

1.	Einleitung	1
1.1	Herzinfarkt	1
1.1.1	Thrombozyten-Antigene.....	3
1.1.2	Glykoprotein IIb / IIIa Komplex.....	4
1.1.3	Methoden der HPA-Genotypisierung	5
1.1.4	Klinische Bedeutung der Thrombozyten-Antigene.....	6
1.1.5	HPA-1b: Ein genetischer Marker für Koronarthrombosen?.....	6
1.1.6	Polymorphismen des plasmatischen Gerinnungssystems: Gerinnungsfaktor V und Prothrombin.....	7
1.1.6.1	Mutation des FV- und Prothrombin-Gens	9
1.1.7	Polymorphismen, die die Reaktivität der Gefäßwand beeinflußen: Angiotensin Converting Enzym.....	10
1.2	Das Rh-Blutgruppen System.....	11
1.2.1	Organisation der <i>RH</i> -Gene.....	11
1.2.2	<i>RHD</i> - DNA-Typisierung	13
1.2.3	Quantitativer <i>RHD</i> -Nachweis mit fluorogenen Sonden	13
1.3	Ziele der Untersuchungen	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	DNA-Typisierung aus Vollblut.....	17
2.1.1	Isolierung und Quantifizierung der DNA.....	17

2.1.2	PCR	17
2.1.2.1	HPA -1, -2, -3 und -5.....	17
2.1.2.2	Prothrombin G20210A Mutation.....	20
2.1.2.3	Gerinnungsfaktor V G1691A Polymorphismus.....	20
2.1.3	ELISA.....	21
2.1.3.1	Auswertung.....	22
2.2	Quantitative PCR zur Bestimmung der RHD-Zygotie.....	23
2.2.1	Isolierung der DNA	23
2.2.2	PCR	23
2.2.3	Auswertung.....	24
2.3	Quantitative PCR zum Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Plasma.....	24
2.3.1	Isolierung der DNA	24
2.3.2	Nachweis RhD-positiver fetaler DNA im Plasma RhD- negativer Mütter.....	25
2.3.3	Auswertung.....	25
2.4	APC-Resistenz	25
3.	Ergebnisse	27
3.1	PCR-ELISA	27
3.1.1	Methode	27
3.1.2	Analytische Qualitäten	28
3.1.2.1	Spezifität.....	28

3.1.2.2	Sensitivität und Linearität.....	30
3.1.2.3	Reproduzierbarkeit	31
3.1.2.4	Validierung der Methode	32
3.1.2.5	Anwendungsbeispiele	33
	a) <i>HPA-2,-3,-5</i>	33
	b) <i>Prothrombin G20210A- und Faktor V A1691G- Mutation</i>	34
	c) <i>ACE-Insertions - / Deletions-Polymorphismus</i>	35
3.2	Quantitative PCR	36
3.2.1	Analytische Qualitäten	36
3.2.1.1	Spezifität.....	36
3.2.1.2	Sensitivität und Linearität.....	38
3.2.1.3	Reproduzierbarkeit	39
3.2.2.4	Validierung	40
3.3	Genetische Risikofaktoren bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten	42
3.3.1	Probenmaterial und Patientenmerkmale	42
3.3.2	<i>HPA-1-Genotypisierung</i>	43
3.3.3	Faktor V-Mutation	45
3.3.4	Prothrombin G20210A Mutation.....	47
3.3.5	Angiotensin Converting Enzyme (ACE).....	47
3.4	Anwendung der quantitativen Rhesus-D-PCR.....	49
3.4.1	<i>RHD -Zygotie</i>	49
3.4.2	Pränatal-Diagnostik.....	53

4.	Diskussion	58
4.1	PCR-ELISA-Methode.....	58
4.2	Genetische Risikofaktoren bei Koronarpatienten für einen Herzinfarkt und das Ausmaß der Koronarveränderungen.....	61
4.2.1	Thrombozytenglykoprotein IIIa (HPA-1)	62
4.2.2	Mutationen des Gerinnungsfaktors V und Prothrombins.....	63
4.2.3	Angiotensin-Converting Enzyme.....	65
4.2.4	Zusammenfassung.....	66
4.3	<i>RHD</i> -Zygotie.....	67
4.3.1	Methode	67
4.4	Nachweis fetaler DNA im maternalen Plasma	69
4.4.1	Isolierung fetaler DNA	69
4.4.2	Fetale <i>RHD</i> -Typisierung.....	70
4.4.3	Zusammenfassung.....	73
5.	Zusammenfassung	75
6.	Literatur	77

Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
aPC	Aktiviertes Protein C
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Ct-Wert	Threshold cycle (Schwellenwert)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbend Assay
F II	Gerinnungsfaktor II (Prothrombin)
F V	Gerinnungsfaktor V
GP	Glykoprotein
HPA	Human Platelet Antigen
MI	Myokardinfarkt
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RhD	D-Antigene tragendes Protein
<i>RHD</i>	„Rhesus D“-Gen
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
Δ Ct	Differenz der Schwellenwerte der spezifischen fluorogenen Sonden

1. Einleitung

Die rasante Entwicklung der Molekularbiologie in den vergangenen Jahren hat auch der Medizin neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten erschlossen. Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat die molekulargenetische Diagnostik wesentlich erweitert, so daß die PCR für klinische Fragestellungen immer häufiger eingesetzt wird.

Ganz unterschiedliche Anforderungen bei der klinische Anwendung dieser Diagnostik werden an den beiden in der vorliegenden Arbeit behandelten Beispielen deutlich:

- der Identifizierung genetischer Risikofaktoren für einen Herzinfarkt und
- dem quantitativen Nachweis des „Rhesus D“ Gens (*RHD*) für die pränatale Diagnostik.

Bei der Suche nach genetischen Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt müssen große Patientenkollektive untersucht werden. Dabei wird der konventionelle Nachweis der PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese schnell zum limitierenden Schritt. Deshalb war ein Ziel, eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung großer Probenzahlen zu entwickeln

Die pränatale *RHD*-Bestimmung hingegen erfordert eine möglichst große Nachweisempfindlichkeit, da mit aus nur wenigen Zellen isolierter DNA zuverlässige Ergebnisse erzielt werden müssen.

Für das Verständnis der klinischen Bedeutung dieser Untersuchungen werden zunächst kurz die molekulargenetischen und pathophysiologischen Grundlagen des Herzinfarktes (1.1) und der RhD-Inkompatibilität in der Schwangerschaft (1.2) vorgestellt

1.1 Herzinfarkt

Der Herzinfarkt gehört zu den häufigsten Todesursachen. Er wird durch den akuten thrombotischen Verschuß einer Herzkranzarterie ausgelöst. Arterielle Thrombosen wie Herzinfarkte, ischämische Schlaganfälle oder akute Verschlüsse peripherer Arterien, entstehen durch Entgleisen der Kontrolle des

engen Zusammenspiels der Thrombozyten und anderer Blutzellen, der plasmatischen Gerinnung und der Gefäßwand.

Thrombozyten erkennen über eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren an ihrer Oberfläche prothrombotische Signale in der Umgebung. So bindet zum Beispiel von Willebrand Faktor, der durch Verletzung - wie das Aufbrechen eines atherosklerotischen Plaques - in der Gefäßwand freigelegt wird, an den Glykoprotein (GP) Ib-V-IX - Komplex auf der Thrombozytenoberfläche. Über diesen Adhäsionsmechanismus setzen sich einzelne Thrombozyten an der Gefäßwand fest. Kollagen in der Gefäßwand kann als Ligand des GPIa-IIa Komplexes ebenfalls Thrombozyten verankern. Gleichzeitig aktiviert Kollagen die Thrombozyten, so daß über Verstärkungsmechanismen wie die Thromboxanbildung und Adenosindiphosphat (ADP)-Freisetzung immer mehr Thrombozyten aus dem strömenden Blut für die Thrombusbildung rekrutiert werden. Aktivierte Thrombozyten lagern den GP IIb-IIIa Komplex zu einem Rezeptor für Adhäsionsproteine wie das Fibrinogen um. Fibrinogen als großer (≈ 340 kD) symmetrischer Ligand kann an je einem GP IIb-IIIa Rezeptor von zwei benachbarten Thrombozyten andocken. Dieser GP IIb-IIIa abhängige Mechanismus verankert immer mehr Thrombozyten in das rasant wachsende Thrombozytenaggregat. Gleichzeitig wird auch die plasmatische Gerinnungskaskade als ein zweites Reparatursystem aktiviert. Die Gerinnungsaktivierung generiert Thrombin, das das im Plasma gelöste Fibrinogen proteolytisch spaltet und damit die Polymerisation des löslichen Fibrinogens in feste Fibrinstränge in Gang setzt. Die lokale Fibrinbildung stabilisiert den Thrombus zusätzlich.

Diese stark vereinfachte Beschreibung von an der lokalen Thrombusbildung beteiligten Komponenten läßt das enge und komplexe Zusammenspiel sehr vieler Faktoren bei der Thrombusbildung erkennen. Sie verdeutlicht die zentrale Bedeutung sowohl der Thrombozyten mit ihren Glykoproteinen als auch der plasmatischen Gerinnungsfaktoren für die Entstehung eines akuten thrombotischen Verschlusses wie des Herzinfarktes. Als molekulare Komponenten dieser oft lebensbedrohlichen Thrombosen sind zahlreiche Polymorphismen bekannt. Einige klinisch besonders interessante Polymorphismen werden im Folgenden angesprochen.

1.1.1 Thrombozyten-Antigene (Human Platelet Antigen, HPA)

Die Immunisierung von Patienten nach Transfusion von Humanthrombozyten lieferte erste Hinweise auf interindividuelle Variationen in der Struktur von Glykoproteinen der Thrombozytenmembran. Mittlerweile sind die molekularen Grundlagen dieser Thrombozytenantigene aufgeklärt. Die Lokalisation, die Benennung, die Positionen der Nukleotid – und Aminosäuresubstitutionen und die Frequenzen dieser Polymorphismen für Mitteleuropäer sind in Tab. 1 zusammengefaßt:

Tab.1. Merkmale der Thrombozyten-Antigene-1 bis -5 (verändert nach Müller-Eckhard 1997).

Lokalisation	Nomenklatur	Base	Aminosäure	Allelfrequenz
GP IIIa	HPA-1a [Pl ^{A1}]	T 196	Leu 33	97,5 %
	HPA-1b [Pl ^{A2}]	C 196	Pro 33	30,8%
GP Ib	HPA-2a [Ko ^b]	T 524	Thr 145	99,8%
	HPA-2b [Ko ^a]	C 524	Met 145	11,8%
GP IIIa	HPA-3a [Bak ^a]	T 2622	Ile 843	86,1%
	HPA-3b [Bak ^b]	G 2622	Ser 843	62,9%
GP IIIa	HPA-4a [Yuk(b)]	A 526	Arg 143	>99,9%
	HPA-4b [Yuk(a)]	G 526	Gln 143	<0,1%
GP Ia	HPA-5a [Br ^b]	G 1648	Glu 505	98,8%
	HPA-5b [Br ^a]	A 1648	Lys 505	20,6%

Die Nomenklatur der Thrombozyten-Antigene (die historischen Bezeichnungen der Antigene sind in Tabelle 1 in den eckigen Klammern genannt) ist seit 1990 einheitlich definiert. Dem Begriff HPA wird eine Nummer entsprechend der Reihenfolge der Entdeckung des Antigens

zugeteilt. Das häufigere Allel trägt den Zusatz „a“, die seltenere Variante den Zusatz „b“.

Am Beispiel des GP IIIa wird allerdings deutlich, daß diese Nomenklatur nicht ganz unproblematisch ist (Abb.1):

Allel	Bezeichnung
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-1a
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-4a
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-7a
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-6a
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-8a
GP IIIa Pro ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-1b
GP IIIa Leu ₃₃ Gln ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-4b
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Ala ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-7b
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Gln ₄₈₉ Arg ₆₃₆	HPA-6b
GP IIIa Leu ₃₃ Arg ₁₄₃ Pro ₄₀₇ Arg ₄₈₉ Cys ₆₃₆	HPA-8b

Abb.1: Bislang bekannte polymorphe Formen des Glykoprotein IIIa (verändert nach Newman, 1994)

Die formale Beschreibung als isolierte diallele Systeme verschleiert die Tatsache, daß ein Protein mehrere (z.B. fünf bei Glykoprotein IIIa) „Diallele“ trägt.

