Probe mit dem sehr seltenen Haplotyp CdE zeigten sich in keinem der vier untersuchten Bereiche Banden, die für das *RHD*-Gen spezifisch waren. Diese Probe wurde daraufhin nicht mehr weiter mit der "Exon-Screening"-Methode untersucht.

3.6 Frequenz der identifizierten *RHD*-Allele

Die einzelnen Frequenzen für die gefundenen PCR-Muster und der Allele mit PCR-Muster Typ 7 wurden berechnet und angegeben (Tab. 3.3 und 3.5). Es erfolgte außerdem eine Darstellung der populationsbezogenen Daten (Tab. 3.11) sowie der Verteilung in den verschiedenen Rhesus-Haplotypen (Tab. 3.12).

In der molekularbiologischen Reihenuntersuchung zeigten 34 Proben mit Phänotyp Ccddee, drei Proben mit Phänotyp CCddee, eine Probe mit Phänotyp CcddEe und fünf Proben mit Phänotyp ccddEe Banden, die für das *RHD*-Gen spezifisch sind. Hierbei wurden für die Angaben des Phänotyps die Auswahlkriterien für RhD-negative Proben, die dieser Arbeit zugrundelagen, berücksichtigt. Demzufolge sind bei den getroffenen Abschätzungen auch Proben mit qualitativ oder quantitativ verändertem Antigen D, die mit den derzeit eingesetzten serologischen Routinebestimmungen RhD-negativ befundet werden, enthalten. Die errechnete Frequenz von Proben mit *RHD*-spezifischen Banden beträgt für den Haplotyp Cde in einer minimalen Abschätzung (vgl. Tab. 3.3, Typ 6 heterozygot) 8,06% (1:12), in einer maximalen Abschätzung (vgl. Tab. 3.3, Typ 6 homozygot) 8,71% (1:11; Tab. 3.12). Für den Haplotyp cdE beträgt diese Frequenz 1,40% (1:71; Tab. 3.12). Unter allen, mit den in dieser Arbeit zugrundegelegten Kriterien (siehe 2.3) bestimmten, RhD-negativen Proben findet man demnach Proben mit *RHD*-spezifischen Banden mit einer Häufigkeit von 1:208, entsprechend 0,48% (minimale Abschätzung, vgl. Tab. 3.3, Typ 6 heterozygot), beziehungsweise von 1:194, entsprechend 0,52% (Tab. 3.11). Unter den RhD- negativen Proben mit vorhandenem Antigen C und/oder Antigen E können solche Proben mit einer Häufigkeit von 1:17 (5,88%) in einer minimalen und 1:16 (5,61%) in einer maximalen Abschätzung gefunden werden (Tab. 3.11).

Für das Allel *RHD*(C285Y), das in der serologischen Aufarbeitung ein bisher unbekanntes Epitopmuster eines Partial D-Phänotyps ohne positive Reaktion bei der Untersuchung mit monoklonalen Anti-D Antiseren zeigte, wurde bezogen auf die Gesamtbevölkerung eine Häufigkeit von 0,0016% (1:62.174) für RhD-negative Proben, die dieses Allel aufweisen, berechnet. Dies entspricht 0,0093% (1:10.750) aller RhD-negativen Proben und 0,11% (1:920) unter den RhD-negativen Proben mit Antigen C und/oder Antigen E (Tab. 3.11).

Die vier *RHD*-Allele, die als D_{el}-Varianten identifiziert wurden, umfaßten 16 Proben, von denen 15 unter den Proben mit Phänotyp Ccddee und eine unter den Proben mit Phänotyp CcddEe gefunden wurden. Es wurden für die Allele *RHD*(Ex3 5'G1A), *RHD*(M295I) und *RHD*(Ex9 5'G-1A) die jeweiligen Haplotypfrequenzen angegeben (Tab. 3.5). Hieraus und mit den Haplotypfrequenzen aus den Untersuchungen von Wagner *et al.* [107] konnten die Phänotypfrequenzen für die möglichen RhD-negativen Allelkonstellationen berechnet werden (Tab. 3.11).

| | | | | | Mittelwerte der Allelfrequenzen (% / Verhältnis) | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Kriterium | Typ/Allel | serologischer Phänotyp ¹ | n ² | Haplo- typ ³ | bezogen auf die Gesamtbevölkerung | bezogen auf alle RhD- negativen Proben | bezogen auf RhD-nega- tive Proben mit Antigen C und/oder E |
| Proben mit <i>RHD</i> -spezi- fischen Bereichen bei RhD-negativem Phänotyp ⁴ | alle in der molekularbio- logischen Reihenunter- suchung identifizierten Typen/Allele | Partial D D _{el} RhD negativ | 1 16 25 | cdE Cde/cdE Cde/cdE | max ⁵ : 0,089% / 1:1.125 | max ⁵ : 0,52% / 1:194 | max ⁵ : 5,61% / 1:16 |
| Proben mit qualitativ verändertem Antigen D | <i>RHD</i> (C285Y) | Partial D (DIM) | 1 | cdE | 0,0016% / 1:62.174 | 0,0093% / 1:10.750 | 0,11% / 1:920 |
| Proben mit quantitativ verändertem Antigen D | Typ 5a <i>RHD</i> (Ex3 5'G1A) <i>RHD</i> (M295I) <i>RHD</i> (Ex9 5'G-1A) | D _{el} | 1 3 7 5 | Cde/cdE Cde Cde Cde | 0,031% / 1:3.256 | 0,18% / 1:563 | 2,08% / 1:48 |
| nicht-funktionale Allele des <i>RHD</i> -Gens ⁶ | Typ 1 Typ 2 Typ 3 Typ 4 Typ 6 <i>RHD</i> (W16X) <i>RHD</i> (G212V) <i>RHD</i> (T330X) <i>RHD</i> (Ex8 5'G1A) | RhD negativ | 1 9 4 3 2 1 1 | Cde Cde cdE Cde Cde Cde Cde Cde Cde Cde | max ⁵ : 0,054% / 1:1.850 | max ⁵: 0,31% / 1:319 | max ⁵ : 3,65% / 1:27 |
| Proben des Phänotyps ccddee mit <i>RHD</i> -spe- zifischen Bereichen ⁷ | Kein Typ/Allel in dieser Gruppe (n=314) beob- achtet | n.a. | 0 | cde | <0,376% / <1:266 | <2,174% / <1:46 | <2,378% / <1:42 ⁸ |

Mit den eingesetzten serologischen Zusatzuntersuchungen bestimmter Phänotyp. Anzahl der identifizierten Proben des jeweiligen Typs/Allels.

2

3 Wahrscheinlicher Haplotyp des entsprechenden Typs/Allels.

4 Mit serologischen Routinemethoden bestimmter Phänotyp.

Vergleiche Tabelle 3.3, Typ 6 in minimaler und maximaler Abschätzung der Haplotypfrequenz. 5

Frequenzangabe für die Proben mit RHD-spezifischen Bereichen, die auch nach serologischer Aufarbeitung einschließlich eines Adsorption-6 Elutionstests kein qualitativ oder quantitativ verändertes Antigen D aufwiesen.

⁷ Frequenzangaben dieser Gruppe entsprechen der oberen (einseitigen) 95%-Vertrauensgrenze f
ür die Fallzahl x=0 unter Annahme einer Poisson-Verteilung.
 ⁸ Frequenzangabe bezogen auf den Ph
änotyp ccddee.

| | Mittelwerte der haplotypbezogenen Frequenzen (% / Verhältnis) | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------|--|--|--|--|--|
| Kriterium | Cde | cdE | cde | | | | | |
| Allele mit <i>RHD</i> - spezifischen Bereichen (mit RhD-Varianten) ¹ | max ² : 8,71% / 1:11 | 1,40% / 1:71 | <0,48% / <1:209 ³ | | | | | |
| <i>RHD</i> (C285Y) | n.a. ⁴ | 0,35% / 1:285 | n.a. ⁴ | | | | | |
| D _{el} -Allele | 3,27% / 1:30 | n.a. ⁴ | n.a. ⁴ | | | | | |
| Nicht-funktionale Allele des <i>RHD</i> -Gens ⁵ | max ² : 5,45% / 1:18 | 1,05% / 1:95 | n.a. ⁴ | | | | | |

Tabelle 3.12: Zuordnung zu einzelnen Haplotypen

¹ Entsprechend den Kriterien für RhD-negativen Phänotyp des untersuchten Probenbestandes.

² Vergleiche Tabelle 3.3, Typ 6 in minimaler und maximaler Abschätzung der Haplotypfrequenz.

³ Entspricht der oberen (einseitigen) 95%-Vertrauensgrenze für die Fallzahl x=0 unter Annahme einer Poisson-Verteilung.

⁴ nicht anwendbar.

⁵ Entspricht den Allelen mit *RHD*-spezifischen Bereichen, die auch nach serologischer Aufarbeitung kein qualitativ oder quantitativ verändertes Antigen D aufwiesen.

Für die Proben mit PCR-Muster Typ 5a (CcddEe) und Typ 5b (ccddEe) wurden keine Haplotypfrequenzen angegeben, da dasselbe Muster bereits von Wagner *et al.* [109] als D-Kategorie VI Typ 1 für den Haplotyp cD^{VI}E (Typ 1) beschrieben worden war. Dies stimmte mit der Probe des PCR-Musters Typ 5b überein. Diese Probe war auch in der serologischen Aufarbeitung eindeutig als D-Kategorie VI zu erkennen. Es handelte sich hierbei folglich um eine fälschlicherweise als RhD-negativ geführte Probe, die mit den derzeit verwendeten serologischen Routinemethoden durchaus als RhD-positive Probe hätte erkannt werden müssen. Die von uns identifizierte Probe mit PCR-Muster Typ 5a wurde sehr wahrscheinlich nur durch den suppressiven Effekt eines Cde-Allels in trans-Stellung, der eine deutlich reduzierte Antigendichte des Antigen D und den daraus resultierenden Del-Phänotyp bewirkte, in dem untersuchten Bestand RhD-negativer Proben gefunden. Alle anderen Konstellationen mit dem Haplotyp cD^{VI}E (Typ 1) wären als RhD-positive Proben erkannt worden und hätten somit den Ausschlußkriterien unterlegen. Eine korrekte Angabe der Haplotypfrequenz wäre daher anhand der von uns untersuchten Proben weder für den Typ 5a noch für den Typ 5b möglich. Da in der Untersuchung von Wagner et al. [109] keine Frequenzangaben erfolgten, berechneten wir die Frequenz für den Phänotyp CcD^{VI}Ee (Typ 1) mit den in unserer Untersuchung beobachteten Häufigkeiten. Die aus den erhaltenen Phänotypfrequenzen kalkulierte Frequenz für D_{el}-Varianten beträgt bezogen auf die Gesamtbevölkerung 0,031% (1:3.256). Dies entspricht einem Anteil von 0,18% (1:563) unter den RhD-negativen Phänotypen insgesamt. Bezogen auf die RhD-negativen Phänotypen mit C und/oder E beträgt dieser Anteil 2,08% (1:48).

Bei 25 Proben (22 mit Haplotyp Cde, drei mit Haplotyp cdE) konnte auch mit den sehr sensitiven Methoden der serologischen Aufarbeitung kein qualitativ oder quantitativ verändertes Antigen D festgestellt werden. Diese Proben stellen daher nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens dar, die bei Genotypisierungen zur Vorhersage des möglichen RhD-Phänotyps zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Die Frequenz dieser nicht-funktionalen Allele bezogen auf die Gesamtbevölkerung beträgt in einer minimalen Abschätzung (vgl. Tab. 3.3, Typ 6 heterozygot) 0,048% (1:2.077), in einer maximalen Abschätzung (vgl. Tab. 3.3, Typ 6 homozygot) 0,054% (1:1.850). Bezogen auf die Gesamtheit der RhD-negativen Proben beträgt ihre Frequenz 0,28%, entsprechend 1:359 Proben (minimale Abschätzung), beziehungsweise 0,31%, entsprechend 1:319 Proben (maximale Abschätzung). Unter den RhD-negativen Proben mit vorhandenem Antigen C und/oder Antigen E würde man solche Proben mit einer Frequenz von 3,25% oder 1:30 in einer minimalen, beziehungsweise mit einer Frequenz von 3,65% oder 1:27 in einer maximalen Abschätzung finden können (Tab. 3.11).

In der Gruppe der 314 untersuchten Proben mit Phänotyp ccddee zeigten sich bei keiner Probe *RHD*-spezifische Banden. Somit läßt sich aus der Anzahl der untersuchten cde-Allele und der bekannten Haplotypfrequenz für cde (0,394) in der Bevölkerung Süddeutschlands [107] eine Abschätzung angeben, mit welcher Frequenz bei diesem Haplotyp mit Proben, die *RHD*-spezifische Banden zeigen, maximal zu rechnen ist. Für die Berechnung der Gesamtzahl der untersuchten cde-Allele bezogen wir uns lediglich auf die Gruppe des Phänotyps ccddee, da nur bei dieser Gruppe sicher gewesen wäre, daß das cde-Allel Träger eines nichtfunktionalen Allels ist. Die faktisch mituntersuchten cde-Allele der übrigen RhDnegativen Phänotypen mit Antigen C und/oder E wurden hierbei folglich nicht einbezogen. Die Gesamtzahl der untersuchten cde-Allele (n=628) ist demnach die doppelte Anzahl der Proben des Phänotyps ccddee (2 x 314 = 628). Die errechnete

Frequenz von cde-Haplotypen, die RHD-spezifische Bereiche enthalten, ist kleiner 0,00477 (<1:209). Dies entspricht der als oberen (einseitigen) 95%-Vertrauensgrenze für die Fallzahl x=0 unter der Annahme einer Poisson-Verteilung [89]. Bezogen auf die Gesamtbevölkerung hätte der Phänotyp ccddee mit RHDspezifischen Bereichen eine Frequenz von unter 0,376%, entsprechend maximal einer unter 266 Proben. Bezogen auf den Phänotyp ccddee würde das bedeuten, daß maximal eine unter 42 Proben (<2,378%) RHD-spezifische Bereiche aufweisen würde.

Für das bereits als Weak D Typ 2 für den Haplotyp cDE beschriebene Allel *RHD*(G385A) [110], das von uns bei einer mit Phänotyp CcddEe bestimmten Probe des Instituts Baden-Baden gefunden wurde, wurde mit den Angaben zur Haplotypfrequenz (1:1.082) [107] die Phänotypfrequenz für die Konstellation Cde/cD^{Weak D Typ 2}E berechnet. Sie beträgt 0,002% (1:49.181) bezogen auf die Gesamtbevölkerung (nicht in Tab. 3.11 dargestellt).

4. **DISKUSSION**

4.1 Verteilung in den verschiedenen Rhesus-Haplotypen

Wir konnten mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß das Verhältnis, in dem der Haplotyp Cde im Vergleich zu cdE Allele mit RHD-spezifischen Bereichen aufweist, 6,2:1 in einer maximalen Abschätzung beträgt (Tab. 3.12). Dies stellt lediglich eine Abschätzung anhand der Daten dar, die aus der molekularbiologischen Reihenuntersuchung der RhD-negativen Proben des Instituts Ulm gewonnen wurden. Die untersuchten Sonderproben der Institute Baden-Baden und Ulm, insbesondere die Proben mit PCR-Muster Typ 8 (CcddEe) und Typ 9 (ccddEE), die beide den Haplotyp cdE zeigten, wurden in die Berechnungen nicht eingeschlossen. Ebenso wurde die Probe mit PCR-Muster Typ 5b als klassische D-Kategorie VI Typ 1 nicht eingeschlossen. Berechnet man das Verhältnis, in dem nicht-funktionale Allele, das heißt Allele, die auch mit sehr sensitiven Untersuchungsmethoden keine RhD-Antigenexpression aufwiesen, mit dem Haplotyp Cde und cdE gefunden wurden, so ergibt sich Cde:cdE = 5,2:1. Geht man von einer molekularen Veränderung, die die Funktionalität des Gens beeinträchtigt, in einem der Haplotypen CDe oder cDE als Ursache für nicht-funktionale Allele des RHD-Gens aus, so muß für die Interpretation einer Abschätzung der Haplotypverteilung solcher Allele auch die Haplotypfrequenz von CDe und cDE betrachtet werden. Diese beträgt für CDe 0,431, für cDE 0,136 [107], woraus sich ein Verhältnis von 3,2:1 ergibt. Dieses Verhältnis zeigt, daß schon allein die größere Haplotypfrequenz für CDe ein Auftreten von nicht-funktionalen Allelen des RHD-Gens mit dem Haplotyp Cde wahrscheinlicher macht. Ob der Haplotyp Cde darüber hinaus aufgrund anderer Ursachen eher prädisponiert ist, nicht-funktionale Allele des RHD-Gens aufzuweisen, konnte mit den erhaltenen Ergebnissen nicht geklärt werden.

Für den Haplotyp cde konnte eine maximale Abschätzung der Frequenz (obere einseitige 95%-Vertrauensgrenze unter der Annahme einer Poisson-Verteilung) vorgenommen werden, mit der Allele mit *RHD*-spezifischen Bereichen bei diesem Haplotyp zu erwarten sind, da unter den 314 untersuchten Proben mit Phänotyp ccddee keine derartigen Allele in der molekularbiologischen Reihenuntersuchung beobachtet wurden. Um eine genauere Angabe der Frequenz machen zu können, müßte eine größere Probenzahl des Phänotyps ccddee untersucht werden. Da die Haplotypfrequenz für cde (0,394) rund 35 mal höher als die für Cde (0,011)

| und rund 70 mal hö | her als die | e für cdE (0,00 | 56) ist, könr | nte die groß | 3e Anzahl von |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tapelle 4.1 te Supranur | g _s zu berei | tsibeschrieber "Verdun | hen Allehert" | in bezug a | auf Proben mit |
| RHD-spezifischen B | ereichen d | lieses Phänotyp | os bewirken. | Das bedeu | utet, daß eher |
| Typ/Allel .Haplotyp seitene, nicht-funktic | Bereich ¹ b male Allele | eschrieben als Innerhalb einer | molekulare l großen Bez | Jrsache ugsgruppe, | Autor wie es für den |
| Typ 1/Typ 8 Cde/cdE ² (| Ex4-In7 F 15,81% de | <i>HD-CE/</i> del <i>(3-7)-D</i> Gesamtbevo | Hybridallel/D Ikerung) ₃ der Exons 3-Intr | eletion des Fall ist, s | Blunt <i>et al.</i> [18] Schwieriger, [71] Tippet <i>et al.</i> [101] |
| finden sind, als inne | rhalb kleine | erer Bezugsgrup | ppen (vgl. dd | mit C und/ | oGerriteet1a,489 |
| der Gesamtbevölke | rung). Geh | RHD-CE(3-7)-D it man auch h | Hybridallel d ier als Ursa (3-Bereich)- | er Exons 3 Che für ni | Faas <i>et al.</i> [39:40] cht-funktionale |
| TypAglele descarHD-Ge | ns _{x3} von ei r | ad-celebubarer | n Vagsrättadieru | BIGE XOPAS 2F9+ | /AyGAn 8t bie[1577] ⁴ |
| Haplotyp cDe aus, | so muß m | nan auch dess | en Frequenz | z betrachte | Andrews <i>et al.</i> [1] n. Sie betfagt Huang [52] |
| 0,021 und ist damit i Typ 4 cdE ⁶ Ursprung nicht-funk Typ 5 cD ⁷⁷ E worden ist. Sowohl c | rund 20 ma Ex4-In7 <i>F</i> tionaler Al Ex4-5 D ler Verdünr | Il geringer als d RHD-CE(4-7)-D Ilele des RHD Typ I nungseffekt als | ie des Haplo Hybridallel d -Gens mit H Hybridallel d auch die ger | otyps CDe (er Exons 4-7 Haplotyp C er Exons 4/5 inge Haplot | 0,431), der als Faas <i>et al.</i> [38-40] Cde betrachtet Avent <i>et al.</i> [8] Sy plice:gu[53] z für |
| Typc D ⁷ e lege6 ^{de} nahe, | lofaf€×9die ^F | RHAAF Keva Freque | enzenbakamesci | heinlich we | efeassneeret ald 47] |
| RHD(NI2999)benggeOberg | nenze vonv | Ĩċã₽Ð ^l işpt₁1 | Punktmutatio | on G885T | Wagner <i>et al.</i> [109] |
| <i>RHD</i> (G385A) cDE | Ex9 V | Veak D Typ 2 | Punktmutati | on G1154C | Wagner <i>et al.</i> |

- ¹ Gaberaup rdn ungen zurliberaita Ubeschrieben erainenispetifischerti Baalen fü Alles er Hales erbracht hatte.
- ³ Dieses von Faas *et al.* [39:40] beschriebene Allel würde mit den von uns verwendeten Primern *RHD*spezifische Banden für den Bereich von Exon 3/lefern (siehe 4.2.1).
- ⁴ Darüber hinaus lag uns eine persönliche Mitteilung über die weitere molekulare Analyse dieses Allels vor [45]. Es handelte sich um einen australischen Blutspender weißer Abstammung.
- ⁵ Huang [52] beschrieb ein analoges Allel für die afrikanische Bevölkerung.
- ⁶ #fa2s1et aC[38]M0]sbescTivipb1ehT sin Bybridallel, bei dem die Exons 4-7 des RHD-Gens durch analoge Bereiche des CE-Gens ersetzt waren. Die zugehörige Probe hatte ebenfalls den Haplotyp cdE, zeigte aber zusäufzlichmeline Expression voorAntigeer GleEine aStriptesniese Reakt/Abszteignensichgbeimiter Unerersuchung des hier beschriebenen PCR-Musters Typ 4 nicht.
- suchung des hier beschriebenen PCR-Musters Typ 4 nicht.
 Beißenfvangegebenen Algehandeligesisch onseiner Studie [47], untersucht worden war. Es stellte sich heraus, daß die beschriebene Probe aus einer vorheingen Blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren Studie [47], untersucht worden war. Es stellte sich heraus, daß die beschriebene Probe aus einer vorheingen Blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren Studie for Butspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der Personen stammte, die im Rahmen der vorlie mehren blutspende einer der vo
- ⁸ derezifisgheder Beheiches SCRdMusero Type⁶ (Exagen 3 wurde nicht untersucht) und 5' von Dieses Allel wurde von Wagner *et al.* [109] mit Haplotyp cDe beschrieben (siehe 4.2.6 und 4.8.2). Exon 8 zeigte. Ob es sich hierbei um eine Deletion oder ein Hybridgen handelte, konnte nicht geklärt werden. Ebenso konnte nicht gezeigt werden, in welchem Umfang das Intron 7 von dieser Deletion oder Hybridbildung betroffen ist. Carritt *et al.* [20] beschrieben ein Allel mit einer molekularen Veränderung ähnlichen Ausmaßes für einen Spender weißer Abstammung. Faas *et al.* [40] untersuchten ebenfalls Blutproben von Spendern afrikanischer Abstammung mit Haplotyp (C)de^s und konnten mittels Sequenzanalyse von cDNA ein *RHD-CE-D* Hybridgen beschreiben, bei dem der 3'-Bereich von Exon 3 bis einschließlich Exon 7 des *RHD*-Gens durch analoge Bereiche des *CE*-Gens ersetzt waren. Dieses Allel ist sehr wahrscheinlich