1.1.2 Glykoprotein Iib / IIIa Komplex

Der Glykoprotein Iib/IIIa Komplex ist mit ca. 40 000 - 80 000 Molekülen pro Zelle (Beutler et. al 1995) das mit Abstand am häufigsten vertretene Glykoprotein auf der Oberfläche der Thrombozyten. Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Struktur und die Position der verschiedenen Thrombozyten-Antigene. Ungefähr 70 % der GP Iib/IIIa-Komplexe werden auf der Zelloberfläche präsentiert, die restlichen befinden sich im Zellinneren und werden erst bei der Stimulation der Thrombozyten freigesetzt (Phillips et al. 1988).

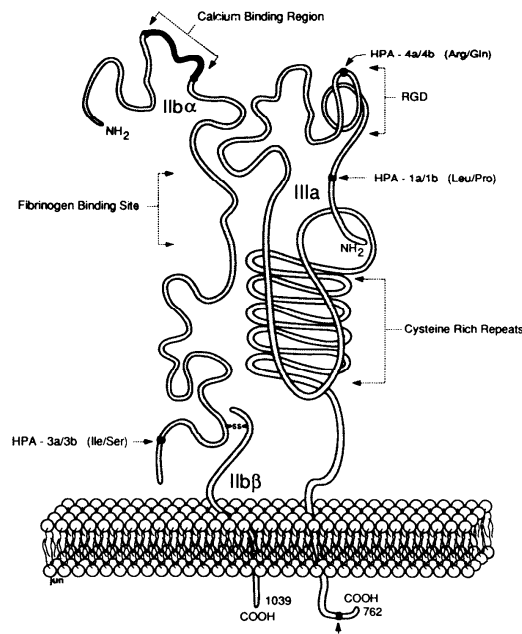


Abb.2: Schematische Darstellung des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes und der Position der Thrombozyten-Antigene (nach Horsewood et al.1993)

1.1. 3 Methoden der HPA-Genotypisierung

Mit zunehmender Kenntnis der molekularen Grundlagen der Thrombozyten-Antigene wurden Methoden entwickelt, mit denen die Polymorphismen molekulargenetisch erfaßt werden können. Zunächst wurde die PCR mit einem Verdau durch Restriktionsenzyme kombiniert (Simsek et al.,1993; Unkelbach et al.1995). Diese relativ aufwendige Methode wurde später durch den Einsatz von sequenz-spezifischen Primern bei der PCR vereinfacht (Skogen et al. 1994; Tanaka et al. 1995; Klüter et al. 1996; Cavanagh et al. 1997; Chen et al. 1997). Beiden Methoden gemeinsam ist die Identifizierung der Genotypen durch eine anschließende Gel-Elektrophorese.

Die Elektrophorese stellt für die Bearbeitung großer Probenmengen einen limitierenden Faktor dar, so daß ein Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zu entwickeln, die eine Genotypisierung auch großer Patientenkollektive mit einem vertretbaren Aufwand ermöglicht.

1.1. 4 Klinische Bedeutung der Thrombozyten-Antigene

Der Austausch einer einzelnen Aminosäure als Folge einer Basensubstitution kann vom Immunsystem erkannt werden. Wird eine Mutter gegen fetale Thrombozyten-Alloantigene immunisiert, dann können die Antikörper über die Plazenta in den kindlichen Kreislauf übertreten, an kindliche Thrombozyten binden und deren Abbau beschleunigen. Diese Alloimmunthrombozytopenie kann vor, insbesondere unter und auch noch kurz nach der Geburt zu Blutungen führen. Die Blutungen sind nicht selten so schwer, daß die Kinder sterben oder bei Einblutungen in das Gehirn lebenslange Schäden setzen. Am häufigsten werden Antikörper gegen das HPA-1a-Antigen gebildet.

Eine ähnliche Situation kann als Posttransfusions-Purpura auch beim Erwachsenen auftreten (Müller-Eckhard et al. 1990). 5 bis-10 Tage (Funke et al., 1999) nach einer Thrombozyten-Transfusion werden nicht nur die Spender-Plättchen sondern - über eine noch nicht verstandene Autoimmunisierung - auch die eigenen Thrombozyten des Empfängers beschleunigt abgebaut. Diese Thrombozytopenie kann schwere Blutungskomplikationen auslösen.

1.1.5 HPA-1b: Ein genetischer Marker für Koronarthrombosen?

In Anbetracht der bedeutenden Funktion von GP IIb / IIIa bei der Thrombozytenaggregation ist es denkbar, daß ein Austausch der Aminosäuren Leucin und Prolin in Position 33 von GP IIIa Einfluß auf die Funktionsfähigkeit des Rezeptors hat. 1996 wurde eine Studie publiziert, in der ein Zusammenhang von Koronarthrombosen und dem HPA-1b-Antigen beobachtet wurde (Weiss et al. 1996). Der HPA-1-Polymorphismus wurde bei 71 Patienten mit Myokardinfarkt oder instabiler Angina und 68 Individuen ohne bekannte Herzerkrankungen untersucht.

Bei 28 der 71 Patienten (39%) mit Myokardinfarkt konnte der HPA-1b-Polymorphismus nachgewiesen werden, im Vergleichskollektiv betrug der Anteil nur 19%. Die Altersverteilung ergab einen Anteil von 50% HPA-1b-Positiver bei Patienten mit Myokardinfarkt, die jünger als 60 Jahre alt waren. Das Risiko ("odds-ratio") einer Koronarthrombose bei HPA-1b-Positiven gegenüber HPA-1b-Negativen von 2,8 im Gesamtkollektiv stieg bei den unter

60jährigen auf 6,2 an. Die Studie wies damit erstmals auf einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem HPA-1b-Polymorphismus und einer koronaren Herzerkrankung hin, insbesondere bei Personen unter 60 Jahren. Dieser Zusammenhang wurde in einem relativ kleinen Kollektiv von nur 71 Patienten mit Myokardinfarkt oder instabiler Angina hergestellt. Um festzustellen, inwieweit diese Ergebnisse in einer größeren Patientengruppe reproduzierbar sind, wurden in Zusammenarbeit mit der Kardiologischen Abteilung der Städtischen Kliniken Oldenburg und der Kardiochirurgie der Schüchtermann-Klinik (Bad Rothenfelde) 851 Patienten mit koronaren Herzerkrankungen HPA-1 genotypisiert. Gleichzeitig sollte an dieser repräsentativen Patientengruppe die Bedeutung zusätzlicher Polymorphismen für arterielle Thrombosen untersucht werden.

1.1.6 Polymorphismen des plasmatischen Gerinnungssystems: Gerinnungsfaktor V und Prothrombin

Ebenso wie die Thrombozyten spielt die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems eine bedeutende Rolle bei der arteriellen Thrombose.

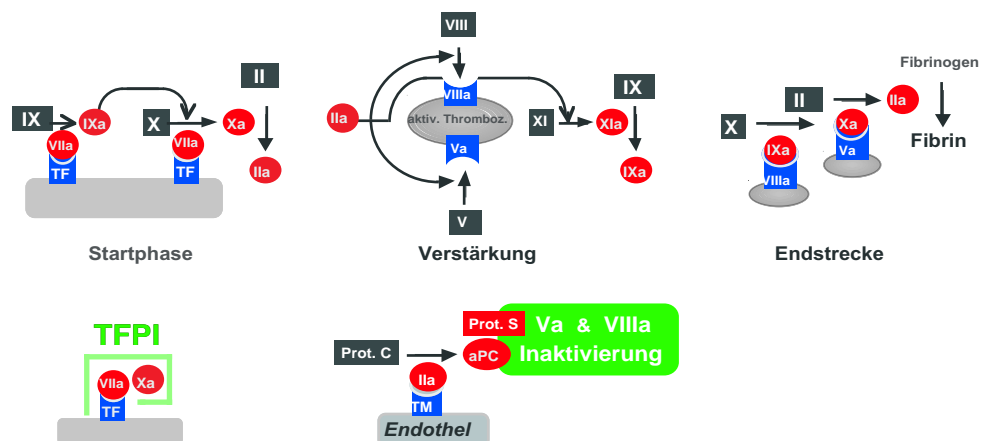


Abb.3: Schematische Darstellung der plasmatischen Gerinnung (Müller, TH. 1977)

In Abb.3 sind die verschiedenen Phasen der Gerinnung und ihrer Regulation dargestellt.

Durch eine Läsion des Gewebes wird in der Startphase Faktor VII aktiviert, der die Faktoren IX und X proteolytisch spaltet und über den aktivierten Faktor X zur Spaltung des Prothrombins (FII) und damit zur Bildung einiger weniger Thrombinmoleküle führt. Eine Kontrolle dieser ersten Phase erfolgt durch TFPI (tissue factor pathway inhibitor), der bei ausreichender Menge an Faktor Xa den Komplex aus Gewebefaktor (TF) und Faktor VII inhibiert, indem über eine Komplexbildung aus TFPI und Faktor Xa die enzymatische Aktivität von FVa / TF gehemmt wird.

Die geringen, in der ersten Phase generierten Spuren an Thrombin reichen bei weitem noch nicht aus, um Fibrinogen in Fibrin zu überführen. Erst während der zweiten Phase (Verstärkungsphase) werden leistungsfähige Werkzeuge zur beschleunigten Thrombinbildung (Endstrecke) geliefert. Thrombin aktiviert die Gerinnungsfaktoren VIII zu VIIIa und V zu Va. Der Einbau von VIIIa und Va in die Membran aktivierter Thrombozyten beschleunigt dann in der Endstrecke die Geschwindigkeit der Bildung von Faktor Xa beziehungsweise von Thrombin mindestens auf das 100 000-fache. Protein C kontrolliert den kritischen Schritt der Bereitstellung der aktivierten Faktoren V und VIII für die Thrombinbildung. Protein C wird durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex zu Protein Ca aktiviert. Im Konzert mit Protein S inaktiviert Protein Ca die VIIIa- und Va-Moleküle durch Proteolyse. Die Protein C-vermittelte Rückkopplungshemmung dieser Mechanismen, die für die effiziente Thrombinbildung von entscheidender Bedeutung ist, verhindert eine überschießende Thrombinbildung.

Das aufgrund der Verstärkung durch VIIIa und Va in hohen lokalen Konzentrationen anflutende Thrombin setzt Fibrinogen zu Fibrin um, indem es vom Fibrinogen zwei Peptide abspaltet. Die Fibrinmonomere polymerisieren spontan und bilden die festen Fibrinfasern.

Auch diese Endstrecke der Fibrinbildung wird durch einen gegenläufigen Prozeß (Fibrinolyse) kontrolliert. Durch die Einwirkung von Plasmin (durch Streptokinase, Urokinase, t PA aktiviertes Plasminogen) kommt es zu einer Proteolyse des Fibrins in den gebildeten Thromben.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Vorgänge stellen nur einen sehr kurzen Abriß überaus komplexer Mechanismen dar. Die Feinabstimmung

dieser Mechanismen im Grenzgebiet zwischen Gefäßwand und strömendem Blut entscheidet darüber, inwieweit die Gefäßläsion angemessen repariert wird oder eine überschießende Reaktion zum thrombotischen Gefäßverschluß (Infarkt) führt.

1.1.6.1 Mutation des FV- und Prothrombin-Gens

Funktionsbeeinträchtigende Mutationen der beteiligten Komponenten können die komplexe Regulation der Gefäßwandreparatur stören. Für das Prothrombin-Gen wurde an Position 20210 ein Austausch der Base Guanin durch Adenin (G20210A) beschrieben, der mit einer Frequenz von ca. 1% nachweisbar ist. Bei Trägern der Mutation wurden erhöhte Plasmakonzentrationen sowohl des Prothrombins als auch der Prothrombin-Fragmente 1+2 nachgewiesen (Franco et al. 1999). Die Autoren vermuteten deshalb, daß die Prothrombin-Mutation mit einer gesteigerten Thrombinbildung im Patienten einhergeht. Einer Allelfrequenz von 1% im Normalkollektiv standen in dieser Studie ein vermehrtes Vorkommen der Mutation (2,7%) bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen gegenüber. Auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Rosendaal et al. 1997; Doggen et al. 1998; Arruda et al. 1997; Inbal et al. 1997) konnten einen Zusammenhang zwischen der G20210A Mutation und koronaren Erkrankungen - insbesondere des Myokardinfarktes - zeigen. Ein Teil dieser Studien war so konzipiert, daß nur bestimmte Patientenkollektive (getrennt nach Alter und/oder Geschlecht) untersucht wurden.