mit dem bereits von Blunt et al. [18] für denselben Haplotyp und dieselbe Population beschriebenen identisch. Der von uns verwendete Primer ga31 (RHD-spezifischer "sense"-Primer für Exon 3; siehe Tab. 2.4) liegt im Exon 3 und deckt die ersten drei polymorphen Stellen an Position 361, 380 und 383 ab. Insbesondere die Position 383 (letztes Nukleotid des Primers in 3'-Richtung) ist für eine optimale Anlagerung des Primers und die Produktamplifikation wichtig. Bei dem von Faas et al. [40] beschriebenen Hybridallel waren diese drei ersten polymorphen Stellen im Exon 3 RHD-spezifisch. Lediglich die letzte polymorphe Stelle im Exon 3 an Position 455 zeigte das Nukleotid der CE-Sequenz. Somit müßte die Bruchstelle zwischen Position 383 und 455 im Exon 3 liegen. Da alle RHD-spezifischen Nukleotide, die der von uns verwendete Primer ga31 erfaßt, bei diesem Hybridallel erhalten sind (insbesondere an Position 383), wären hier RHD-spezifische Banden im untersuchten Bereich von Exon 3 zu erwarten gewesen (der zugehörige "antisense"-Primer rb21 ist nicht RHD-spezifisch, das heißt unterscheidet nicht zwischen RHDund CE-Sequenz). Das von uns bei einer Probe mit Haplotyp Cde gefundene PCR-Muster Typ 1 zeigte keine *RHD*-spezifischen Banden im Promotor, sowie im Bereich von Exon 4 bis Exon 7. Das ebenfalls bei nur einer Probe beobachtete PCR-Muster Typ 8 zeigte keine RHD-spezifischen Banden im Bereich von Exon 4 bis Exon 7. Diese Probe hatte den Phänotyp CcddEe, was keinen Rückschluß zuließ, welcher Haplotyp von dieser molekularen Veränderung betroffen ist. Beide PCR-Muster stellen aufgrund der Untersuchungsergebnisse im Promotorbereich unterschiedliche Allele dar, was bedeutet, daß zumindest eines, oder sogar beide, der von uns beschriebenen Allele einem neu-identifizierten, nicht-funktionalen RHD-Allel entspricht. Da aber der Promotor von den Beschreibern der zitierten Allele [18;20;40] nicht untersucht wurde und die Angaben zum Intron 7 keinen Anhalt geben, ob mit unserer Methode in diesem Bereich RHD-spezifische Banden zu erwarten wären, sind beide Muster mit den Angaben dieser Untersucher vereinbar. In der serologischen Aufarbeitung zeigte keine der beiden Proben ein abgeschwächtes Antigen e oder C, wie es für die Allele mit Haplotyp (C)de^s beschrieben ist. Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um zu klären, ob eines der beiden von uns beschriebenen Allele mit dem für die afrikanische Bevölkerung beschriebenen identisch ist. Sollte dies der Fall sein, so dürfte diesem Allel aufgrund der geringen Zahl von Proben, bei denen wir es beobachten konnten, für die Bevölkerung Süddeutschlands eine eher geringere praktische Bedeutung zukommen, als es eventuell für die afrikanische Bevölkerung der Fall ist. Dies läßt sich auch aufgrund

der unterschiedlichen Verteilung des Antigen VS innerhalb der afrikanischen (bei ungefähr 25% der Bevölkerung zu finden) und der europäischen Population (sehr selten, keine genauen Angaben vorhanden) vermuten [40].

4.2.2 PCR-Muster Typ 2

Von Hyland et al. [57] und Andrews et al. [1] wurde für einen australischen Blutspender weißer Abstammung mit Phänotyp CCddee ein vorhandenes Allel des RHD-Gens mit einer nicht weiter mit den verwendeten Methoden ("Southern blot") abzugrenzenden Deletion im 3'-Bereich beschrieben. Es lag uns darüber hinaus eine persönliche Mitteilung über die weitere Aufarbeitung dieser Probe (PCR und RFLP) vor [45], laut deren es sich hierbei um ein Hybridgen RHD-CE(Exon 2/3-9)-D handeln könnte (im Exon 2 konnte nicht zwischen D- und CE-Gen unterschieden werden). Von Huang [52] wurde ein mittels RT-PCR und cDNA-Sequenzanalyse identifiziertes Hybridallel RHD-CE(Exon 2-9)-D für einen Blutspender afrikanischer Abstammung mit Phänotyp CCddee beschrieben. Da sowohl der angegebene Bereich des Genaustausches als auch der zugehörige Haplotyp bei beiden Beobachtungen analog war, liegt sehr wahrscheinlich ein identisches Hybridallel zugrunde, obwohl es in zwei unterschiedlichen Populationen beobachtet wurde. Das von uns ebenfalls mit dem Haplotyp Cde gefundene PCR-Muster Typ 2 zeigt keine *RHD*-spezifischen Banden im Bereich von Exon 3-9 (Exon 2 wurde nicht untersucht) und entspricht daher sehr wahrscheinlich dem beschriebenen Hybridallel.

4.2.3 PCR-Muster Typ 4

Faas *et al.* [38-40] beschrieben für einen weißen Blutspender mit Phänotyp ccddEe und vorhandenem Antigen G ein *RHD-CE-D* Hybridgen, bei dem der Bereich von Exon 4 bis Exon 7 des *RHD*-Gens durch analoge Bereiche des *CE*-Gens ersetzt waren. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen des PCR-Musters Typ 4 überein, das keine *RHD*-spezifischen Banden im Bereich von Exon 4 bis Intron 7 zeigte. Alle Proben dieses PCR-Musters zeigten den Phänotyp ccddEe, was dem beschriebenen Allel entspricht. Bei der Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern, die gegen das Antigen G gerichtet sind (MS1; MS218 [86]), zeigte sich bei den untersuchten Proben keine positive Reaktion. In der Untersuchung zur Spezifität monoklonaler Rh-Antikörper von Delsalle *et al.* [35] zeigten diese Antikörper jedoch ebenfalls keine positive Reaktion mit Erythrozyten einer bekannten Antigen G-positiven Probe des Phänotyps ccddEe. Daher geben die von uns erhaltenen Ergebnisse keinen

eindeutigen Aufschluß darüber, ob das Antigen G bei den untersuchten Proben vorhanden ist oder nicht.

Ein ebenfalls mit dem von uns beobachteten PCR-Muster Typ 4 identisches Muster würde das bereits erwähnte (siehe 4.2.1), von Faas *et al.* [39;40] beschriebene Hybridallel liefern, bei dem der Bereich 3' von Exon 3 bis Exon 7 (oder Intron 7, wurde nicht genau angegeben) des *RHD*-Gens durch homologe Bereiche des *RHCE*-Gens ersetzt ist. Dieses Hybridallel wurde jedoch mit Haplotyp (C)de^s beschrieben. Dies macht es eher unwahrscheinlich, daß es sich bei dem von uns mit Haplotyp cdE beobachteten Allel um ein identisches Hybridgen handelt.

4.2.4 PCR-Muster Typ 5

Das von uns gefundene PCR-Muster Typ 5, das keine RHD-spezifischen Banden im Bereich Exon 4, Intron 4 sowie Exon 5 zeigte, entspricht dem von Avent et al. [8] und Huang [53] als D Kategorie VI Typ I beschriebenen RHD-CE-D Hybridgen. Wagner et al. [109] zeigten, daß unter D Kategorie VI-Proben aus Deutschland und Österreich alle gefundenen Proben des Typ I mit Haplotyp cD^{VI}E (Typ I) auftraten. Bei der von uns gefundenen Probe mit PCR-Muster Typ 5a wurde in der serologischen Routinebestimmung der Phänotyp CcddEe bestimmt, bei Typ 5b der Phänotyp ccddEe. Beide Proben wurden demnach nicht als Partial D-Phänotypen erkannt. In der von uns durchgeführten serologischen Aufarbeitung entsprach die Probe Typ 5a einer Del-Variante. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Probe um einen cD^{VI}E (Typ I)-Haplotyp mit einem Cde-Allel in *trans*-Stellung, das einen suppressiven Effekt auf die RhD-Antigenexpression ausübt und die fehlende Reaktivität mit oligoklonalen polyspezifischen und monoklonalen Anti-D Antiseren bedingt (siehe 4.8.1). Lediglich der sehr gut an D-Kategorie VI bindende Antikörper H41 ergab auch ohne Adsorption-Elution-Verfahren ein positives Ergebnis (siehe Tab. 3.6). Der Typ 5b entsprach in der serologischen Aufarbeitung einer D-Kategorie VI (positive Reaktionen mit Anti-D Blend, sowie im Anti-D-Screen mit den Antiseren 6 und 9) und wurde anhand des PCR-Musters als klassische D-Kategorie VI Typ 1 identifiziert. Diese Probe hätte schon in der serologischen Routinebestimmung als RhD-positive Probe erkannt werden müssen und stellt eine fälschlicherweise als RhD-negativ geführte Probe dar.

4.2.5 PCR-Muster Typ 6

Gassner et al. [47] beschrieben im Rahmen der Untersuchungen zur RHD/CE-Genotypisierung mittels sequenzspezifischen Primern eine RhD-negative Probe des Phänotyps CCddee, die lediglich im Exon 9 der untersuchten Bereiche keine RHD-spezifischen Banden erbracht hatte. Alle anderen der untersuchten Bereiche, insbesondere die nächstgelegenen (Exon 7 und 10), zeigten RHDspezifische Banden, der Genotyp wurde mit CCD^{nex}ee bezeichnet. Es stellte sich heraus, daß diese Probe in Zusammenarbeit mit dem Institut Ulm des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg als seltener Rhesus-Phänotyp für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt worden war. Es handelte sich hierbei um eine frühere Blutspende eines Spenders, der in der vorliegenden Untersuchung erneut aufgefallen war und als PCR-Muster Typ 6 bestimmt wurde. Alle drei Proben dieses PCR-Musters stammten von blutsverwandten Spendern, dieses Muster wurde somit in Baden-Württemberg bisher lediglich innerhalb dieser Familie beobachtet. Zusätzlich zu den beschriebenen Ergebnissen [47] konnten wir keine RHD-spezifische Banden im Bereich von Intron 7 finden, der von Gassner et al. nicht untersucht worden war. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob der Bereich von Intron 7 bis Exon 9 bei diesen Proben deletiert ist oder ein RHD-CE-D Hybridgen vorliegt. Ebenfalls konnte die Frage der fehlenden RhD-Antigenexpression bei diesen Proben mit den verwendeten Methoden nicht eindeutig beantwortet werden, da der als essentiell für die RhD-Antigenexpression erachtete Bereich von Exon 4, 5 und 7 [45;109] im "Exon-Screening" RHD-spezifische Banden erbrachte. Mögliche Erklärungen für die fehlende Antigenexpression könnten sein, daß im Falle einer Deletion des Bereiches von Intron 7 bis Exon 9 das entstandene Protein zu kurz ist oder ein für die Membranintegration des Proteins essentieller Bereich bei diesen Proben fehlt. Von Wagner et al. [110] wurde eine gewisse Bedeutung dieser Region für die Antigenexpression anhand einer im Exon 9 gefundenen Punktmutation (G1154C) beschrieben. Diese wurde bei dem mit Weak D Typ 2 bezeichneten Allel beobachtet und der von dieser Punktmutation betroffenen Aminosäure (Glycin an Position 385) wurde eine mögliche Bedeutung für eine optimale Membranintegration des RhD-Antigens zugeschrieben. Eher gegen die Annahme, daß der Bereich um Exon 9 einen für die Membranintegration essentiellen Bereich darstellen könnte, spricht die Beobachtung von Maaskant-van Wijk et al. [70]. Sie beschrieben für Spender europäischer Abstammung ein serologisch unauffälliges Antigen D trotz fehlendem PCR-Produkt für Exon 9. Daher könnten bei den von uns beobachteten Proben auch andere molekulare Ursachen die fehlende Antigenexpression bedingen, ohne daß es zu einer Veränderung der mit Oligonukleotid-Primern untersuchten polymorphen Stellen des *RHD*-Gens kommt. Dies war zum Beispiel bei den beobachteten Punktmutationen der nicht-funktionalen Allele mit PCR-Muster Typ 7 der Fall, die zu einem vorzeitigen Stopkodon führten oder Veränderungen in Spleißstellen bewirkten. Es betrifft aber auch "frameshift"-Mutationen, die eine Verschiebung des Leserahmens bewirken und dadurch ein Protein mit veränderter Primärstruktur oder ebenfalls ein vorzeitiges Stopkodon zur Folge haben. Eine weitere molekulare Abklärung dieses PCR-Musters erfolgt in einer weitergehenden Untersuchung, die nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit ist.

4.2.6 RHD(M295I)

Dieses von uns unter den Proben mit PCR-Muster Typ 7 identifizierte Allel wurde bereits von Wagner et al. [110] unter der Bezeichnung Weak D Typ 11 als Allel mit reduzierter RhD-Antigenexpression beschrieben. Es wurde in dieser Untersuchung unter 161 als Weak D charakterisierten Proben eine (Haplotyp cDe) gefunden, die diese Mutation (G885T) zeigte. Wagner et al. [110] folgerten daraus, daß das in einem transmembranalen Abschnitt gelegene Methionin an Position 295 der Aminosäuresequenz eine besondere Bedeutung für eine optimale RhD-Membranintegration haben könnte. Die von uns unter den Proben mit PCR-Muster Typ 7 gefundenen sieben Proben dieses Allels waren alle in der serologischen Routinebestimmung als RhD-negativ mit Phänotyp Ccddee bestimmt worden und entsprachen in der serologischen Aufarbeitung Del-Varianten. Es liegt daher ein zusätzlicher suppressiver Effekt des Antigen C in cis-Position auf die Antigen D-Expression vor (siehe 4.8.2). Somit handelt es sich bei diesem Allel um die erste Mutation, die in zwei unterschiedlichen Haplotypen beobachtet wurde. Das von uns mit Haplotyp CDe beobachtete Allel RHD(M295I) ist zu einem nicht unerheblichen Teil (≈0,08%) unter RhD-negativen Proben zu finden. Anhand der von uns errechneten Haplotypfrequenz für dieses Allel (1:5.961) wird ersichtlich, daß dem von uns mit Haplotyp CDe als Del-Variante identifizierten Allel RHD(M295I) eine größere praktische Bedeutung zuzumessen sein dürfte als dem von Wagner et al. [110] mit Haplotyp cDe als Weak D beschriebenen Allel (Haplotypfrequenz 1:90.909).

4.2.7 *RHD*(G385A)

Dieses Allel wurde ebenfalls schon von Wagner *et al.* [110] unter der Bezeichnung Weak D Typ 2 mit Haplotyp cDE beschrieben und wurde von ihnen als zweithäufigstes Weak D-Allel (43 von 161 untersuchten Proben mit Weak D) gefunden. Wagner *et al.* nahmen auch für die von dieser Punktmutation (G1154C) betroffene Aminosäure Glycin an Position 385 an, daß ihr eine Bedeutung für eine optimale Membranintegration des RhD-Antigens zukommt. Wir beobachteten eine Probe des Phänotyps CcddEe, sodaß wir von einem Cde/cD^{Weak D Typ 2}E-Genotyp ausgehen können. Aufgrund der deutlich positiven Reaktion mit dem Anti-D Blend in der serologischen Aufarbeitung hätte diese Probe schon in der Routinebestimmung als RhD-positiv erkannt werden müssen. Die Fehltypisierung könnte bedingt gewesen sein durch fehlende positive Reaktionen mit monoklonalen Anti-D Antiseren. Daher vermuteten wir eine zusätzliche Abschwächung der RhD-Antigenexpression bei diesem bekannten Weak D-Allel durch einen suppressiven Effekt des Antigen C in *trans*-Stellung (siehe 4.8.1).

4.3 Molekulare Ursachen der neu identifizierten, nicht-funktionalen *RHD*-Allele

4.3.1 Hybridallele/Deletionen

Die von uns in der Bevölkerung Süddeutschlands gefundenen Allele mit PCR-Muster Typ 3 und 9 sowie das unter den Proben aus Taiwan gefundene Allel mit PCR-Muster Typ 10 stellten in der Form noch nicht beschriebene, nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens dar. Bei den PCR-Mustern Typ 1 und 8 sind noch weitere Untersuchungen nötig, um zu klären, ob eines dieser Allele einem bereits beschriebenen Allel entspricht (siehe 4.2.1). Ihnen allen gemeinsam war, daß sie unter anderem keine *RHD*-spezifische Banden im Bereich von Exon 4 bis Exon 7 zeigten. Dies bestätigt die bestehende Meinung, daß der Bereich von Exon 4, 5 und 7 für eine Expression des Antigen D essentiell ist [45;109]. Insbesondere das PCR-Muster Typ 8 unterstützt diese Theorie. Hier erbrachte der Bereich von Exon 4 bis Exon 7 keine *RHD*-spezifischen Banden. Dieses Allel stellt damit die Veränderung mit dem geringsten, mit den PCR-Methoden unserer Untersuchung erfaßbaren Ausmaß unter den neu beschriebenen nicht-funktionalen Allelen dar. Für alle diese Allele konnte jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die Bereiche ohne *RHD*-spezifische Banden durch eine Deletion oder eine *RHD*-*CE-D* Hybridbildung bedingt sind. Da aber in erster Linie Genkonversion zwischen den beiden stark homologen Genen *RHD* und *RHCE* als ursächlicher Mechanismus für die Bildung vieler Polymorphismen innerhalb des Rhesus-Systems beschrieben wurde [21;22;25;54] und dadurch bedingte Hybridbildungen als Ursache sowohl für nicht-funktional Allele [38;40;52;61] als auch für zahlreiche Partial D-Phänotypen [8;12;13;53;87] aufgezeigt werden konnten, kann vermutet werden, daß den hier beschriebenen nicht-funktionalen Allelen sehr wahrscheinlich ebenfalls Hybridgene als Ursache zugrunde liegen.

4.3.2 Punktmutationen

Bei den beiden nicht-funktionalen Allelen RHD(W16X) und RHD(T330X) erzeugten die identifizierten "non-sense"-Mutationen ein vorzeitiges Stopkodon jeweils im Bereich von Exon 1 und Exon 7. Erfolgt ein Kettenabbruch (Termination) bei der Translation der mRNA an den beschriebenen Stellen, so ist für das Allel RHD(W16X) lediglich ein Peptid von 15 Aminosäuren als Produkt der Proteinbiosynthese zu erwarten. Dieses ist bei weitem zu kurz, um in irgendeiner Form antigene Eigenschaften des RhD-Antigens zeigen zu können. Für das Allel RHD(T330X) resultiert aus dem Kettenabbruch ein um 88 Aminosäuren verkürztes Protein, dem die letzten beiden transmembranären Segmente, sowie die sechste extrazelluläre Schlaufe fehlen. Es kann vermutet werden, daß bei Fehlen der letzten 88 Aminosäuren des RhD-Proteins keine Membranintegration mehr erfolgt. Eine Veränderung oder Fehlen dieser Abschnitte könnte zum Beispiel eine Störung der Komplexbildung zwischen Rh50- und RhD-Proteinen bewirken, die Voraussetzung für die Expression der Rhesusantigene ist. Diese Folgerung würde im Falle einer Deletion bei den Proben mit PCR-Muster Typ 6 (siehe 4.2.5) von den hier gefundenen Ergebnissen gefestigt werden.

Bei den Allelen *RHD*(G212V) und *RHD*(Ex8 5'G1A) führten die identifizierten "missense"-Mutationen zu veränderten Spleißstellen. Für eine, zu der bei *RHD*(G212V) identifizierten, analogen Mutation, die an der "splice site region" im Exon 5 einen Wechsel von Guanosin an Position 1 (bezogen auf die "splice site" [78]) zu Thymidin zur Folge hat, wurde von Nakai *et al.* [78] beschrieben, daß ein
Austausch des Guanosins an dieser Position in 47% der Fälle zu einem aberranten Spleißen führt. Desweiteren wurde eine derartige Mutation mit dem auch von uns gefundenen Austausch (3'G1T [78]) angegeben. Für *RHD*(Ex8 5'G1A), bei der an der "splice site region" im Intron 8 ein Wechsel von Guanosin an Position 1 (bezogen auf die "splice site" [78]) zu Adenosin resultierte, wurde von Nakai *et al.* angegeben, daß bei einem Austausch des Guanosins an dieser Position zu 100% mit aberrantem Spleißen zu rechnen ist. Sie gaben 23 Mutationen mit dem von uns gefundenen Austausch (5'G1A) an, die ein aberrantes Spleißen bedingten. Aberrantes Spleißen kann zur Folge haben, daß Exons übersprungen werden, sonst "stille" Spleißstellen durch den Verlust der eigentlichen Stelle aktiviert werden, oder daß Introns aus der Prä-mRNA nicht herausgeschnitten und zu kodierenden Bereichen werden [78]. Diese Veränderungen stellen massive Abweichungen in der Struktur des zugehörigen Proteins dar. Nach den Daten von Nakai *et al.* [78] sind daher die gefundenen Mutationen in den Spleißstellen höchst wahrscheinlich Ursache des D-negativen Phänotyps.

4.4 D_{el}-Varianten

Wir konnten drei unterschiedliche Mechanismen für die Entstehung von Del-Varianten in der Bevölkerung Süddeutschlands beschreiben und deren Frequenz angeben. Dies stellt die erste derartige Beschreibung unterschiedlicher, molekular charakterisierter Ursachen für Del-Varianten und deren Frequenzangabe für eine europäische Population anhand durch Zufallsstichprobe erhobener Daten dar. Als Mechanismen fanden wir zum einen suppressive Effekte eines C in trans-Stellung auf qualitativ und quantitativ verändertes Antigen D (PCR-Muster Typ 5a, entsprechend D Kategorie VI Typ I), zum anderen suppressive Effekte eines C in cis-Stellung auf quantitativ verändertes Antigen D [RHD(M295I), entsprechend Weak D Typ 11]. Als dritten Mechanismus fanden wir Punktmutationen [RHD(Ex3 5'G1A) und *RHD*(Ex9 5'G-1A)], die zu Veränderungen an Spleißstellen führten. Für RHD(Ex35'G1A) konnten wir eine analoge Mutation der "splice site region" im Intron 3 finden, wie sie bereits bei dem Allel RHD(Ex8 5'G1A) für Intron 8 beschrieben wurde (siehe 4.3.2). Warum die analoge Mutation im Bereich von Intron 3 zu einer stark reduzierten Antigendichte führt, wohingegen im Intron 8 ein nichtfunktionales Allel resultiert, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dies unterstreicht jedoch die bereits von uns postulierte mögliche Bedeutung des

Bereichs um Exon 9 (siehe 4.2.5 und 4.3.2) für die Expression des Antigen D an der Erythrozytenoberfläche. Nakai *et al.* [78] beschrieben, daß ein Guanosin an Position "-1" (bezogen auf die "splice site") der 5' "splice site region" bei einer Veränderung in 81% zu aberrantem Spleißen führt. Sie gaben acht Mutationen an, bei denen die Veränderung 5'G-1A [78] zu fehlerhaftem Spleißen geführt hat. Eine analoge Mutation der 5' "splice site region" fanden wir bei *RHD*(Ex9 5'G-1A) für Exon 9. Da dieses Allel ebenfalls eine reduzierte Antigendiche des Antigen D zeigte, kann vermutet werden, daß der von uns beschriebene Bereich um Exon 9, der für die Expression des Antigen D eine mögliche Bedeutung haben könnte, von dieser Mutation ebenfalls in gewissem Maße betroffen ist, auch wenn hier kein nichtfunktionales Allel, wie für *RHD*(Ex8 5'G1A) beschrieben, resultierte.

Im Vergleich der von uns errechneten Frequenzen mit den Angaben aus der Literatur für ostasiatische Populationen zeigte sich, daß bezogen auf die Gesamtbevölkerung Del-Varianten in China (0,079% [71]) rund 2,5 mal häufiger zu finden sind als in Süddeutschland (0,031%). Diese Angaben berücksichtigen jedoch nicht die großen Unterschiede in der Verteilung (scheinbar) RhD-negativer Proben bei diesen Populationen. Während für die von uns untersuchte Population ein Anteil von 17,29% für RhD-negative Proben beschrieben wurde [107], beträgt dieser Anteil lediglich 0,29% unter Blutspendern aus Hong Kong, China [71]. Vergleicht man daher den Anteil von Del-Varianten unter RhD-negativen Proben (alle mit serologischen Routinemethoden RhD-negativ bestimmten Proben) so wurde für die japanische Bevölkerung beschrieben [80], daß Del-Varianten rund 55 mal häufiger (10%) unter RhD-negativen Proben zu finden sind als von uns für die Bevölkerung Süddeutschlands gezeigt werden konnte (0,18%). Unter Blutspendern aus Hong Kong wurden D_{el}-Varianten sogar rund 160 mal häufiger (29,3% [71]) unter RhDnegativen Proben beobachtet. Diese Vergleiche betonen die großen Unterschiede, die zwischen einzelnen Populationen innerhalb des Rhesus-Systems bestehen, und verdeutlichen, daß die von uns für die Bevölkerung Süddeutschlands getroffenen Angaben nicht ohne weiteres auf außereuropäische Populationen übertragbar sind.

4.5 Validierung gängiger PCR-Strategien

4.5.1 Entwicklung einer Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR

Bei der Untersuchung von 710 Proben mit der von uns entwickelten Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR wurden für alle Proben verwertbare Ergebnisse erhalten und keine Ausfälle aufgrund technischer Probleme beobachtet. Sie stellt daher eine sehr stabile Methode zur *RHD*-Genotypisierung dar, die geeignet ist, bestimmte nicht-funktionale Allele und einzelne Partial D Kategorien, die durch Hybridbildungen in diesem Bereich bedingt sind, zu erkennen. Durch die Möglichkeit der Untersuchung von zwei Polymorphismen mittels eines Ansatzes wird diese Methode durch reduzierten Materialbedarf der Forderung nach höherer Kosteneffizienz für *RHD*-Genotypisierungsstrategien gerecht [45].