Für Faktor V wurde eine Basensubstitution (G1691A) in Exon 10 nachgewiesen, die den Austausch von Arginin durch Glutamin an Position 506 des Proteins zur Folge hat (Faktor V Leiden). Mit dieser Mutation geht eine Resistenz gegen aktiviertes Protein C (Bertina et al. 1994) einher. Um eine über den Bedarf hinausgehende Thrombinbildung zu unterbinden, wird Faktor V durch Protein C an Position Arg506 gespalten. Dadurch werden zwei weitere Stellen für die Spaltung des Moleküls präsentiert: Arg 306 und Arg 679. Nur die abschließende Spaltung an Position 679 führt zu der Inaktivierung von Faktor V. Zahlreiche Untersuchungen zeigen die Korrelation von Faktor V (G1691A)-Mutation und Resistenz gegen aktiviertes

Protein C; zwei aktuelle Arbeiten konnten dies auch für die Arg 306 Gly - Substitution nachweisen (Chan et al. 1998, Williamson et al. 1998).

Die Frequenz für den G1691A Polymorphismus beträgt bei Gesunden ca.5 % (Koster et al. 1993), bei Patienten mit venösen thromboembolischen Erkrankungen steigt sie auf 20-50% an (Hezard et al. 1997).

1.1.7 Polymorphismen, die die Reaktivität der Gefäßwand beeinflussen: Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

„Angiotensin Converting Enzyme“ (ACE) ist eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase die Angiotensin II in Angiotensin I überführt. Von dem Dekapeptid Angiotensin I spaltet ACE zwei Aminosäuren ab. Das Oktapeptid Angiotensin II wird anschließend durch Angiotensinasen in inaktive Peptide umgesetzt.

Die Bildung von Angiotensin wird über die Renin-Ausschüttung reguliert; diese wiederum wird über Druck- und Volumenrezeptoren gesteuert. Als Folge einer erhöhten Renin-Bildung kommt es zu einer Zunahme von Angiotensin II und - da es sich hierbei um einen überaus wirksamen Vasopressor handelt - zu einer Erhöhung des Blutdrucks.

Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems für die Blutdruckregulation konnte in Studien mit einer direkten Blockierung des Renins bzw. Angiotensins nachgewiesen werden (Zee et al. 1992; Aldermann et al. 1991).

Im Gegensatz zu den bislang vorgestellten Punktmutationen in den Genen der Thrombozyten-Antigene und der Faktoren V und II handelt es sich bei dem Polymorphismus des ACE-Gens um eine Deletion / Insertion von 287 bp in Intron 16. Bei dem homozygoten Deletionstyp kommt es zu einer erhöhten Plasmakonzentration von ACE (Tiret et al. 1992; Rigat et al. 1990) , die im Zusammenhang mit verschiedenen Gefäßkrankheiten stehen könnte (Amant et al. 1997; Raynold et al. 1993; Yusuf et al. 1992; Tiret et al. 1993; Evans et al. 1994).

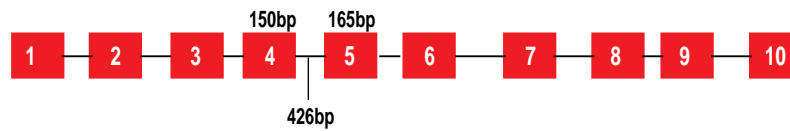
1.2 Das Rh-Blutgruppen System

Die Rh-Blutgruppenantigene, die früher als Rhesus-Merkmale bezeichnet wurden, liegen membrangebunden auf den Erythrozyten vor. Unterschieden werden die Antigene C/c, D und E/e. Klinisch ist das D-Antigen besonders bedeutsam, da es eine sehr hohe Immunogenität besitzt. Die Übertragung von 250 ml D-positiven Blutes führt bei rund 80% der D-negativen Empfänger zur Bildung von Antikörpern. Entsprechend führten vor der Einführung der D-Prophylaxe Schwangerschaften D-negativer Mütter mit D-positiven Kindern sehr häufig zur Immunisierung der Mutter. In Folgeschwangerschaften bestand eine große Gefahr, daß D-positive Kinder intrauterin einen schwere Anämie entwickelten und gravierende Schäden erlitten. Durch die konsequente D-Prophylaxe werden heutzutage bei den meisten D-inkompatiblen Schwangerschaften Immunisierungen der Mütter vermieden. Wird die D-Prophylaxe vergessen oder bleibt sie unwirksam, dann kann bei rechtzeitiger Diagnose durch intrauterine Infusion von Erythrozyten und Austauschtransfusionen nach der Geburt dennoch eine normale Entwicklung des Feten und Neugeborenen erreicht werden. Damit ist die pränatale *RHD* Diagnostik zur Zeit die klinische bedeutsamste Anwendung der molekulargenetischen Blutgruppendiagnostik (Flegel et al 1998). Die Abkürzung RhD bezeichnet das die D-Antigene tragende Protein, *RHD* steht für das RhD-Gen.

1.2.1 Organisation der *RH*-Gene

Es sind zwei separate Gene bekannt, die für *RHD* und *RHCE* kodieren (Abb.4) und auf Nukleotidebene zu 96% homolog sind (Avent et al. 1990; Arce et al. 1993). Sequenzunterschiede zwischen den beiden Genen finden sich in allen Exons mit Ausnahme der Exons 1, 8 und 10. Abb.5 zeigt schematisch die Struktur des RhCE -Proteins in der Membran und die Position der Aminosäuren, in denen sich das RhCE vom RhD -Protein unterscheidet. Desweiteren ist der C/c - Polymorphismus dargestellt, der mit vier Substitutionen in den Exons 1 und 2 assoziiert ist. E/e unterscheiden sich durch einen Austausch in Exon 5.

RHD Gen



RHCE Gen

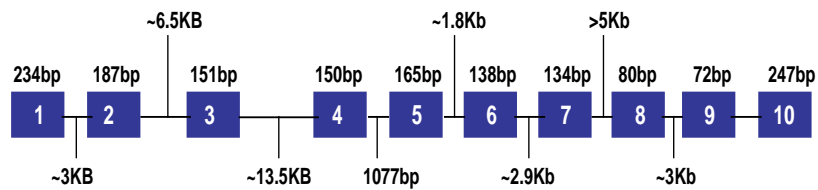


Abb.4: Schematische Darstellung der Exons 1-10 des *RHD* - und *RHCE* -Gens. (verändert nach: Avent, N.D. 1997).

Serologisch sind C und/oder c bzw. E und/oder e bis auf extrem seltene Ausnahmen bei allen Individuen nachweisbar. Das D-Antigen ist allerdings bei ca. 82% der Kaukasier zu finden. Es wird vermutet, daß bei D-Negativen das *RHD*-Gen fehlt. (Arce et al. 1993; Colin et al. 1991).

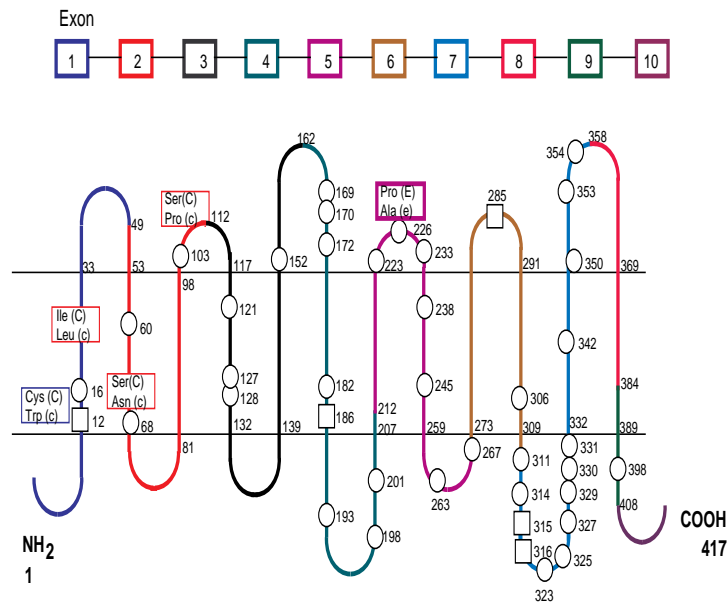


Abb.5: Die 10 Exons des *RHCE* -Gens und die Position der entsprechenden Segmente des RhCcEe-Proteins in der Membran. Die Kreise symbolisieren die Aminosäuren, in denen sich das RhCcEe- vom RhD -Protein unterscheidet. In Kästchen angegeben sind die für die C/c und E/e Merkmale charakteristischen Aminosäuren notiert. (verändert nach : Dahr et al. 1997)

1.2.2 *RHD*- DNA-Typisierung

Mit der Sequenzierung der *RHD*- und *-CE*-Gene wurden Möglichkeiten eröffnet, den Rhesus-Status eines Individuums molekularbiologisch zu erfassen. Zahlreiche Arbeitsgruppen nutzten die in den Exons und Introns lokalisierten Polymorphismen, um PCR-Methoden für die *RHD*-Typisierung zu entwickeln (Benett 1993; Simsek 1995; Poulter 1996).

Mit der Verfügbarkeit der DNA-Typisierung ergeben sich neue Perspektiven für die Pränatal-Diagnostik der feto-maternalen Rhesus-Inkompatibilität. In den häufigsten Fällen der Rhesus-Unverträglichkeit werden Antikörper von einer D-negativen Mutter gegen die Antigene des D-positiven Kindes gebildet, es sind aber auch Fälle berichtet, in denen Antikörper gegen das kindliche C,c und E nachgewiesen werden konnten.

Die Antikörperbildung erfolgt unter Umständen bereits in der ersten Schwangerschaft, wenn in den letzten Monaten bzw. während der Geburt fetale Erythrozyten in das mütterliche Blut übertreten. Bei einer erneuten Schwangerschaft können die gebildeten Antikörper durch die Plazenta hindurch in die Blutbahn des Kindes gelangen und dort die fetalen Erythrozyten zerstören.

Die frühzeitige Diagnose einer solchen feto-maternalen Rhesus-Inkompatibilität ist für die Therapie bzw. für die Kontrolle des Schwangerschaftsverlaufes von entscheidender Bedeutung. Routinemäßig wird der *RHD*-Status des Kindes einer D-negativen Mutter in einer Fruchtwasserprobe untersucht. Eine Methode zu entwickeln, die ein solches invasives Vorgehen langfristig ersetzen kann, ist von großem Interesse. War zunächst die Strategie fetale Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter anzureichern, ergaben sich aus den Ergebnissen von Lo et al. (1998) völlig neue Möglichkeiten. Diese Arbeitsgruppe zeigte, daß im mütterlichen Plasma kindliche DNA vorhanden und damit einer direkten DNA-Typisierung zugänglich ist. Voraussetzung dafür ist eine ausreichend sensitive Methode.

1.2.3 Quantitativer *RHD*-Nachweis mit fluorogenen Sonden

Die für die quantitative PCR eingesetzte Technik basiert auf dem Einsatz sequenzspezifischer fluorogener Sonden. Diese tragen an ihrem 5-Ende einen

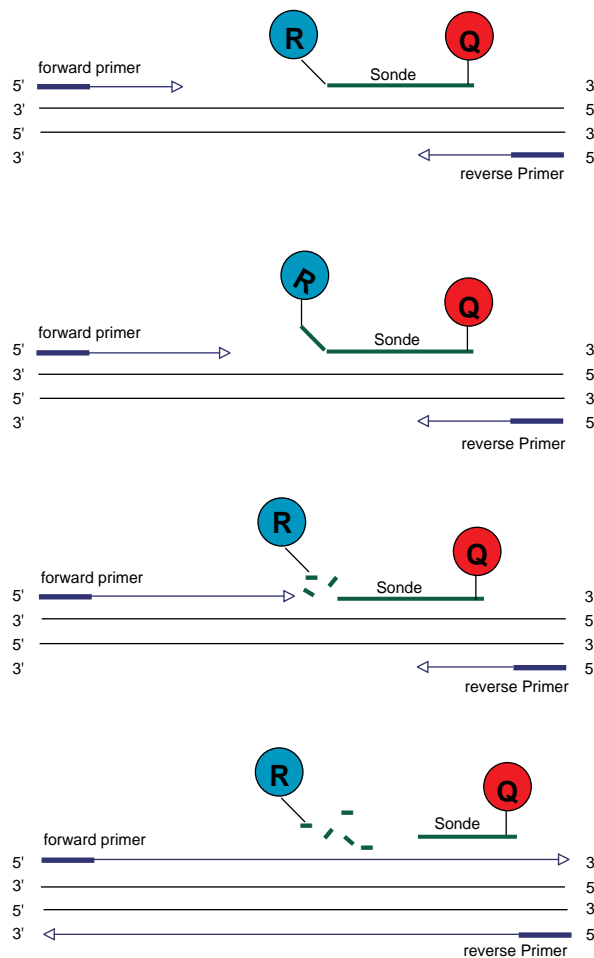


Abb.6: Schematische Darstellung der quantitativen PCR mit fluorogenen Sonden.

Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) und an ihrem 3`-Ende den sogenannten Quencher (Rhodamin-Derivat). Die Anregung der intakten Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm führt dazu, daß die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Energietransfer unterdrückt wird. Im Verlauf der PCR hybridisieren Primer und Sonde zunächst am Matrizenstrang, in der Extensionsphase beginnt die Taq- Polymerase die Sonde zu verdrängen. Durch die entstehende Y-förmige Struktur kann die 5`-3`-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert werden, wobei die Sonde geschnitten wird (Abb. 6).

Eine Hydrolyse freier, nicht hybridisierter Sonde findet nicht statt. Als Folge der Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und

Quencher unterbrochen, so daß mit der Akkumulation des PCR-Produktes die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes mit jedem PCR-Zyklus proportional ansteigt. Die Intensität der Fluoreszenz-Signale wird kontinuierlich aufgezeichnet (SDS 7700, Sequence Detection System, Fa. Perkin-Elmer). Tab. 3 gibt eine Übersicht über die bei der quantitativen PCR verwendeten Farbstoffe:

Tab.3. Zusammenstellung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für die quantitative *RHD*-PCR (verändert nach: Schild, T.)

Farbstoff	chemische Bezeichnung	Emission	Typ
TAMRA	6-Carboxy-tetramthyl-rhodamin	582 nm	Quencher
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	602 nm	passive Referenz
FAM	6-Carboxy-fluoreszein	518 nm	Reporter
TET	Tetrachloro-6-carboxy-fluoreszein	538 nm	Reporter

1.3 Ziele der Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit umfaßt zwei klinisch bedeutsame Anwendungen der molekulargenetischen Diagnostik mittels PCR.

Für die Suche nach genetischen Risikofaktoren bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit sollten folgende Ziele erreicht werden:

- die Entwicklung einer Methode, die eine Genotypisierung großer Patientenkollektive mit einem vertretbaren Aufwand erlaubt,
- die analytischen Qualitäten des Nachweissystems und die Anwendbarkeit der Strategie auf verschiedene Polymorphismen sollen gezeigt werden und
- es sollte am Beispiel des Herzinfarktes untersucht werden, ob genetische Faktoren mit dem individuellen Risiko für arterielle Thrombosen oder für das Fortschreiten der Gefäßerkrankung verknüpft sind.

Bei der quantitativen Rhesus-PCR standen folgende Ziele im Vordergrund:

- eine Methode zu entwickeln, um *RHD* -homozygote von -heterozygoten Individuen zu unterscheiden und damit das Risiko einer feto-maternalen Rhesus-Inkompatibilität abzuklären,
- eine leistungsfähige Methode aufzubauen, die geringste Spuren fetaler DNA im mütterlichen Plasma erfaßt und
- die Zuverlässigkeit dieser nichtinvasiven Diagnostik im Vergleich mit dem bisher üblichen *RHD*-Nachweis aus Fruchtwasser zu prüfen.

2. Material und Methoden

2.1 DNA-Typisierung aus Vollblut

2.1.1 Isolierung und Quantifizierung der DNA

Für die Extraktion der DNA wurden 200 µl EDTA-Blut eingesetzt. Sie wurden wie für den QIAmp Blood-Kit (Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland) beschrieben behandelt. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl.

Messung der Extinktion bei 260 nm

10 µl einer 1:1 verdünnten DNA-Lösung wurden mit dem Photometer GenQuant II (Fa. Pharmacia, Deutschland) gemessen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 5 mm.

Färbung mit PicoGreen®

Alternativ zur UV-Messung wurde eine Färbung der DNA mit PicoGreen® (Fa. MoBiTec, Göttingen) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung eines Ansatzes aus gleichen Teilen 1:10 verdünnter DNA und PicoGreen® erfolgte mit dem SDS 7700 (Sequence Detection System 7700, Fa. Perkin Elmer) als Fluorimeter. Für die Bestimmung der Konzentration wurde vorab eine Standardreihe in einem Bereich von 0 bis 12 µg/ml DNA erstellt.

2.1.2 PCR

2.1.2.1 HPA -1, -2, -3 und -5

PCR für die Detektion der Produkte im ELISA

Für die Genotypisierung der Thrombozyten-Antigene mittels SSP-PCR wurden 100 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl in die Reaktion eingesetzt. Die Sequenz der spezifischen Primer sind Tabelle 4 zu entnehmen, die Reaktionsansätze und Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die in den PCR-Ansätzen verwendeten Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP's) wurden von der Fa. Invitrogen bezogen. Magnesiumchlorid, Puffer und die DNA-Polymerase für die HPA-1,-2 und -5 waren Produkte der Fa. Perkin-Elmer, die entsprechenden Komponenten für den PCR-Ansatz der HPA-3 waren von der Fa. QIAgen (Hilden, Deutschland).

Tab. 4. Sequenz-spezifische Primer für die Genotypisierung der Thrombozyten-Antigene-1,-2,-3 und-5. (Dig = Digoxigenin; Fl. = Fluoreszein)

Spezifität	Sequenz
HPA-1a	5'-Fl.-CTTACAGGCCCTGCCTCT
HPA-1b	5'-Dig.-CTTACAGGCCCTGCCTCC
HPA-1-antisense	5'-Biotin-TGCTTCAGGTCTCCCC
HPA-2a	5'-Dig.-CCCCCAGGGCTCCTGAC
HPA-2b	5'-Fl.-CCCCCAGGGCTCCTGAT
HPA-2-antisense	5'-Biotin-GCAGCCAGCGACGAAAATA
HPA-3a	5'-Dig.-GGGGGAGGGGCTGGGGA
HPA-3b	5'-Fl.-GGGGGAGGGGCTGGGGC
HPA-3-antisense	5'-Biotin-GGCCCTGGGACTGTGAATG
HPA-5a	5'-Dig.-AGGAAGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAG
HPA-5b	5'-Fl.-AGGAAGAGTCTACCTGTTTACTATCAAAA
HPA-5-antisense	5'-Biotin-CTCTCATGGAAAATGGCAGTA

Tab.5. Reaktionsansätze und Amplifikationsbedingungen für die Genotypisierung der Thrombozyten-Antigene-1,-2,-3 und -5.

	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-5
PCR-Puffer	60 mM Tris-HCl	30 mM Tris-HCl	Tris-HCl 8,7	10 mM Tris-HCl
pH-Wert	8,5	8,5		8,3
Magnesiumchlorid	1,5mM	1,5mM	2,5mM	2,5 mM
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's)	250 µM	250 µM	250 µM	250 µM
spezifischer Primer für das Allel a	500 nM	500 nM	250 nM	500 nM
spezifischer Primer für das Allel b	100 nM	500 nM	500 nM	500 nM
gemeinsamer Primer	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM
AmpliTaq Gold	0,5 U	0,5 U	---	0,5 U
HotStarTaq Polymerase	---	---	0,8 U	---
<u>Thermozykler - Programm</u>				
Enzymaktivierung	10 Min. 94°C	10 Min. 94°C	15 Min. 94°C	10 Min. 94°C
Amplifikation	<u>30 Zyklen je:</u> 60 Sek. 94°C 120 Sek. 65°C 60 Sek. 72°C	<u>30 Zyklen je:</u> 60 Sek. 94°C 120 Sek. 65°C 60 Sek. 72°C	<u>32 Zyklen je:</u> 10 Sek. 94°C 30 Sek. 65°C 30 Sek. 72°C	<u>32 Zyklen je:</u> 10 Sek. 94°C 30 Sek. 65°C 30 Sek. 72°C
Extension	10 Min. 72°C	10 Min. 72°C	3 Min. 72°C	3 Min. 72°C

PCR für den Nachweis der Amplikons im Agarose-Gel

Für die Validierung des PCR-ELISA und stichprobenartige Kontrollen der ermittelten Ergebnisse wurde eine PCR mit nachfolgender Detektion der PCR-Produkte im Agarose-Gel durchgeführt. Die Sequenz der spezifischen Primer sowie die PCR-Bedingungen entsprachen der publizierten Methode von Klüter et al. (1996).

2.1.2.2 Prothrombin (Gerinnungsfaktor II) G20210A Mutation

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Puffer (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,3), MgCl₂ (2.5 mM), den spezifischen Primern (je Primer 250 nM) dNTP's (250 µM), AmpliTaq Gold (1 U) sowie 100 ng DNA durchgeführt. Für die Amplifikation mittels „Hot Start“-Technik wurde zunächst ein 10minütiger Initialisierungsschritt von 95°C gewählt und anschließend 28 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden 94°C und 60°C. Die Anzahl der Zyklen mußte für einen Nachweis der PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese auf 35 erhöht und ein abschließender Extensionsschritt von 72°C für 3 Minuten eingeführt werden.

Tab. 6. Sequenz-spezifische Primer für den Nachweis der G20210A Mutation des Gerinnungsfaktors II (Fl=Fluoreszein; Dig=Digoxigenin)

Spezifität	Sequenz
Wildtyp	5'-Fl.-CAC TGG GAG CAT TGA GGA TC
Mutation	5'-Dig.- CAC TGG GAG CAT TGA GGA TT
gemeinsamer Primer	5'-Biotin-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC

2.1.2.3 Gerinnungsfaktor V G1691A Polymorphismus

Die Endkonzentration der im Mastermix enthaltenen Komponenten war analog zu der oben beschriebenen für das Prothrombin, die Konzentration der Primer betrug 500 nM. Für die Amplifikation waren 35 Zyklen je 30 Sekunden 94°C; 45 Sekunden 60°C; 45 Sekunden 72°C nach einer Initialisierung von 10 Minuten bei 95°C notwendig. Ein Nachweis der Amplikons im Agarose-Gel erforderte einen zusätzlichen Extensionsschritt von 72°C für 3 Minuten.

Tab.7. Sequenz-spezifische Primer für den Nachweis der G1691A Mutation des Gerinnungsfaktors V (Fl=Fluoreszein; Dig=Digoxigenin)

Spezifität	Sequenz
Wildtyp	5'-Fl.-CAG ATC CCT GGA CAG ACG
Mutation	5'-Dig.-CAG ATC CCT GGA CAG ACA
gemeinsamer Primer	5'-Biotin-TGT TAT CAC ACT GGT GCT TAA

2.1.2.5 Deletions-/Insertions-Polymorphismus des „Angiotensin Converting Emzyme“ (ACE)

Für den Nachweis der Insertion/Deletion im Intron 16 des *ACE*-Gens wurde die PCR in einem Mastermix (Endvolumen 20 µl) von 1xPuffer (Fa. Perkin Elmer), MgCl₂ (3 mM), dNTP (100 µM), AmpliTaq Gold (0,5 U), 100 ng DNA sowie den spezifischen Primern (je 66 nM) durchgeführt. Einer Aktivierung der AmpliTaq Gold bei 95°C für 10 Minuten schlossen sich 27 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil an: 30 Sekunden 94°C und 60 Sekunden 60 °C. Abschließend erfolgte ein 10minütiger Extensionsschritt bei 72 °C.

Tab.8.: Sequenz-spezifische Primer für den Nachweis des Deletions-/Insertions Polymorphismus des Angiotensin Converting Enzyms (Fl=Fluoreszein; Dig=Digoxigenin)

Spezifität	Sequenz
Insertion	5'-Fl.-CAT CCT TTC TCC CAT TTC TC
Deletion	5'-Dig.-TGG GAT TAC AGG CGT GAT ACA G
gemeinsamer Primer	5'-Biotin-ATT TCA GAG CTG GAA TAA AAT T

Eine Kontrolle der Ergebnisse durch Gel-Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Rigat et al. (1992). Die homozygote Deletion zeigt Produkte mit einer Größe von 190 bp . Bei der homozygoten Insertion sind 460 bp und 360 bp-große Amplikons und beim heterozygoten Typ alle drei detektierbar.