4.5.2 Vergleich mit anderen Typisierungsstrategien

Mit der von uns entwickelten Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR wären unter den untersuchten 1.039 Proben acht Fehltypisierungen (0,77%) aufgetreten. Es handelte sich hierbei um drei Proben des PCR-Musters Typ 6, sowie um fünf Proben mit PCR-Muster Typ 7 (2x*RHD*(W16X), je 1x*RHD*(G212V), *RHD*(T330X) und *RHD*(Ex8 5'G1A)), die fälschlich RhD-positiv bestimmt worden wären. Im Vergleich dazu sind bei der serologischen Routinetypisierung 19 Fehltypisierungen (1,83%) unter diesen Proben aufgetreten. Es handelte sich hierbei um die RhD-Varianten mit reduzierter Antigendichte (Weak D, DIM, D_{el}) sowie um eine klassische D-Kategorie VI Typ 1, die nicht als RhD-positive Proben erkannt wurden (siehe Tab. 4.2). Dies verdeutlicht, daß bei Untersuchungen von RhD-negativen Proben mit vorhandenem Antigen C und/oder E, mit der Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR nur etwa 2/5 der Fehltypisierungen zu erwarten wären, die mit den derzeit verwendeten serologischen Routinemethoden tatsächlich aufgetreten sind.

Es wurde ein Vergleich unserer Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR mit anderen, in der Literatur beschriebenen Genotypisierungsstrategien für den von uns untersuchten Probenbestand angestellt (Tab. 4.3). Es zeigte sich eine Überlegenheit unserer Methode gegenüber den Untersuchungen einzelner Polymorphismen (Exon 10, Intron 4). Keinen weiteren Informationsgewinn im Vergleich zur Intron 4/Exon 7-PCR bei dem von uns untersuchten Probenbestand lieferte die zusätzliche Untersuchung von Exon 5 oder Exon 10. Eine niedrigere Fehltypi-

Tabelle 4.2: Beobachtete Fehltypisierungen mit der Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCRoderdenserologischenRoutinemethodenimuntersuchtenProbenbestand

| | Fehltypisierte Proben | Fehltypisierungen | | |
|-----------------|------------------------|-------------------|----------------|----------------|
| Methode | | n ¹ | % ² | % ³ |
| Intron 4/Exon 7 | Тур 6 | 3 | 0,29 | 0,41 |
| falsch-positiv | <i>RHD</i> (W16X) | 2 | 0,19 | 0,28 |
| · | <i>RHD</i> (G212√) | 1 | 0,10 | 0,14 |
| | <i>RHD</i> (T330X) | 1 | 0,10 | 0,14 |
| | <i>RHD</i> (Ex8 5'G1A) | 1 | 0,10 | 0,14 |
| gesamt | | 8 | 0,77 | 1,10 |

Tabelle 4.3: Vergleich von Fehltypisierungen der Intron 4/Exon 7-Multiplex PCR mit anderen PCR-Strategien anhand des untersuchten Probenbestandes

| | - | F | ehltypisierung | gen | _ |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Untersuchter Bereich | PCR-Aufbau ¹ | n ² | % ³ | % 4 | Literaturstellen |
| Intron 4/Exon 7 ⁵ | multiplex | 8 | 0,77 | 1,10 | vorliegende Arbeit |
| Exon 10 ⁶ | einzel | 25 | 2,41 | 3,45 | 15;36;64;65;102 |
| Intron 4 ⁵ | einzel | 10 | 0,96 | 1,37 | 4;85;114 |
| Exon 7 Intron 4 ⁵ /Exon 10 ⁶ Intron 4 ⁵ /Exon 5/Exon 7 Intron 4 ⁵ /Exon 7/Exon 10 ⁶ | einzel multiplex entfällt einzel | 8 8 8 | 0,77 0,77 0,77 0,77 | 1,10 1,10 1,10 1,10 | 92;104;105;113 9;82;98 Vorschlag in 45 93;95 |
| Exon 3, 4, 5, 6, 7, 9 Exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 ⁶ Exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 ⁶ | multiplex einzel multiplex | 5 5 5 | 0,48 0,48 0,48 | 0,69 0,69 0,69 | 69 47 77 |

¹ einzel – Einzelansätze; multiplex – Multiplexansatz

² Anzahl

. .

³ Fehltypisierungen unter den von uns untersuchten 1.039 Blutproben, die mit serologischen Routinemethoden RhD-negativ bestimmt worden waren.

⁴ Fehltypisierung unter den von uns untersuchten 725 RhD-negativen Blutproben mit vorhandenem Antigen C und/oder E.

⁵ Es ergibt sich keine Änderung, falls Exon 4 anstelle von Intron 4 untersucht würde.

⁶ Es wurde der Bereich 3'UTR von Exon 10 untersucht.

spezifische Primer zur Detektion der diesem Allel zugrundeliegenden Mutation G48A im Exon 1 konzipieren, könnte die Fehltypisierungsrate bei den von uns untersuchten Proben auf 0,29% gesenkt werden. Da aber der Anteil an nichtfunktionalen Allelen mit PCR-Muster Typ 7 insgesamt nur etwa 0,057% unter den RhD-negativen Proben und 0,67% unter den RhD-negativen Proben mit C und/oder E beträgt, scheint der beträchtliche Mehraufwand bei der Untersuchung dieser Mutationen für eventuelle zukünftige Routinetypisierungen mittels PCR nicht unbedingt erforderlich zu sein. Dennoch kommt den von uns identifizierten

untersuchten Probenbestand

| | | Fehlty | /pisieru | ungen |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|----------------|
| Anzahl der PCR- Reaktionen | Untersuchte Bereiche | n 1 | % ² | % ³ |
| 2 | Intron 4/Exon 7 | 8 | 0,77 | 1,10 |
| 3 | Intron 4/Exon 7/Exon 9 ⁴ | 5 | 0,48 | 0,69 |
| 4 | Intron 4/Exon 7/Exon 9 ⁴ /Exon 1(G48A) | 3 | 0,29 | 0,41 |
| 5 | Intron 4/Exon 7/Exon 9 ⁴ /G48A/Exon 5(G635T) ⁵ | 2 | 0,19 | 0,28 |
| 6 | Intron 4/Exon 7/Exon 9 ⁴ /G48A/G635T/Exon 7(C990G) ⁶ | 1 | 0,10 | 0,14 |
| 7 | Intron 4/Ex 7/Ex 9 ⁴ /G48A/G635T/C990G/Intron 8 (g1153+1a) | 0 | 0 | 0 |

¹ Anzahl.

² Fehltypisierungen unter den von uns untersuchten 1039 Blutproben, die mit serologischen Routinemethoden RhD-negativ bestimmt worden waren.

³ Fehltypisierung unter den von uns untersuchten 725 RhD-negativen Blutproben mit vorhandenem Antigen C und/oder E.

⁴ Oder die noch zu klärende molekulare Ursache für das nicht-funktionale Allel mit PCR-Muster Typ 6.

⁵ Alternativ könnten an dieser Stelle die Punktmutationen in Exon 7 (C990G) oder Intron 8 (g1153+1a) untersucht werden.

⁶ Älternativ könnte an dieser Stelle die Punktmutation in Intron 8 (g1153+1a) untersucht werden.

molekularen Ursachen für nicht-funktionale Allele bei der Untersuchung einzelner Untergruppen (RhD-negative Proben mit C und/oder E) eine besondere Bedeutung zu.

4.7 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Populationen

Wie der für D_{el}-Varianten geführte Vergleich (4.4) verdeutlicht, lassen sich die von uns für die Bevölkerung Süddeutschlands gefundenen Frequenzangaben nicht ohne weiteres auf andere Populationen übertragen. Hierzu wären ähnliche Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit unter den entsprechenden Bevölkerungsgruppen notwendig. Eine derartige Studie wird derzeit von Maaskant-van Wijk *et al.* [70] durchgeführt.

Es ließen sich dennoch ähnliche molekulare Zusammenhänge für die Entstehung nicht-funktionaler Allele des *RHD*-Gens bei anderen Populationen beobachten. Ein dem von uns gefundenen PCR-Muster Typ 6 analoges Muster wurde unter den Proben des SCARF Exchange mit Haplotyp CdE identifiziert. Da das Muster Typ 6 unter unseren Proben mit Haplotyp Cde gefunden wurde, muß vermutet werden, sofern die Angaben des SCARF Exchange zum Haplotyp zutreffen, daß es sich hierbei nicht um ein identisches Allel handelt. Dies würde unsere Vermutung bekräftigen, daß der Bereich um Exon 9 für die Expression des Antigen D eine gewisse Bedeutung haben könnte (siehe 4.2.5, 4.3.2 und 4.4). Sollte es sich bei der Probe des SCARF Exchange um den ebenfalls möglichen und anhand der Haplotypfrequenzen viel wahrscheinlicheren Genotyp Cde/cdE handeln, so müßte vermutet werden, daß es sich um ein identisches Allel ebenfalls mit Haplotyp Cde handelt. Dies würde dafür sprechen, daß das Allel mit PCR-Muster Typ 6 nicht nur innerhalb einer Familie in Süddeutschland gefunden werden kann, sondern auch bei außereuropäischen Blutproben. Dadurch erhielt eine zusätzlich zur Intron 4/Exon 7-PCR durchgeführte Untersuchung von Exon 9, beziehungsweise der noch zu klärenden molekularen Ursache für die Nicht-Funktionalität dieses Allels, eine größere Bedeutung (siehe 4.6).

Unter den Proben aus der Bevölkerung Taiwans wurde ebenfalls ein bereits von uns identifiziertes PCR-Muster (Typ 2) bei einer Probe mit demselben Phänotyp (Ccddee) gefunden. Es dürfte sich daher um ein identisches Allel handeln. Desweiteren konnte das neue Muster Typ 10 unter diesen Proben identifiziert werden. Dies zeigt, daß offensichtlich auch in anderen Populationen weitere Genkonversionen als Ursachen für nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens zu finden sind.

Unter den D_{el}-Phänotypen aus Taiwan konnten wir die für diese Population als Ursache beschriebene Deletion des Bereichs um Exon 9 [27] nicht finden. Vielmehr ist zu vermuten, daß ähnliche Mechanismen wie die unter der Bevölkerung Süddeutschlands gefundenen (Mutationen in Spleißstellen, suppressive Effekte auf Weak D-Phänotypen) auch als mögliche Ursachen für D_{el}-Phänotypen in Taiwan zugrunde liegen. Dennoch entspricht die beschriebene Deletion des Bereichs um Exon 9 mit resultierender stark herabgesetzter Antigendichte den von uns gefundenen Ergebnissen, die diesem Bereich eine gewisse Bedeutung für die Antigen D-Expression zukommen lassen. Es bedarf jedoch noch weiterer Klärung der konkreten molekularen Ursachen, die zur Bildung von D_{el}-Phänotypen bei dieser Population führen.

4.8 Suppressiver Effekt durch das C-Allel

4.8.1 C in trans-Stellung

Die Probe mit PCR-Muster Typ 5a, die als RhD-negativ mit Phänotyp CcddEe bestimmt worden war, wurde im "Exon-Screening" als D Kategorie VI Typ I identifiziert. Dieser Typ wurde in der Bevölkerung Deutschlands und Österreichs bisher nur mit dem Haplotyp cD^{VI}E (Typ I) gefunden [109]. Daher läßt sich folgern, daß das Cde-Allel in *trans*-Stellung einen suppressiven Effekt auf das cD^{VI}E (Typ I)-Allel hat. Dies äußert sich in einer Reaktionsstärke, die der einer D_{el}-Variante entspricht.

Das unter den Sonderproben des Instituts Baden-Baden gefundene Allel *RHD*(G385A) war bereits als Weak D Typ 2 mit Haplotyp cDE beschrieben worden [110]. In der serologischen Aufarbeitung der von uns gefundenen Probe (ursprünglich bestimmter Phänotyp CcddEe) zeigte sich eine schwächere Reaktivität, als für eine Probe mit Weak D zu erwarten gewesen wäre. Wir folgerten daher, daß ein suppressiver Effekt von einem C in *trans*-Stellung bei der vorliegenden Konstellation Cde/cD^{Weak D Typ 2}E ausging. Die daraus resultierende reduzierte Antigendichte war sehr wahrscheinlich die Ursache für die vorausgegangene Fehltypisierung des RhD-negativen Phänotyps bei dieser Probe.

Suppressive Effekte eines C in *trans*-Stellung auf das Antigen D wurden bereits in der Literatur beschrieben [26;106] und konnten auch für die von uns gefundenen Proben gezeigt werden. Die Identifikation dieser Allele gelang lediglich mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungsverfahren, die in diesem Fall eindeutig den serologischen Routinemethoden überlegen waren. Dies zeigt, daß die derzeit noch bestehenden fließenden Übergänge für die Nomenklatur und der serologischen Bestimmung quantitativer Veränderungen des Antigen D (Weak D – D_{el}-Varianten – Partial D mit reduzierter Antigendichte) durch möglicherweise zukünftig eingesetzte molekularbiologische Verfahren der Typisierung neu festgelegt und definiert werden müssten.

4.8.2 C in *cis*-Stellung

Bei den serologisch aufgearbeiteten Proben des Allells RHD(M295I), das bereits als Weak D Typ 11 beschrieben worden war [110], zeigte sich keine eindeutig positive Reaktion bei der Unterrsuchung mit oligoklonalen polyspezifischen und monoklonalen Anti-D Antiseren. Ein eindeutiger Nachweis einer Antigen D-Expression gelang lediglich mit einem sehr sensitiven Adsorption-Elution-Verfahren, mit dem die Proben als D_{el}-Phänotypen identifiziert werden konnten. Da die Weak D Typ 11 Proben aus der Untersuchung von Wagner *et al.* [110] mit Haplotyp cDe beschrieben sind, alle Proben dieses Allels aus der vorliegenden Arbeit jedoch mit dem Phänotyp Ccddee bestimmt worden waren, konnte vermutet werden, daß hier ebenfalls ein suppressiver Effekt vom C ausgeht. Um zu klären, ob dies durch ein Cde-Allel in *trans*-Stellung verursacht wurde, gingen wir bei dem folgenden Rechenweg von dieser Konstellation aus. Die Haplotypfrequenz für Cde ist bekannt [107], die für den cD^{Weak D Typ 11}e-Haplotyp sei unbekannt:

Cde/cDWeak D Typ 11angenommene Konstellation0,011hHaplotypfrequenzen

Die Phänotypfrequenz des Allels *RHD*(M295I) lag in unserer Untersuchung bei 1:7.488, demnach muß folgende Bedingung erfüllt sein:

0,011 x h x 2 =
$$\frac{1}{7.488}$$
 \Rightarrow h = 0,00607 \cong 1:165

Nach Auflösung ergibt sich demnach für die unbekannte Haplotypfrequenz h des angenommenen cD^{Weak D Typ 11}e -Haplotyps 1:165 (0,00607). Errechnet man nun die Phänotypfrequenz des in der Untersuchung von Wagner *et al.* beschriebenen Allels aus den Haplotypfrequenzen von cde und der errechneten für cD^{Weak D Typ 11}e, so ergibt sich für die Konstellation cde/cD^{Weak D Typ 11}e eine Frequenz von 1:209 (0,00478). Vergleicht man diese errechnete Phänotypfrequenz mit der des Phänotyps ccD.ee, die 1:60 (0,01655) beträgt, so müßten rund 30% aller Proben dieses Phänotyps das Allel *RHD*(M295I) und somit einen Weak D-Phänotyp aufweisen. Von Wagner *et al.* [107] wurden unter der Bevölkerung Süddeutschlands mit dem Phänotyp ccD.ee hingegen nur bei 0,45% (40 von 8.816 Proben) ein Weak D gefunden. Da die von uns errechnete Abschätzung für einen Weak D-Phänotyp um den Faktor 66 über der tatsächlich gefundenen Quote aller Weak D-Phänotypen innerhalb der untersuchten Population liegt, muß die Grundannahme eines C in *trans*-Stellung falsch sein und verworfen werden. Somit wurde der Beweis erbracht, daß es sich hier um ein C in *cis*-Stellung und daher um den Haplotyp CD^{Weak D Typ 11}e

handeln muß. Es konnte demnach erstmals anhand einer identischen, molekular charakterisierten Mutation gezeigt werden, daß ein C in *cis*-Stellung ebenfalls einen suppressiven Effekt auf die Epitopdichte des Antigen D hat. Bisher beschriebene Vermutungen für einen solchen Effekt [3] konnten wir erstmals molekular belegen und rechnerisch ableiten.

4.9 Schlußfolgerungen

Wir konnten mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen, daß nicht-funktionale Allele des RHD-Gens bei RhD-negativen Proben vornehmlich in der Gruppe der Proben mit vorhandenem Antigen C und/oder E auftreten. Es scheint, daß nichtfunktionale Allele in erster Linie durch RHD-CE-D Hybridgene verursacht sind. Dabei konnte die Vermutung, daß der Bereich von Exon 4 bis Exon 7 des RHD-Gens für die Expression des Antigen D wichtig ist [45;109], mit unseren Ergebnissen bestärkt werden. Desweiteren kommen zu einem geringen Anteil unter den RhD-negativen Proben auch nicht-funktionale Allele mit Punktmutationen im RHD-Gen vor, die mit allen derzeit verwendeten Genotypisierungsstrategien als RhD-positv bestimmt werden würden. Del-Phänotypen sind auch bei Populationen weißer Abstammung zu einem nicht unerheblichen Anteil unter RhD-negativen Proben zu finden. Hierbei gibt es mehrere Mechanismen, die zur Bildung von Del-Phänotypen führen. Insbesondere zusätzliche suppressive Effekte eines C sowohl in trans- als auch in cis-Stellung auf die abgeschwächte Expression des Antigen D bei Weak D-, aber auch bei Partial D-Phänotypen sind eine häufige Ursache. Dem Bereich um Exon 9 scheint eine gewisse Bedeutung für eine optimale Expression des Antigen D zuzukommen. Weitere Untersuchungen der molekularen Ursachen sind jedoch nötig, um zu klären, ob dieser Bereich für zukünftige Genotypisierungsstrategien mit berücksichtigt werden sollte. Die von uns entwickelte Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR stellt eine stabile und kosteneffiziente Methode zur RHD-Genotypisierung dar, deren Spezifität von den am häufigsten gefundenen nicht-funktionalen Allelen des RHD-Gens nicht beeinträchtigt wird. Eine Deletion des Bereiches um Exon 9 des RHD-Gens scheint nicht die Ursache für Del-Varianten in Ostasien zu sein. Dies steht allerdings im Gegensatz zu den Daten einer diesbezüglichen Publikation [27]. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen zur Klärung der molekularen Zusammenhänge, die zur Entstehung von D_{el}-Phänotypen bei dieser Population führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Zusammenfassung

Es werden derzeit für Genotypisierungen häufig PCR-gestützte Techniken herangezogen, die kurze, sogenannte diagnostische Sequenzen eines Gens nachweisen. Aufgrund seiner großen klinischen Bedeutung werden derartige Techniken, insbesondere in der Pränataldiagnostik, auch für den Nachweis des *RHD*-Gens zur Bestimmung des Phänotyps eingesetzt. Ein großes Problem bei *RHD*-Genotypisierungen stellen nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens dar, die von gängigen PCR-Verfahren nicht erkannt werden und somit deren Spezifität begrenzen. Es existieren derzeit keine populationsbezogenen Angaben zur Häufigkeit solcher nicht-funktionaler Allele, ebenso ist über deren molekulare Ursachen nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden unter 1.039 serologisch RhD-negativ bestimmten Blutspenden aus Baden-Württemberg mit Hilfe von PCR-SSP-Technik nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens sowie Varianten mit stark reduzierter Antigenexpression (D_{el}) identifiziert. Es erfolgte sowohl eine Analyse der molekularen Ursachen mittels SSP-PCR und genomischer Sequenzierung aller zehn Exons des *RHD*-Gens als auch eine Auswertung zur Angabe der Frequenz dieser Allele für die untersuchte Population. Dies stellt die erste derartige Beschreibung für eine Population anhand zufällig ausgewählter Probanden dar.

Elf unterschiedliche nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens wurden identifiziert, von denen der größte Teil durch *RHD-CE-D* Hybridgene bedingt ist, bei denen unter anderem der Bereich von Exon 4 bis Exon 7 ausgetauscht ist. Ein Allel, das unter drei Individuen einer Familie gefunden wurde, zeigte keine *RHD*-spezifischen Banden in Intron 7 und Exon 9, wobei unklar ist, ob ebenfalls ein Hybrid oder eine Deletion in diesem Bereich vorliegt. Desweiteren wurden vier Allele mit Punktmutationen, die bei zweien ein vorzeitiges Stopkodon, bei zweien veränderte Spleißstellen bewirkten, gefunden. Als Ursachen für D_{el}-Varianten konnten einerseits zusätzliche suppressive Effekte eines C sowohl in *trans*- auf qualitativ als auch in *cis*-Stellung auf quantitativ verändertes Antigen D beschrieben werden. Andererseits resultierte der D_{el}-Phänotyp bei zwei Allelen aus Punktmutationen, die veränderte

Spleißstellen bewirkten. Sämtliche Allele wurden unter RhD-negativen Proben mit vorhandenem Antigen C und/oder E gefunden. Hierbei war der Haplotyp Cde im Vergleich zu cdE im Verhältnis 6,2:1 Träger von Allelen mit *RHD*-spezifischen Bereichen. Die Frequenz von nicht-funktionalen Allelen des *RHD*-Gens wurde mit 1:27 in einer maximalen Abschätzung unter RhD-negativen Individuen mit vorhandenem Antigen C und/oder E bestimmt. Für D_{el}-Phänotypen wurde eine Frequenz von 1:48 unter diesen RhD-negativen Proben bestimmt.

Nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens sind in erster Linie durch *RHD-CE-D* Hybridgene bedingt. Daneben findet man zu einem weitaus geringeren Teil auch Punktmutationen, die zu einem vorzeitigen Stopkodon oder veränderten Spleißstellen geführt haben. D_{el}-Varianten sind auch unter RhD-negativen Blutspendern aus Süddeutschland in gewissem Umfang zu finden und konnten auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden. Insgesamt weist der Haplotyp Cde häufiger Allele mit *RHD*-spezifischen Sequenzen auf als der Haplotyp cdE. Die von uns entwickelte Intron 4/Exon 7-Multiplex-PCR ist geeignet, durch Hybride bedingte, nicht-funktionale Allele des *RHD*-Gens als RhD-negativ zu erkennen. Diese Methode weist eine Fehltypisierungsrate von ungefähr einem in 90 RhD-negativen Individuen mit C und/oder E auf. Eine Verminderung dieser Fehltypisierungsrate ließe sich durch zusätzliche Untersuchung von Exon 9, dem eine Bedeutung für die Antigen D-Expression zuzukommen scheint, erreichen.

5.2 Summary

Frequency of non-functional alleles of the *RHD* gene and causes for the missing antigen expression

Current PCR-based strategies for Rhesus D phenotype prediction often fail when non-functional alleles of the *RHD* gene are encountered. The existence of such mutations of the *RHD* gene had been described, but no detailed population-based data on their frequency had been published yet. In a random survey, we screened 1.039 serologically RhD negative typed blood donors from Southwest Germany for the promoter region, intron 4, exon 7 and exon 10 (3'UTR) of the *RHD* gene by PCR-SSP. Using this survey we determined the population frequency of the detected nonfunctional alleles as well as of variants with very weak D antigen (D_{el}) that were found among RhD negative donors due to their lack of agglutination by prevalent serology based techniques. We examined the underlying molecular causes for these alleles by applying PCR-SSP and by sequencing all ten *RHD* exons. Eleven different non-functional alleles and four alleles resulting in D_{el} phenotype were identified, all found within the group of RhD negative donors with additional C and/or E antigen. Most non-functional alleles had been caused by RHD-CE-D hybrid genes with replacement of at least exon 4 to exon 7. One allele showed no RHD-specific sequences for intron 7 and exon 9, which may be due to a deletion or an hybrid gene. We found point mutations in four alleles, two resulting in premature stop codons and two in altered splice-sites. One cause of the Del phenotype was the suppressive effect of a C in trans-position on a partial D as well as of a C in cisposition on a weak D phenotype. Other causes were point mutations in two alleles resulting in altered splice-sites. The frequency of non-functional alleles at the RHD gene locus was calculated as 1:27 as a maximum estimate among RhD negative donors with additional C and/or E antigen. For the same group of donors we calculated the frequency of D_{el} phenotypes as 1:48. The haplotype Cde harboured alleles with *RHD*-specific sequences in a 6,2:1 ratio compared with the haplotype cdE. Our results are in congruence with the common assumption that gene conversion events between at least exon 4 to exon 7 of RHD and RHCE gene are the main cause of non-functional alleles at the RHD gene locus. In addition we provided further information on different underlying molecular mechanisms for nonfunctional alleles as well as for D_{el} phenotype and their frequencies in Southwest Germany. We concluded from our results, that parts of the RHD gene around exon 9 may be important for an optimal RhD membrane integration. The intron 4/exon 7 multiplex PCR-assay developed by us is a cost-efficient and useful method to confirm non-functional alleles of the RHD gene due to gene conversion events as RhD negative phenotype with a low rate of mistypings. This rate could even be diminished by additional testing for exon 9.