2.1.3 ELISA

100 µl des 100-500fach verdünnten Amplifikats (Verdünnungspuffer: 27 mM NaH₂PO₄; 35 mM Na₂ HPO₄; 626 mM NaCl; 3,72 mM Zwittergent 3-12; 0,625 g/l BSA; pH 6,5) wurden auf eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte (Fa. MicroCoat, Deutschland) pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Produkte durch 4-maliges Waschen (68 µM CaCl₂; 9 mM NaCl) entfernt und 100 µl des Peroxidase-markierten Anti-Digoxigenin bzw. -Fluoreszein (Fa. Roche)

zugegeben. Wiederum wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Konzentration der Antikörper wurde vorab durch Titration bestimmt, die entsprechenden Verdünnungen erfolgten in einem Puffer aus 100 mM Tris; 154 mM NaCl; 1,026 mM Phenol; 3 g/l BSA; pH 7,5 (Konzentration der Antikörper: siehe Tabelle 9). Nach Bindung der Antikörper wurde erneut 4x gewaschen und durch Zugabe des Substrates (200 µl Tetramethylbenzidin in Acetatpuffer) die Farbreaktion gestartet. Beendet wurde sie nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten im Dunklen durch Zugabe von 100 µl einer 2,5 M H₂SO₄-Lösung. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Referenzfilter von 620 nm (Spektra Thermo; Fa. SLT; Crailsheim, Deutschland).

Tab.9. Antikörper-Konzentration für den Nachweis der Amplikons mit einem ELISA

	Anti-Digoxigenin (mU)	Anti-Fluoreszein (mU)
HPA-1	3,00	5,00
HPA-2	3,00	15,00
HPA-3	3,00	15,00
HPA-5	3,75	7,50
Prothrombin	3,00	3,75
Faktor V	3,00	15,00
ACE	3,00	15,00

2.1.3.1 Auswertung

Um vergleichbare Meßergebnisse zwischen den PCR-Läufen zu erhalten, wurden die optischen Dichten mit nachfolgender Formel normiert (OD= optische Dichte; Dig.= Digoxigenin; Fl= Fluoreszein; norm.= normiert):

$$OD_{\text{Dig. norm.}} = (2 / (OD_{\text{Dig.}} + OD_{\text{Fl.}})) * OD_{\text{Dig.}}$$

$$OD_{\text{Fl. norm.}} = (2 / (OD_{\text{Dig.}} + OD_{\text{Fl.}})) * OD_{\text{Fl.}}$$

2.2 Quantitative PCR zur Bestimmung der *RHD*-Zygotie

2.2.1 Isolierung der DNA

300 µl EDTA-Blut wurden in den PureGene DNA-Isolierungskit (Fa. Gentra Systems, Inc.; Minneapolis, USA) eingesetzt und entsprechend den Vorgaben des Herstellers für die Bearbeitung von Blutproben behandelt. Abschließend wurde die DNA in 100 µl H₂O gelöst. Die Nukleinsäure-Quantifizierung erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben.

2.2.2 PCR

10 µl DNA wurde mit Konzentrationen von 10, 50, 100 und 300 ng in einem Mastermix (Endvolumen 25 µl) aus 1x TaqMan Puffer A (Fa. Applied Biosystems), 5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP's; 1,25 U AmpliTaq Gold, je 300 nM Primer, sowie 200 nM der fluorogenen Sonden eingesetzt (Sequenz der Primer und Sonden: siehe Tab.10). Sowohl die PCR (10 Minuten 95°C; 55 x (15 Sekunden 95°C; 1 Minute 70°C)) als auch die kontinuierliche Detektion der fluoreszierenden PCR-Produkte erfolgte mit dem SDS 7700 (Sequence Detection System 7700, Fa. Perkin-Elmer).

Tab.10. Sequenz der Primer und der fluorogenen Sonden für die Bestimmung der *RHD*-Zygotie

Spezifität	Sequenz
a) <u>Primer</u>	
<i>RHD</i>	GGC CAC CAT CAG TGC TTT G
<i>RHCE</i>	TGG CCA CCA TGA GTG CTA TGT
gemeinsamer Primer	CTC CAC CAG CAC CAT CAC C
b) <u>fluorogene Sonde</u>	
<i>RHD</i>	5'- <u>FAM</u> -TGC TGA TCT CAG TGG ATG CTG TCT TGG-TAMRA-3'
<i>RHCE</i>	5'- <u>TET</u> -TGC TGA TCT CAG CGG GTG CTG TCT- TAMRA-3'

2.2.3 Auswertung

Die Fluoreszenzsignale der Zyklen 1-15 wurden gemessen und als unspezifisches Hintergrundsignal bewertet. Die 10fache Standardabweichung wurde zum Mittelwert addiert und als Schwelle für die Bestimmung des Ct-Wertes festgelegt. Der Ct-Wert entspricht also der Zahl der PCR-Zyklen bei der die Fluoreszenzintensität die Schwelle erreicht.

Geringe Volumenschwankungen in den einzelnen Reaktionsansätzen wurden durch einen passiven Referenzfarbstoff (im TaqMan-Puffer A enthaltenes ROX) rechnerisch ausgeglichen, indem der Quotient aus den Emissions-Intensitäten des Reporterfarbstoffes und der passiven Referenz gebildet wurde.

Für die Ermittlung der *RHD*-Zygotie wurden die Ct-Werte der *RHD*-spezifischen FAM-Sonde von den Ct-Werten der *RHCE*-spezifischen TET-Sonde subtrahiert und als $\Delta Ct_{TET-FAM}$ bezeichnet. Für eine Vergleichbarkeit der berechneten Werte wurde die Differenz der TET- und FAM-Kurve bei der halbmaximalen Steigung ermittelt.

2.3 Quantitative PCR zum Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Plasma

2.3.1 Isolierung der DNA

Das mütterliche EDTA-Blut wurde zunächst bei 3000g zentrifugiert und anschließend das Plasma - ohne Beschädigung des Buffy-Coats - von den zellulären Bestandteilen getrennt. Um noch verbleibende Zellen zu entfernen, wurde das Plasma erneut bei 3000g zentrifugiert und wiederum vorsichtig von den restlichen Zellen getrennt. 1ml des Plasmas diente der Isolierung der fetalen DNA mit dem QIAmp DNA Blood Midi Kit (Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland). Dem Puffer AL wurde eine Fremd-DNA als Carrier zugefügt (10 µg/ml DNA aus Fischsperma, Fa. Roche, Mannheim, Deutschland), anschließend erfolgte die Behandlung der Probe nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 100 µl H₂O eluiert, bei 60°C im Vakuum

unter Zentrifugation (Speed Vac, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet und in 55 µl H₂O resuspendiert.

2.3.2 Nachweis RhD-positiver fetaler DNA im Plasma RhD-negativer Mütter

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einer Lösung aus TaqMan Puffer A, 5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP's; 2,5 U AmpliTaq Gold, je 300 nM Primer, sowie der fluorogenen Sonde. Als interne Kontrolle diente die Amplifikation des *RHCE*-Gen. Die verwendeten Primer und fluorogenen Sonden sind bereits in Tabelle 10 aufgeführt. Die Amplifikation wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 10 Minuten 95°C und anschließend 50 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und 1 Minute 65°C (SDS 7700).

2.3.3 Auswertung

Wie für die Auswertung der Bestimmung der *RHD*-Zygotie beschrieben (2.2.3), wurden auch bei dem Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Plasma für die Ermittlung des Ct-Wertes die Fluoreszenzsignale der Zyklen 1-15 gemessen und als unspezifisches Hintergrundsignal bewertet. Auch hier wurde eine 10fache Standardabweichung gewählt, die zum Mittelwert addiert wurde und damit die Schwelle für die Bestimmung des Ct-Wertes festlegt. Der passive Referenzfarbstoff ROX diente dem rechnerischen Ausgleich geringer Volumenschwankungen, indem die Fluoreszenzsignale des Reporterfarbstoffes (FAM oder TET) durch die Emissions-Intensität der passiven Referenz dividiert wurden.

2.4 APC-Resistenz

Der funktionelle Nachweis einer Gerinnungsfaktor V - Variante anhand der Resistenz gegen das aktivierte Protein C wurde mit dem Testkit APCTMResistance V (Instrumentation Laboratory, Lexington, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung erfolgte vollautomatisch

mit dem Gerinnungsautomaten ACC 300 Research System (Instrumentation Laboratory).

Aus den gemessenen Zeiten für die aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) mit und ohne Zugabe des aktivierten Protein C wurde der Quotient gebildet.

<u>Quotient</u>	<u>Bewertung</u>
> 2	Wildtyp
< 2	Gerinnungsfaktor V-Mutation

3. Ergebnisse

3.1 PCR-ELISA

3.1.1 Methode

Prinzip

Die der PCR-ELISA-Methode zugrundeliegende Strategie ist in Abb.7 am Beispiel des HPA-1 schematisch dargestellt. Basierend auf einer unterschiedlichen Markierung der spezifischen Primer, werden in einem Reaktionsansatz PCR-Produkte gebildet, die entweder Fluoreszein (HPA-1a) und/oder Digoxigenin (HPA-1b) an ihrem 5'-Ende tragen. Zusätzlich wird das 3'-Ende der Amplifikate durch den gemeinsamen Primer

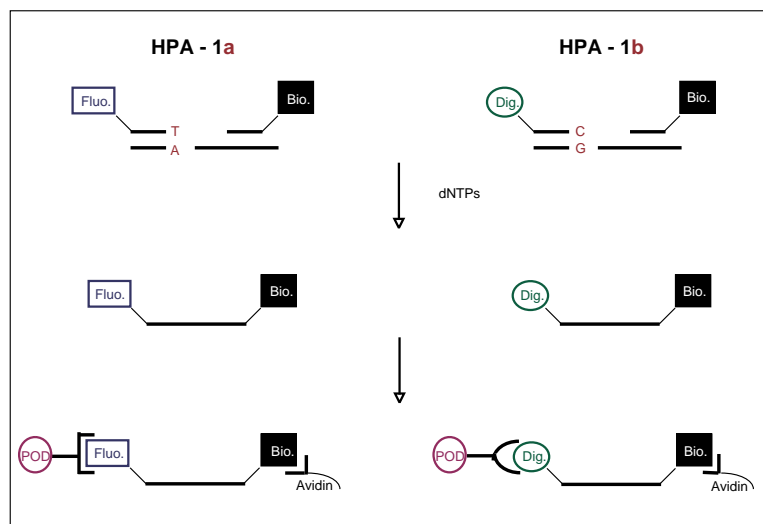


Abb.7: Schematische Darstellung der PCR-ELISA-Methode

biotinyliert. Dies ermöglicht die Bindung des Amplikons über die Interaktion von Biotin und Avidin an eine beschichtete Mikrotiterplatte. Mit Hilfe eines POD-markierten Anti-Digoxigenin- bzw. Anti-Fluoreszein-Antikörpers können die PCR-Produkte mit einer einfachen Farbreaktion nachgewiesen werden.

Vorraussetzungen

Die neue Strategie kann nur dann zuverlässig funktionieren, wenn mehrere Bedingungen erfüllt sind.

Zunächst sollte sichergestellt sein, daß in Gegenwart aller drei Primer keine Konkurrenzbedingungen auftreten, die die Ergebnisse gegenüber dem

konventionellen Ansatz der beiden getrennten Reaktionen mit je einem Primerpaar verfälschen könnten.

Zudem muß die PCR so stringent ablaufen, daß ausschließlich die gewünschten Produkte entstehen. Bei einer Analyse der Produkte im Agarose-Gel dürfen keine Nebenbanden erkennbar sein, die unspezifisch zu Signalen im ELISA-Detektionssystem beitragen könnten.

Weiterhin muß dann der Bereich ermittelt werden, in dem der ELISA die Amplikons konzentrationsabhängig nachweist. Nur für diesen Meßbereich ist eine eindeutige Zuordnung der gemessenen OD-Werte zu den Genotypen gewährleistet.

3.1.2 Analytische Qualitäten

3.1.2.1 Spezifität

Um Interaktionen der beiden allelspezifischen Primer untereinander auszuschließen, wurden diese in einem Parallelversuch sowohl getrennt als auch gemeinsam in die PCR eingesetzt (Abb.8).

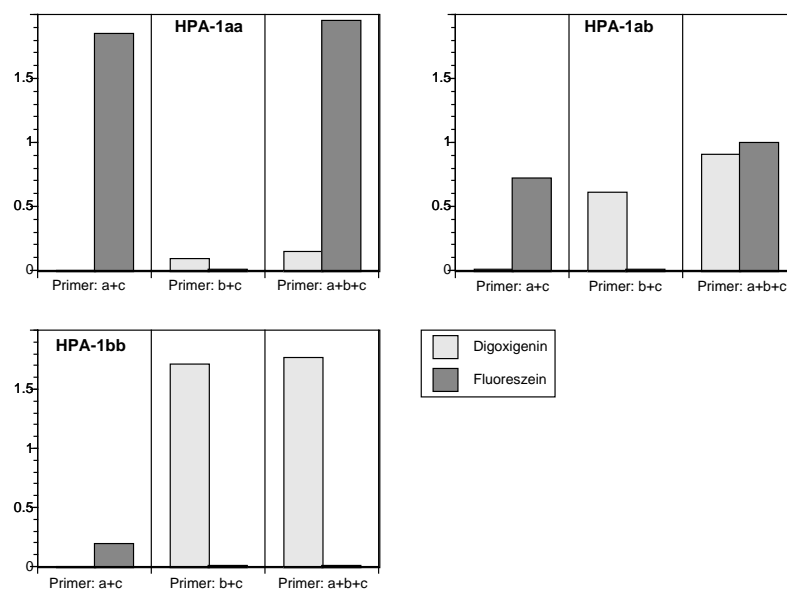


Abb. 8: Vergleich des getrennten und gemeinsamen Ansatzes der allelspezifischen Primer in der PCR (a=Fluoreszein-markierter-allelspezifischer Primer für das HPA-1a; b=Digoxigenin-markierter-allelspezifischer Primer für das HPA-1b; c- antisense Primer). Die Detektion der Amplikons erfolgte mittels ELISA.

Die Detektion der PCR-Produkte im ELISA ergab bei dem alleinigen Einsatz des HPA-1a-spezifischen Primers ein deutliches Signal sowohl für eine HPA-1aa- als auch eine HPA-1ab-Probe. Eine HPA-1bb-Probe zeigte eine optische Dichte $< 0,2$ nach Amplifikation und Detektion. Wurde nur der HPA-1b-spezifische Primer eingesetzt, so konnte die HPA-1aa-Probe nicht detektiert werden, für HPA-1ab und HPA-bb waren eindeutige Signale meßbar. Der Einsatz aller drei Primer in einem PCR-Ansatz ließ keine unspezifischen Reaktionen erkennen: der Ansatz mit der HPA-1aa-Probe zeigte nur das Signal für das Fluoreszein-markierte Produkt, mit der HPA-1bb-Probe nur das Signal für das Digoxigenin-markierte Produkt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die PCR in Gegenwart beider allel-spezifischer Primer für HPA-1a und HPA-1b praktisch die gleichen Amplifikate lieferte wie die separaten Reaktionen mit nur einem der allel-spezifischen Primer.

Bei dem in Abb.8 dargestellten Experiment wurden $0,2 \mu\text{l}$ PCR-Produkt in den ELISA eingesetzt. Um sicherzustellen, daß die Spezifität der Methode auch bei größeren bzw. kleineren Amplifikatmengen gegeben ist, wurden

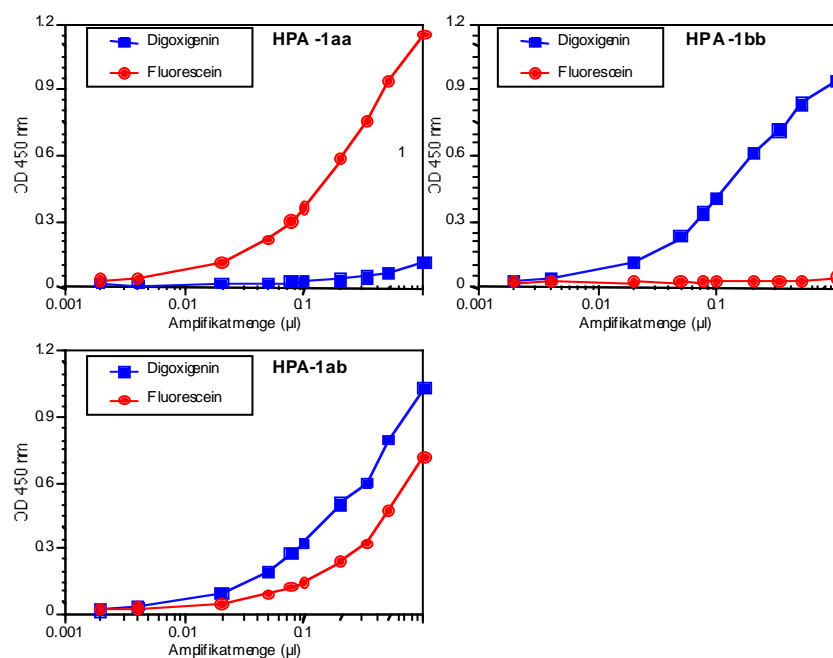


Abb.9: Einsatz unterschiedlicher Amplifikatmengen in die PCR-ELISA-Methode.

die im ELISA untersuchten Amplifikatmengen so variiert, daß sie einem Volumen von 0,002 bis 1 µl entsprachen (Abb.9). Wie schon in dem vorangegangenen Experiment zeigte der Ansatz mit der HPA-1aa-Probe nur das Fluorescein-Signal, mit der HPA-1bb-Probe nur das Digoxigenin-Signal. In dem Bereich von 0,002 bis 0,1 µl Amplifikat waren keine ausreichenden Signalintensitäten detektierbar. Der Einsatz von 0,1 bis 1µl PCR-Produkt lieferte eindeutige Signale im ELISA ohne einen Hinweis auf unspezifische Produkte.

3.1.2.2 Sensitivität und Linearität

Abb. 10 zeigt die Intensität der Signale des Detektionssystems für Fluorescein- bzw. Digoxigenin-markierte Produkte in Abhängigkeit von der zur PCR eingesetzten DNA-Konzentration einer heterozygoten HPA-1

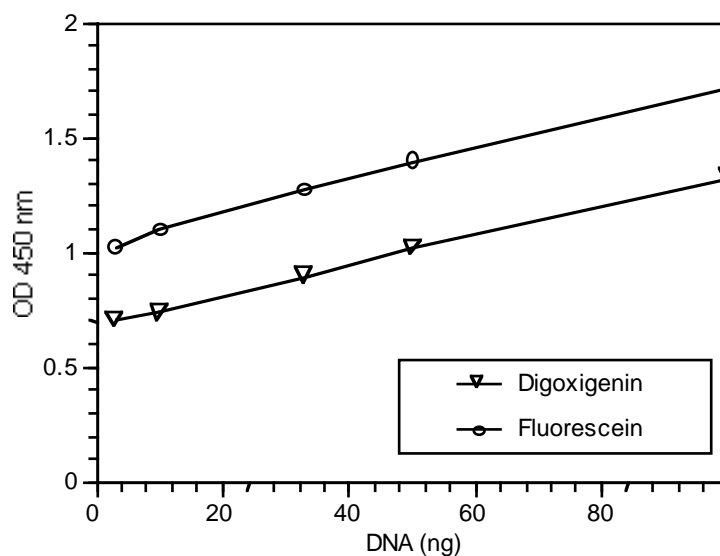


Abb. 10: PCR-ELISA mit Variation der eingesetzten DNA-Konzentration zum Nachweis der Sensitivität und Linearität.

Probe. Der zuverlässige HPA-1ab Nachweis aus einer Menge von nur 3 ng Gesamt-DNA spricht für die große Sensitivität der Methode. Darüberhinaus erfaßte der PCR-ELISA HPA-1ab Amplifikate über einen Bereich von mindestens 3-100ng Gesamt-DNA pro Ansatz.

3.1.2.3 Reproduzierbarkeit

Die Varianz der ermittelten Werte innerhalb eines Experimentes wurde durch den Einsatz von 16 identischen Proben untersucht. Aus den Ergebnissen berechnete sich eine Standardabweichung von 0,02 O.D. und ein relativer Variationskoeffizient von 2,3%. Für die Ermittlung der Variabilität der Ergebnisse einer Probe in verschiedenen Versuchsserien wurden Standards eingeführt, die sowohl die PCR als auch den nachfolgenden ELISA kontrollieren. Für diesen Zweck wurden von jedem Genotyp Proben gepoolt und aliquotiert eingefroren. Diese Aliquots wurden bei jeder Reaktion sowohl in der PCR als auch im ELISA mitgeführt und dienten damit der Kontrolle des Gesamtsystems.

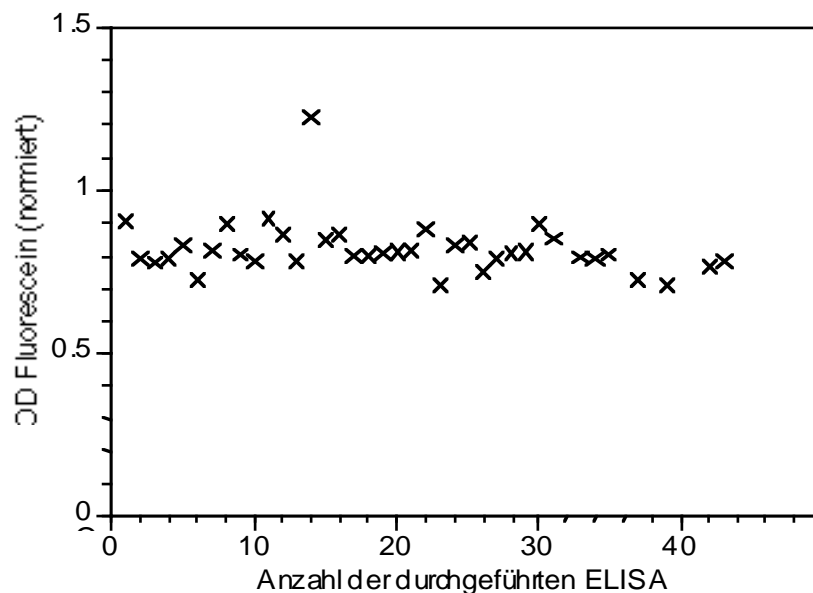


Abb.11: Darstellung der normierten O.D.-Werte eines HPA-1 heterozygoten Standards, die in 44 voneinander unabhängigen ELISA-Testen ermittelt wurden.

Der alleinigen Kontrolle des ELISA dienten ebenfalls gepoolte und aliquotierte Amplifikate, die in drei Volumina (0,2; 0,5 und 1 μ l) im ELISA getestet wurden. Dadurch sollte neben der Reaktivität der Antikörper die Methode über ihren linearen Bereich (vgl. 3.1.2.2 Sensitivität und Linearität) überprüft werden.

Abb.11 zeigt die normierten O.D.-Werte eines heterozygoten Standards, der in 44 unabhängigen Reaktionen getestet wurde. Mit einer Ausnahme im 14. Versuch ($OD_{norm.}=1,22$) lagen die ermittelten Standardwerte zwischen 0,7

und 0,9 und zeigten damit eine sehr gute Reproduzierbarkeit der ELISA-Messungen. Der mit einem normierten O.D.-Wert von 1,22 auffällige Standardwert im vierzehnten durchgeführten ELISA ergab im Folgeversuch einen Wert von 0,85.