6. LITERATUR

- Andrews KT, Wolter LC, Saul A, Hyland CA: The RhD⁻ trait in a white patient with the RhCCee phenotype attributed to a four-nucleotide deletion in the *RHD* gene (Leserzuschrift). Blood 92: 1839-1840 (1998)
- Andrews KT, Wolter LC, Saul A, Hyland CA: Analysis of the *RH D* gene in an Rh D negative donor (Abstrakt). Vox Sang 74: 53 (1998)
- Araszkiewicz P, Szymanski IO: Quantitative studies on the Rh-antigen D. Effect of the C gene. Transfusion 27: 257-261 (1987)
- Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM: Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative Individuals. Blood 82: 651-655 (1993)
- 5. Arriaga F, de la Rubia J, Larrea L, Carpio N, Marty ML: Mild hemolytic disease of the newborn due to anti-Go^a (Leserzuschrift). Transfusion 39: 537 (1999)
- Aubin JT, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, Brossard Y, Cartron JP: Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. Br J Haematol 98: 356-364 (1997)
- Avent ND, Jones LW, Liu W, Scott ML, Voak D, Flegel WA, Wagner FF, Green C: Molecular Bases of the D variant phenotypes DNU and D^{II} allows localisation of critical amino acids required for expression of Rh D epitopes epD3, 4 and 9 to the sixth external domain of the Rh D protein. Br J Haematol 97: 366-371 (1997)
- Avent ND, Liu W, Jones JW, Scott ML, Voak D, Pisacka M, Watt J, Fletcher A: Molecular analysis of Rh transcripts and polypeptides from individuals expressing the D^{VI} variant phenotype: an *RHD* gene deletion event does not generate all D^{VI}ccEe phenotypes. Blood 89: 1779-1786 (1997).
- Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, Maddocks D, Urbaniak SJ: Evidence of genetic diversity underlying Rh D⁻, weak D (D^u), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the *RHD* gene. Blood 89: 2568-2577 (1997)
- Avent ND: Human erythrocyte antigen expression: its molecular basis. Br J Biomed Sci 54: 16-37 (1997)
- Beckers EAM, Faas BHW, Overbeeke MAM, von dem Borne AEGK, van Rhenen DJ, van der Schoot CE: Molecular aspects of the weak-D phenotype. Transfusion 35(suppl): 50S(S198) (1995)
- Beckers EAM, Faas BHW, Ligthart P, Simsek S, Overbeeke MAM, von dem Borne AEGK, van Rhenen DJ, van der Schoot CE: Characterizytion of the hybrid *RHD* gene leading to the partial D category IIIc phenotype. Transfusion 36: 567-574 (1996)

- Beckers EAM, Faas BHW, Simsek S, Overbeeke MAM, Van Rhenen DJ, Wallace M, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE: The genetic basis of a new partial D antigen: D^{DBT}. Br J Haematol 93: 720-727 (1996)
- Beckers EAM, Faas BHW, Ligthart P, Overbeeke MA, von dem Borne AE, van der Schoot CE, van Rhenen DJ: Lower antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the RHD gene. Transfusion 37: 616-623 (1997)
- 15. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM, Chérif-Zahar B, Fisk NM, Cartron JP: Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. N Engl J Med 329: 607-610 (1993)
- Bennett PR, Cartron JP: Prenatal determination of fetal RhD type (reply). N Engl J Med 330: 795-796 (1994)
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci USA 93: 705-708 (1996)
- Blunt T, Daniels G, Carritt B: Serotype switching in a partially deleted RHD gene. Vox Sang 67: 397-401 (1994)
- 19. Bowman JM, Pollack JM: Amniotic fluid spectrophotometry and early delivery in the management of erythroblastosis fetalis. Pediatrics 35: 815-835 (1965)
- Carritt B, Steers FJ, Avent ND: Prenatal determination of fetal RhD type. Lancet 344: 205-206 (1994)
- 21. Carritt B, Kemp TJ, Poulter M: Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled. Hum Mol Gen 6: 843-850 (1997)
- 22. Cartron JP: Defining the Rh blood group antigens. Biochemistry and molecular genetics. Blood Rev 8: 199-212 (1994)
- 23. Cartron JP, Rouillac C, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y: Tentative model for the mapping of D epitopes on the RhD polypeptide. Transfus Clin Biol 6: 497-503 (1996)
- 24. Cartron JP: Rh DNA-Coordinator's report. Transfus Clin Biol 6: 491-495 (1996)
- Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, Chérif-Zahar B, Matassi G, Bertrand O, Colin Y: Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. Vox Sang 74: 29-64 (1998)
- Ceppellini R, Dunn LC, Turry M: An interaction between alleles at the Rh locus in man which weakens the reactivity of the Rho factor (D^u) (Leserzuschrift). Proc Natl Acad Sci USA 41: 283 (1955)
- Chang JG, Wang JC, Yang TY, Tsan KW, Shih MC, Peng CT, Tsai CH: Human RhD^{el} is caused by a deletion of 1,013 bp between introns 8 and 9 including exon 9 of RHD gene (Leserzuschrift). Blood 92: 2602-2604 (1998)
- Chavez GF, Mulinare J, Edmonds LD: Epidemiology of Rh haemolytic disease of the newborn in the United States. JAMA 265: 3270-3274 (1991)

- Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, Salmon C, Cartron JP, Colin Y: Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. Proc Natl Acad Sci USA 87: 6243-6247 (1990)
- 30. Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, Raynal V, Cartron JP, Collin Y: Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood group CcEe antigens and characterization of the promotor region. Genomics 19: 68-74 (1994)
- Chérif-Zahar B, Bony V, Steffensen R, Gane P, Raynal V, Goosens D, Laursen JS, Varming K, Jersild C, Cartron JP: Shift from Rh-positive to Rh-negative phenotype caused by a somatic mutation within the *RHD* gene in a patient with chronic myelocytic leukaemia. Br J Haematol 102: 1263-1270 (1998)
- Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP: Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. Blood 78: 2747-2752 (1991)
- Daniels G, Green C, Smart E: Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans (Leserzuschrift). Lancet 350: 862-863 (1997)
- Daniels G, Green CA, Smart E, Daka A, Malde R: *RHD* is common in Rh D-negative Africans (Abstrakt). Vox Sang 74: 1435 (1998)
- Delsalle A, Bendik B, Mannessier L: Serological investigation of Rh antibodies other than anti-D. Transfus Clin Biol 6: 381-384 (1996)
- Dildy GA, Jackson GM, Ward K: Determination of fetal RhD status from uncultured amniocytes. Obstet Gynecol 88: 207-210 (1996)
- Eshleman JR, Shakin-Eshleman SH, Church A, Kant JA, Spitalnik SL: DNA typing of the human MN and Ss blood group antigens in amniotic fluid and following massive transfusion. Am J Clin Path 103: 353-357 (1995)
- Faas BHW, Beckers EAM, Simsek S, Overbeeke MAM, Pepper R, van Reinen DJ, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE: Involvement of Ser103 of the Rh polypeptides in G epitope formation. Transfusion 36: 506-511 (1996)
- Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MAM, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE: Weak Rh C associated with VS expression in black donors results from a hybrid RH-D-CE-D gene (Abstrakt). Vox Sang 74: 73 (1996)
- Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MAM, Zondervan HA, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE: Molecular background of VS and weak C expression in blacks. Transfusion 37: 38-44 (1997)
- Faas BHW, Beuling EA, Christiansen GCML, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE: Detection of fetal *RHD*-specific sequences in maternal plasma (Leserzuschrift). Lancet 352: 1196 (1998)
- Fasman GD: Nomenclature. In: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3. Auflage, Proteins Volume I, CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 3-110 (1975)

- 43. Fisk NM, Bennett P, Warwick RM, Letsky EA, Welch R, Vaughan JI, Moore G: Clinical utility of fetal RhD typing in alloimmunized pregnancies by means of polymerase chain reaction on amniocytes or chorionic villi. Am J Obstet Gynecol 171: 50-54 (1994)
- Flegel WA: Häufigkeit sporadischer nicht-funktionaler Allele und ihre Bedeutung für die Genotypisierung am Beispiel des Polymorphismus im *FUT1*-Blutgruppengen. Medizinische Habilitationsschrift, Universität Ulm 1997
- Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C: Rhesus phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. Transfus Med 8: 281-302 (1998)
- Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, Nagao N, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H: Further analysis of D_{el} (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with *RHD* gene-specific primers. Transfus Med 7: 227-231 (1997)
- Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Müller TH, Wagner FF, Flegel WA, Schönitzer D: *RHD/CE* typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. Transfusion 37: 1020-1026 (1997)
- Ghidini A, Sepulveda W, Lockwood CJ, Romero R. Complications of fetal blood sampling. Am J Obstet Gynecol 168: 1339-1344 (1993)
- Gorick B, McDougall DCJ, Ouwehand WH, Overbeeke MAM, Tippett P, Hughes-Jones NC, van Rhenen DJ: Quantitation of D sites on selected 'weak D' and 'partial D' red cells. Vox Sang 65: 136-140 (1993)
- 50. Hazenberg CA, Beckers EAM, Overbeeke MAM: Hemolytic disease of the newborn caused by alloanti-D from an R₀^{Har}r Rh:33 mother (Leserzuschrift). Transfusion 36: 478-479 (1996)
- Hessner MJ, Agostini TA, Bellissimo DB, Endean DJ, McFarland JG: Evaluation of RhD status by allele-specific polymerase chain reaction (ASPCR) using four different regions of the RhD gene (Abstrakt). Blood 88, Supplement 1: 714 (1996)
- 52. Huang CH: Alteration of *RH* gene structure and expression in human dCCee and DC^w-red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. Blood 88: 2326-2333 (1996)
- 53. Huang CH: Human D^{VI} category erythrocytes: correlation of the phenotype with a novel hybrid RhD-CE-D gene but not an internally deleted RhD gene. Blood 89: 1834-1839 (1997)
- 54. Huang CH: Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. Curr Opin Hematol 4: 94-103 (1997)
- Huang CH, Chen Y, Reid ME, Seidl C: Rh_{null} Disease: The amorph type results from a novel double mutation in RhCe gene on D-negative background. Blood 92: 664-671 (1998)
- 56. Huang CH: The human Rh50 glycoprotein gene. J Biol Chem 273: 2207-2213 (1998)
- 57. Hyland CA, Wolter LC, Saul A: Three unrelated Rh D gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus CCee (r'r') phenotypes. Blood 84: 321-324 (1994)
- Hyland CA, Chérif-Zahar B, Cowley N, Raynal V, Parkes J, Saul A, Cartron JP: A novel single missense mutation identified along the RH50 gene in a composite heterozygous Rh_{null} blood donor of the regulator type. Blood 91: 1458-1463 (1998)
- 59. Ikemoto S, Iwamoto S, Tsuchida S, Goto K, Oyamada T, Kajii E: Molecular genetic basis of red cell markers and its forensic application. Forens Sci Int 80: 147-161 (1996)