3.1.2.4 Validierung der Methode

100 Proben wurden mit der beschriebenen Vorgehensweise typisiert und anschließend verschlüsselt an eine unabhängige zweite Untersucherin weitergegeben. Diese führte eine PCR mit getrennten Ansätzen für den

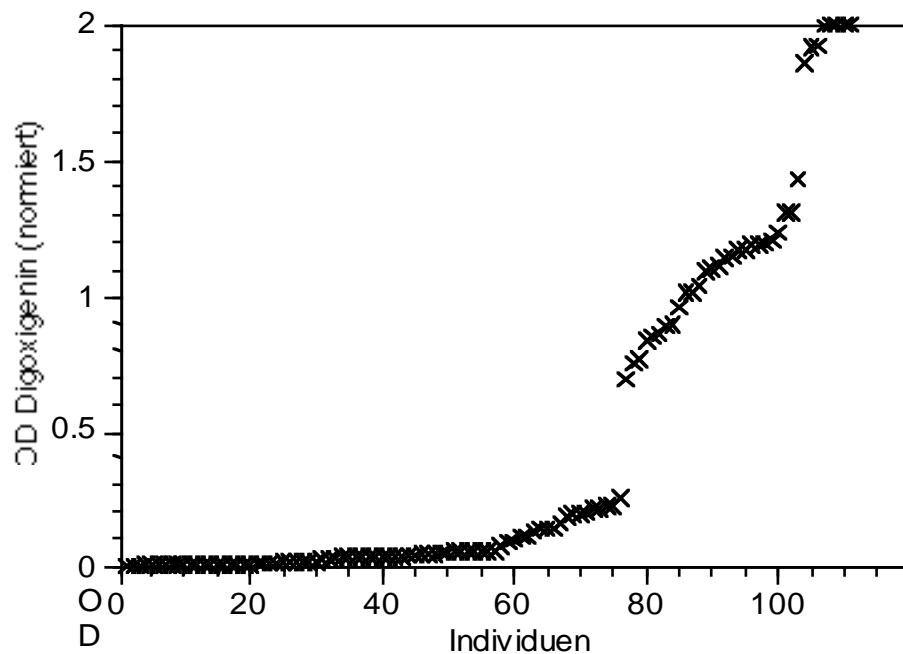


Abb. 12 : Normierte O.D.-Werte von 100 Proben, die parallel in einem Agarose-Gel zwecks Validierung der PCR-ELISA-Methode untersucht wurden.

Nachweis der Produkte mittels Gel-Elektrophorese durch. Ein Vergleich der Ergebnisse ergab eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Methoden.

In Abb.12 sind die normierten Werte der 100 im PCR-ELISA und im Agarose-Gel typisierten Proben dargestellt. Unter diesen Bedingungen wurde die Grenze für HPA-1aa bezogen auf den normierten O.D.-Wert zwischen 0 und 0,3, für HPA-1ab zwischen 0,5 und 1,5 und für HPA-1bb

größer 1,7 festgelegt. Proben, die sich außerhalb dieser Werte befinden, müssen erneut untersucht werden.

3.1.2.5 Anwendungsbeispiele

Die Entwicklung und Validierung der PCR-ELISA-Methode wurde am Beispiel von HPA-1 in allen Einzelheiten beschrieben. Um zu prüfen, ob die Strategie auch auf andere DNA-Typisierungen anwendbar ist, wurde sie auch für den Nachweis von Polymorphismen, wie HPA -2,-3 und -5, Faktor V, ACE (Angiotensin Converting Enzyme) und der Prothrombin-Mutation (G20210A) getestet.

a) HPA-2,-3,-5

Bei der Übertragung der konventionellen HPA-2,-3 und-5 an die PCR-ELISA-Methode wurden analog zu HPA-1 Spezifität, Sensitivität, Linearität und Reproduzierbarkeit überprüft. Mit relativen Variationskoeffizienten von 2,7% / 0,8% (HPA-2aa / -2bb), 6,2% / 3,5% (HPA-5aa / -5bb) und 3,1% / 4,8% (HPA-3aa / -3bb) zeigte sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Validierung erfolgte jeweils mit 50 Proben, die unabhängig mit konventioneller PCR und Nachweis der Produkte im Agarose-Gel

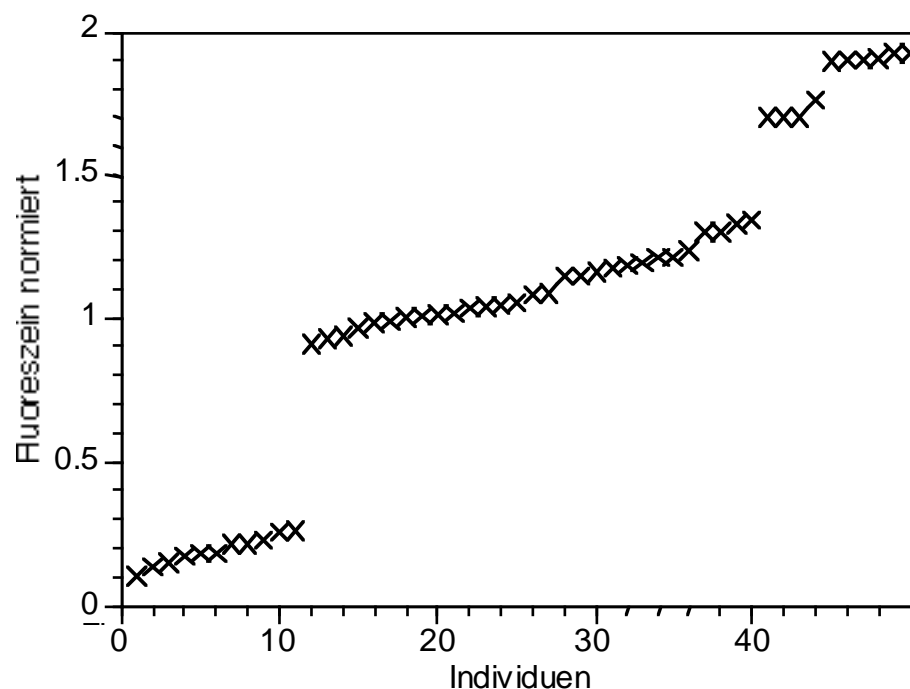


Abb. 13 : Normierte O.D.-Werte für das HPA-3 (0-0,3 = HPA-3aa; 0,9-1,4 = HPA-3ab; > 1,7 = HPA-3bb).

bewertet wurden. Abb.13 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für HPA-3. Bei allen drei Thrombozyten-Antigenen gab es keine Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des PCR-ELISA und der Gel-Elektrophorese.

b) Prothrombin G20210A- und Faktor V A1691G- Mutation

Die ausführlich für die HPA-Typisierung beschriebene PCR-ELISA-Methode wurde auch zur Detektion von Mutationen der Gerinnungsfaktoren II und V erprobt.

Die Validierung des Nachweises für den Polymorphismus des Faktor V beinhaltete neben dem Vergleich von PCR-ELISA und Agarose-Gel zusätzlich die Messung der aPC-Resistenz, einem funktionellen Nachweis einer Mutation des Gerinnungsfaktors V anhand seiner Proteolyse durch das aktivierte Protein C.

Wegen der geringen Frequenz der Mutationen bei Prothrombin und Faktor V, wurden für die Validierung - anders als bei den HPA-2, -3 und -5 - hundert Proben untersucht. Sowohl für Prothrombin als auch für Faktor V ergaben sich übereinstimmende Ergebnisse der PCR-ELISA-Methode und des Nachweises im Agarose-Gel.

Von den auf die Faktor V-Mutation untersuchten Proben zeigten 91 den

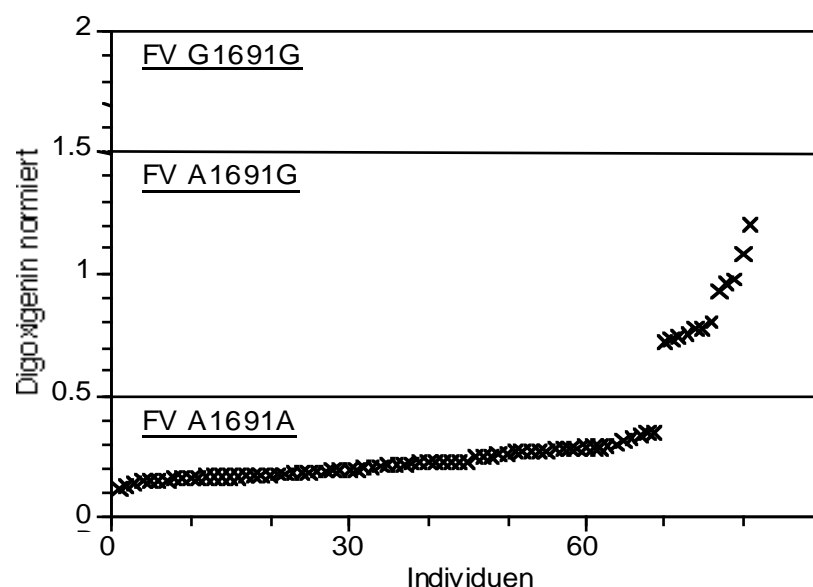


Abb. 14: Ergebnis der Untersuchung von 100 Proben auf die Faktor V-Mutation an Position 1691 (Substitution des A durch G).

Wildtyp, bei 9 Probanden wurde die Mutation in der heterozygoten Form nachgewiesen (Abb.14).

Die als Maß für die aPC-Resistenz ermittelten Quotienten waren für den Wildtyp >2 ; für die heterozygote Mutation - mit einer Ausnahme - zwischen 1,52 und 1,85 und bestätigten damit die im PCR-ELISA und Agarose-Gel identifizierten Genotypen.

Bei der zuvor erwähnten Ausnahme war eine eindeutige Typisierung der heterozygoten Mutation mittels PCR-ELISA und Agarose-Gel erfolgt, der Quotient aus dem aPC-Resistenz-Test ergab >2 .

Um eine Probenverwechslung auszuschließen, wurde eine zweite Probennahme veranlaßt und alle drei Teste erneut durchgeführt. Die Ergebnisse aus dem PCR-ELISA und dem Agarose-Gel zeigten erneut den heterozygoten Genotyp, während der Quotient der aPC-Resistenz wiederum >2 war.

Von den 100 auf den Prothrombin-Polymorphismus untersuchten Proben zeigten nur 2% den heterozygoten Genotyp, die homozygote Mutation konnte wie bei Faktor V in diesem Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Auch bei diesem Anwendungsbeispiel ergaben PCR-ELISA-Methode und Gel-Elektrophorese übereinstimmende Ergebnisse.

c) ACE-Insertions - / Deletions-Polymorphismus

Die Übertragung des konventionellen ACE-Nachweises auf die PCR-ELISA-Methode erfolgte analog zu HPA-1.

In Abb.15 sind die Mittelwerte der normierten Digoxigenin-Signale von 20 aufeinanderfolgenden PCR-Läufen aufgetragen. Mittlere O.D.-Werte von 0,046 (DD; $s = 0,18$); 0,99 (ID; $s = 0,18$) und 1,96 (II; $s = 0,04$) lassen eine eindeutige Unterscheidung der Genotypen zu und zeigen, daß die PCR-ELISA-Methode auch bei einer Insertion/Deletion von 287 bp sehr gute Ergebnisse liefert.

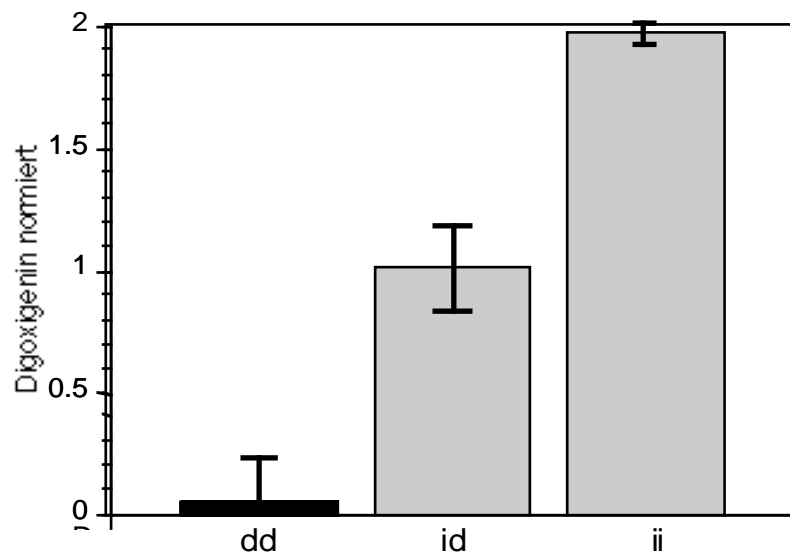


Abb. 15: Mittelwerte und Standardabweichung der normierten O.D.-Werte für den Nachweis der Insertion/Deletion im *ACE*-Gen (n=20).

3.2 Quantitative PCR

3.2.1 Analytische Qualitäten

3.2.1.1 Spezifität

Für den Nachweis des *RHD*-Gens wurden zwei Sonden verwendet, die beide in Exon 3 des Gens binden (*RHD*: FAM-Markierung; *RHCE*: TET-Markierung). Die Ko-Amplifikation des *RHCE*-Gens diente als interne Kontrolle, da sowohl die D-positiven als auch die D-negativen Proben mit dieser Sonde ein Signal liefern müssen. Abb.16 und 17 zeigen die normalisierten Reportersignale für die FAM- bzw. TET-markierte Sonde. Es zeigte sich, daß bei den D-negativen Proben kein Signal für das *RHD*-spezifische FAM, sondern nur für das TET-markierte *RHCE* detektierbar ist. Die D-positiven Proben weisen sowohl das FAM-als auch das TET-Signal auf.