- Issitt PD, Anstee DJ: Chapter 12. The Rh Blood Group System. In: Applied Blood Group Serology, 4. Auflage, Montgomery Scientific Publications, Durham, S. 315-424 (1998)
- Jones J, Scott ML, Voak D: Monoclonal anti-D specificity and RhD structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. Trans Med 5: 171-184 (1995)
- Lacey PA, Caskey CR, Werner DJ, Moulds JJ: Fatal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh-positive D^u variant mother (Leserzuschrift). Transfusion 23: 91-94 (1983)
- Le Van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron JP, Colin Y: Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. Proc Natl Acad Sci USA 89: 10925-10929 (1992)
- Lighten AD, Overton TG, Sepulveda W, Warwick RM, Fisk NM, Bennett PR: Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. Am J Obstet Gynecol 173: 1182-1185 (1995)
- 65. Lo YMD, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MDG, Littlewood TJ, Fleming KA, Wainscoat JS: Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers (Leserzuschrift). Lancet 341: 1147-1148 (1993)
- 66. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 350: 485-487 (1997)
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargant IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS: Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 339: 1734-1738 (1998)
- 68. Lo YMD, Zhang J, Leung TK, Chang AM, Hjelm NM: Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 64: 218-224 (1999)
- Maaskant-van Wijk PA, Faas BHW, de Ruijter JAM, Overbeeke MAM, von dem Borne AEGK, van Rhenen DJ: *RHD* genotyping by multiplex PCR analysis of all RHD specific exons. (Abstrakt) Transfusion 37: 1S (1997)
- Maaskant-van Wijk PA, Hemker MB, Douglas-Berger L, vanDoorn R, van der Schoot CE, van Rhenen DJ: Ethnic vaiability of the Rhesus system. (Abstrakt) Transfusion 39: 103S-104S (1999)
- 71. Mak KH, Yan KF, Cheng SS, Yuen MY: Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. Transfusion 33: 348-351 (1993)
- 72. Matassi G, Chérif-Zahar B, Raynal V, Rouger P, Cartron JP: Organization of the human *RH50A* gene (RHAG) and evolution of base composition of the RH gene family. Genomics 47: 286-293 (1998)
- 73. Matassi G, Chérif-Zahar B, Pesole G, Raynal V, Cartron JP: The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. J Mol Evol 48: 151-159 (1999)
- 74. Maxwell DJ, Johnson P, Hurley P, Neales K, Allen L, Knott P: Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication. Br J Obstet Gynaecol 98: 892-897 (1991)
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells (Leserzuschrift). Nucl Acids Res 16: 1215 (1988)

- Mouro I, Colin Y, Gane P, Collec E, Zelinski T, Cartron JP, Le Van Kim C: Molecular analysis of blood group Rh transcripts from a r^Gr variant. Br J Haematol 93: 472-474 (1996)
- 77. Müller TH, Gassner C, Gran S, Wagner FF, Flegel WA, Schunter F: Semiautomated Rhesus DNA-typing by multiplex PCR: 4 reactions with 15 sequence-specific primer pairs. (Abstrakt) Transfusion 37: 19S (1997)
- 78. Nakai K, Sakamoto H: Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. Gene 141: 171-177 (1994)
- 79. Northoff H, Flegel WA: Genotyping and phenotyping: The two sides of one coin (Leitartikel). Infusionsther Transfusionsmed 26: 5 (1999)
- Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, Nagao N: A D variant, D_{el}? (Leserzuschrift) Transfusion 24: 542 (1984)
- Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Kajii E: The *RHD* gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. J Clin Invest 100: 373-379 (1997)
- 82. Pope J, Navarrete C, Warwick R, Contreras M: Multiplex PCR analysis of RhD gene (Leserzuschrift). Lancet 346: 375-376 (1995)
- Race RR, Sanger R: Kapitel 5. The Rh Blood Groups. In: Blood Groups in Man, 6. Aufl, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh, S. 178-260 (1975)
- Reid ME, Lomas-Francis C: Rh blood group system. In: The Blood Group Antigen Facts Book, 1. Auflage, Academic Press, San Diego London Sydney, S. 93-152 (1997)
- Rossiter JP, Blakemore KJ, Kickler TS, Kasch LM, Khouzmani AN, Pressman EK, Sciscione AC, Kazazian HH: The use of polymerase chain reaction to determine fetal RhD status. Am J Obstet Gynecol 171: 1047-1051 (1994)
- Rouger P, Muller JY: Third International Workshop and Symposium on Monoclonal Antibodies against Human Red Blood Cells and Related Antigens: Section RH. Transfus Clin Biol 3: 329 (1996)
- Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones NC, Beolet M, D'Ambrosio AM, Cartron JP, Le Van Kim C: Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. Blood 10: 2937-2944 (1995)
- Rouillac C, Gane P, Cartron J, Le Pennec PY, Cartron JP, Colin Y: Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D (D^u) and RhC/e in R^N phenotypes. Blood 87: 4853-4861 (1996)
- Sachs L: 95%-Vertrauensbereich f
 ür Lambda, Kapitel 4. In: Angewandte Statistik, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 267-268 (1978)
- 90. Salmon C, Cartron JP, Rouger P: The Human Blood Groups. Masson, New York. S. 220 (1984)
- Scott ML, Voak D, Jones JW, Avent ND, Liu W, Hughes-Jones N, Sonneborn H: A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. Transfus Clin Biol 6: 391-396 (1996)
- Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, Sato T: Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. Obstet Gynecol 87: 501-505 (1996)

- Simpson JL, Sherman E: Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. Prenat Diag 14: 1229-1242 (1994)
- 94. Simsek S, Bleeker PMM, von dem Borne AEGK: Prenatal determination of fetal RhD type (Leserzuschrift). N Engl J Med 330: 795 (1994)
- 95. Simsek S, Faas BHW, Bleeker PMM, Overbeeke MAM, Cuijpers HTM, van der Schoot CE, von dem Borne AEGK: Rapid Rh *D* genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA. Blood 85: 2975-2980 (1995)
- Smythe JS, Avent ND, Judson PA, Parson SF, Martin PG, Anstee DJ: Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. Blood 87: 2968-2973 (1996)
- Speer CP: Neonatologie, Kapitel 4. Abschnitt 8: Bluterkrankungen. In: Von Harnack GA, Koletzko B (Hrsg.) Kinderheilkunde, 10. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 86-96 (1997)
- Spence WC, Maddalena A, Demers DB, Bick DP: Molecular analysis of the RhD genotype in fetuses at risk for RhD hemolytic disease. Obstet Gynecol 85: 296-298 (1995)
- Sun CF: The distribution of blood group antugens among Chinese in Taiwan (Leserzuschrift). Transfusion 29: 463 (1989)
- 100. Sun CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT: *RHD* Gene Polymorphisms among RhD-Negative Chinese in Taiwan. Vox Sang 75: 52-57 (1998)
- 101. Tippett P, Lomas-Francis C, Wallace M: The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. Vox Sang 70: 123-131 (1996)
- 102. Tonn T, Westrup D, Seidl C, Kirchmaier CM, Seifried E: Sensitive determination of the RhD genotype in mixed samples using fluorescence-based polymerase chain reaction. Vox Sang 72: 177-181 (1997)
- 103. Urbaniak SJ, Robertson AE: A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. Transfusion 21: 64-69 (1981)
- 104. Van den Veyver IB, Chong SS, Cota J, Bennett PR, Fisk NM, Handyside AH, Cartron JP, Le Van Kim C, Colin Y, Snabes MC: Single-cell analysis of the RhD blood type for use in preimplantation diagnosis in the prevention of severe hemolytic disease of the newborn. Am J Obstet Gynecol 172: 533-540 (1995)
- 105. Van den Veyver IB, Subramanian SB, Hudson KM, Werch J, Moise KJ, Hughes MR: Prenatal diagnosis of the RhD fetal blood type on amniotic fluid by polymerase chain reaction. Obstet Gynecol 87: 419-422 (1996)
- 106. Wagner FF: Influence of Rh phenotype on the antigen density of C, c, and D: flow cytometric study using a frozen standard red cell. Transfusion 34: 671-676 (1994)
- 107. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA: Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in South-Western Germany. Infusionsther Transfusionsmed 22: 285-290 (1995)
- 108. Wagner FF, Flegel WA: Polymorphism of the *h* allele and the population frequency of sporadic nonfunctional alleles. Transfusion 37: 284-290 (1997)

- 109. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. Blood 91: 2157-2168 (1998)
- 110. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 93: 385-393 (1999)
- 111. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher N, Lonicer CB, Müller TH, Siegel MH, Flegel WA: Weak D alleles express distinct phenotypes. Blood (2000), zur Veröffentlichung angenommen.
- 112. Wenk RE, Chiafari FA: DNA typing of recipient blood after massive transfusion. Transfusion 37: 1108-1110 (1997)
- 113. Wolter LC, Hyland CA, Saul A: Rhesus D genotyping using polymerase chain reaction. Blood 82: 1682-1683 (1993)
- 114. Yankowitz J, Li S, Murray JC: Polymerase chain reaction determination of RhD blood type: an evaluation of accuracy. Obstet Gynecol 86: 214-217 (1995)

7. DANKSAGUNG

Für die Ermöglichung dieser Dissertation im Institut Ulm des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg danke ich dem Direktor, Herrn Prof. Dr. Bernhard Kubanek.

Meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihm für seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, sowie für seine Anregungen und Ratschläge bedanken.

Für die äußerst gute Betreuung während der experimentellen Phase, sowie für die sehr hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, insbesondere in Fragen der Statistik, möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Franz F. Wagner bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes Ulm des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg, die zum Gelingen dieser Arbeit in verschiedener Weise beitrugen, recht herzlich bedanken. Besonderer Dank gebührt den medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung Serologie für das Sammeln der für die Untersuchungen relevanten Blutproben, sowie für die Durchführung der vorausgehenden serologischen Routineuntersuchungen. In diesem Zusammenhang möchte ich insbesondere Frau Katharina Schmid erwähnen, die mir zu jeder Zeit in Sachen der Versuchsvorbereitung, der Einarbeitung in die Experimente und bei deren Durchführung in allen Fragen eine unverzichtbare Hilfe war. Desweiteren wurden in der serologischen Aufarbeitung der gefundenen Allele alle Adsorption-Elution-Verfahren von ihr ausgeführt. Dafür möchte ich mich bei ihr, sowie für die Bedienung des ABI PRISM 377 DNA Sequencer bei ihr und bei Frau Marianne Lotsch auf das herzlichste bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Scharberg vom Institut Baden-Baden des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg für die freundliche Überlassung von Blutproben mit seltener Rhesusformel und Frau Dr. JoAnn Moulds, "DNA- Coordinator" in der "International Immunohematological Exchange Group" (SCARF Exchange), Houston, Texas, USA für die Bereitstellung von DNA-Proben. Desweiteren möchte ich Herrn Chien-Feng Sun, MD FCAP, Direktor des Department of Clinical Pathology am Chang Gung Memorial Hospital, Lin-Kou Medical Center, Taiwpi, Taiwan danken, daß er DNA-Proben aus der Bevölkerung Taiwans für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt hat.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern, Renate und Karl-Heinz Frohmajer, für ihre stetige Unterstützung und ihren Rückhalt während all der Jahre danken, ohne die mein Studium und insbesondere auch meine Dissertation für mich nicht denkbar gewesen wären.

8. LEBENSLAUF

| Persönliche Dater | <u>1</u> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Name | Alexander Frohmajer |
| Geboren | 19.05 1973, Heidenheim an der Brenz |
| Familienstand | verheiratet, ein Kind |
| <u>Schulausbildung</u> | |
| 1979-1983 | Grundschule Dettingen |
| 1983-1992 | Max-Planck-Gymnasium Heidenheim |
| 19.05.1992 | Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8) |
| <u>Wehrdienst</u> | |
| 1992-1994 | 18 Monate Dienst bei der Deutschen Bundeswehr |
| <u>Studium</u> | |
| 1994 | Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm |
| 1996 | Ärztliche Vorprüfung (Note 2,66) |
| 1997 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2) |
| 2000 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2) |
| 2001 | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2) |
| Praktisches Jahr: | |
| 04.2000-08.2000 | Anästhesie |
| 08.2000-12.2000 | Chirurgie |

12.2000-03.2001 Innere Medizin Alle drei Tertiale am Kreiskrankenhaus Heidenheim

Famulaturen

| 1997 | Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm | |
|------|----------------------------------------------------------|--|
| | Chirurgie, Krankenhaus Weißenhorn | |
| 1998 | Allgemeinmedizin, Praxisfamulatur | |
| 1999 | Urologie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm | |
| | Anästhesie, Kreiskrankenhaus Heidenheim | |