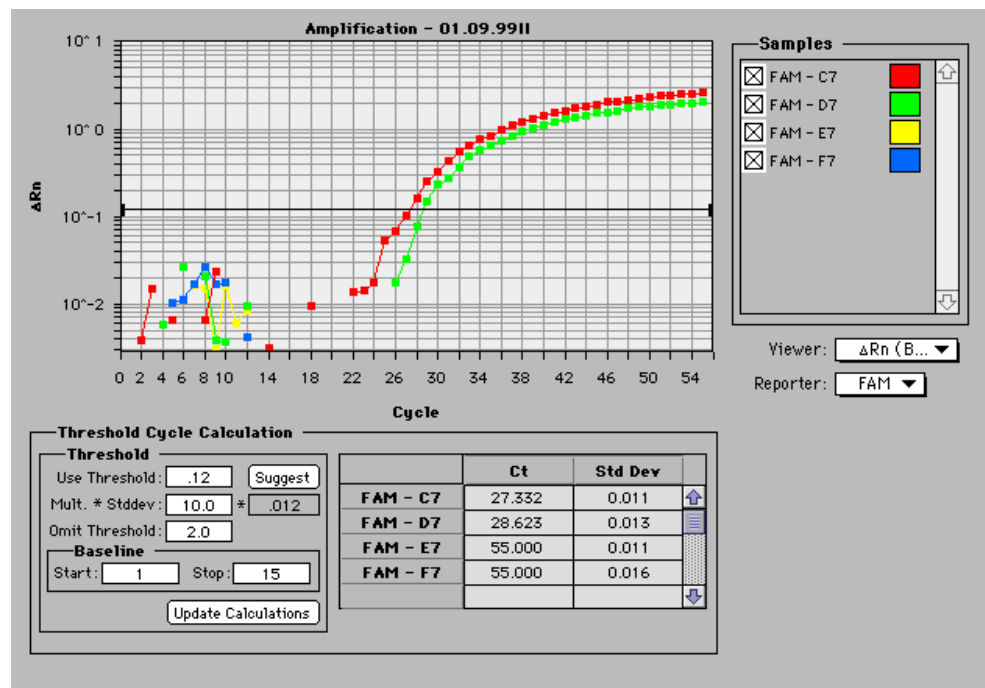


Abb. 16: Amplifikationsverlauf der *RHD*-spezifischen Sonde FAM. Die Positionen C7/D7 sind von D-positiven und E7/F7 von D-negativen Proben belegt.

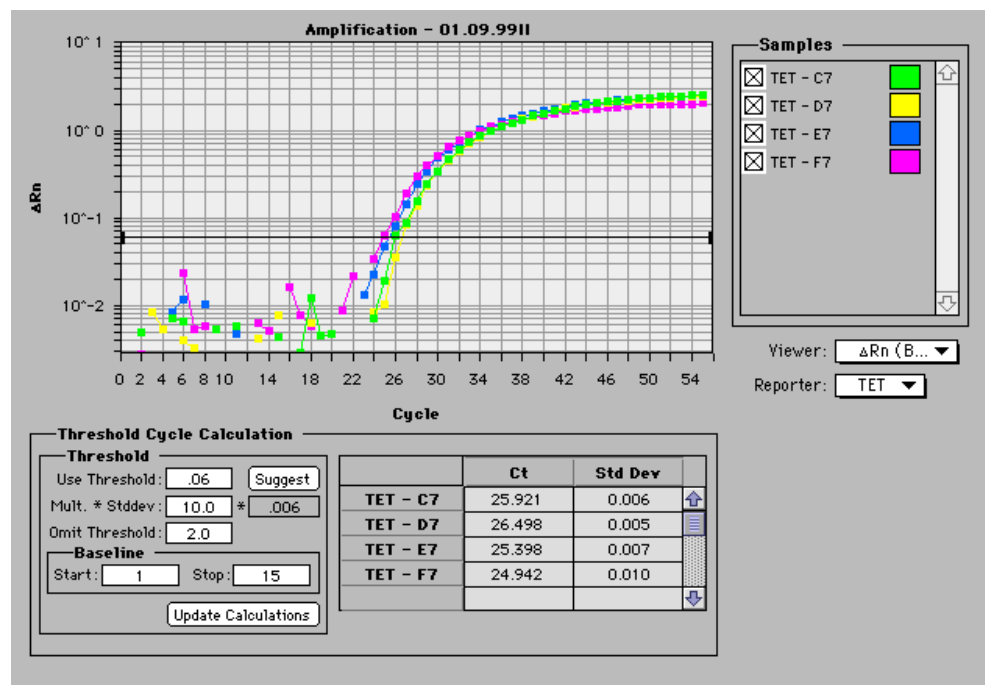


Abb. 17: Amplifikationsverlauf der internen Kontrolle (*RHCE*). Die Belegung der Positionen entspricht Abb. 16.

Insgesamt wurden je 25 D-negative und -positive Proben untersucht. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tabelle 12 dargestellt und belegen die hohe Spezifität der Methode und der ausgewählten Sonden.

Tab.12: Reportersignale der spezifischen Sonden für *RHD* (FAM) und *RHCE* (TET) an je 25 D-positiven und D-negativen Individuen.

lfd. Nr.	D-positiv Ct (FAM)	Ct (TET)	D-negativ Ct (FAM)	Ct (TET)
1	31.55	31.44	>55	28.09
2	33.49	32.61	>55	27.21
3	40.32	35.66	>55	24.41
4	41.43	34.20	>55	24.72
5	32.96	31.04	>55	26.05
6	29.97	31.28	>55	26.96
7	29.81	31.52	>55	26.57
8	28.56	30.65	>55	24.45
9	32.83	32.93	>55	26.26
10	38.17	34.09	>55	24.20
11	36.48	35.17	>55	24.33
12	33.97	33.51	>55	22.71
13	39.74	37.76	>55	34.36
14	39.24	36.99	>55	33.52
15	32.97	33.64	>55	31.36
16	30.69	32.22	>55	30.66
17	31.57	33.31	>55	30.43
18	42.39	32.86	>55	28.65
19	40.31	33.26	>55	27.25
20	38.29	32.22	>55	30.54
21	39.67	35.87	>55	38.62
22	25.98	24.94	>55	31.43
23	33.52	25.42	>55	34.50
24	32.19	28.61	>55	32.24
25	32.52	28.64	>55	27.96

3.2.1.2 Sensitivität und Linearität

Standardkurven von D-positiven Proben wurden in einem Konzentrationsbereich von 1-300 ng Gesamt-DNA erstellt. Abb.18 zeigt die Mittelwerte von 8 Replikaten (Doppelwerte aus 4 PCR-Läufen) sowohl für die *RHD* als auch die *RHCE* spezifische Sonde. Die Methode ist über den

gewählten Bereich linear und mit einer Nachweisgrenze von 1 ng DNA sehr sensitiv.

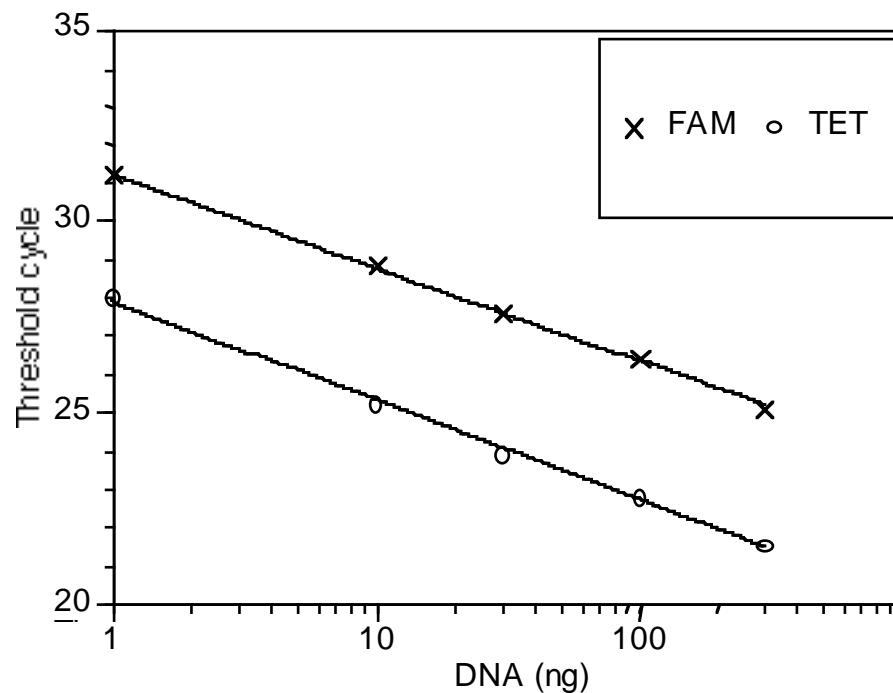


Abb. 18: Detektionszeitpunkt der Reportersignale in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Gesamt-DNA.

Darüberhinaus zeigen die beiden Kurven über ihren linearen Bereich einen parallelen Verlauf, der für die Ermittlung des ΔCt (siehe Material und Methoden) von entscheidender Bedeutung ist.

3.2.1.3 Reproduzierbarkeit

In jedem PCR-Ansatz zum Nachweis der *RHD*-Zygotie wurden eine D negative und -positive Kontrolle sowie ein heterozygoter Standard mitgeführt. Die Ergebnisse aus 25 verschiedenen PCR-Ansätzen zeigt Abb. 19. Aus den ermittelten Ct-Werten errechneten sich für die FAM-Sonde Mittelwerte von 30,2 / 28,5 (D-positiv / heterozygoter Standard) bei Standardabweichungen von 1,3 / 4,7. Für die TET-Sonde ergaben sich Mittelwerte von 26,5 (D-negativ), 26,6 (D-positiv) und 23,9 (heterozygoter Standard). Die entsprechenden Standardabweichungen betragen 0,4 (D-negativ), 0,8 (D-positiv) und 0,5 (heterozygoter Standard). Diese Daten belegen die sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

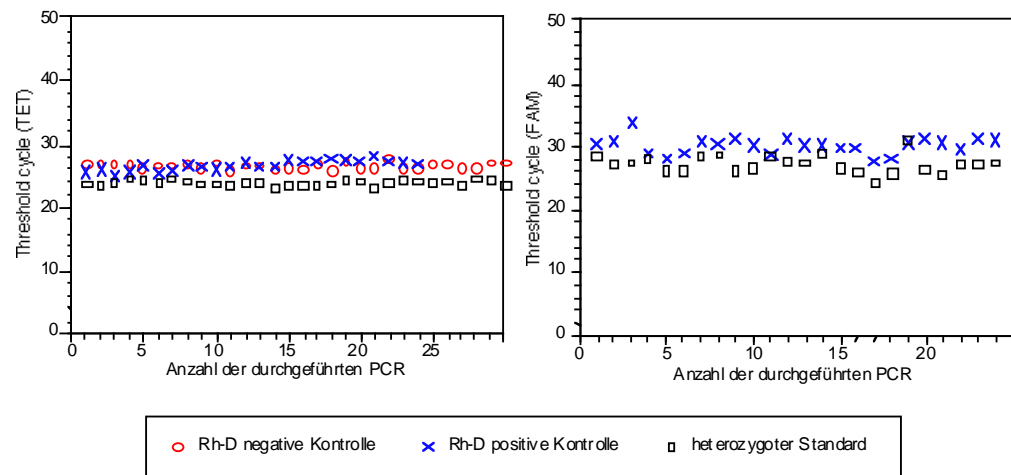


Abb. 19: Ct-Werte für die inter-Assay-Variabilität dreier Standards. In der linken Abbildung sind die Ergebnisse von 25 separaten Versuchsserien mit der *RHCE*-spezifischen TET-Sonde, in der rechten die Ergebnisse mit der *RHD*-spezifischen FAM-Sonde dargestellt.

3.2.2.4 Validierung

Die Validierung der Methode erfolgte mit 100 Proben, die serologisch als D-positiv bestimmt wurden. Abb. 20 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse, dargestellt als die PCR-Zyklenzahl, in der erstmalig ein

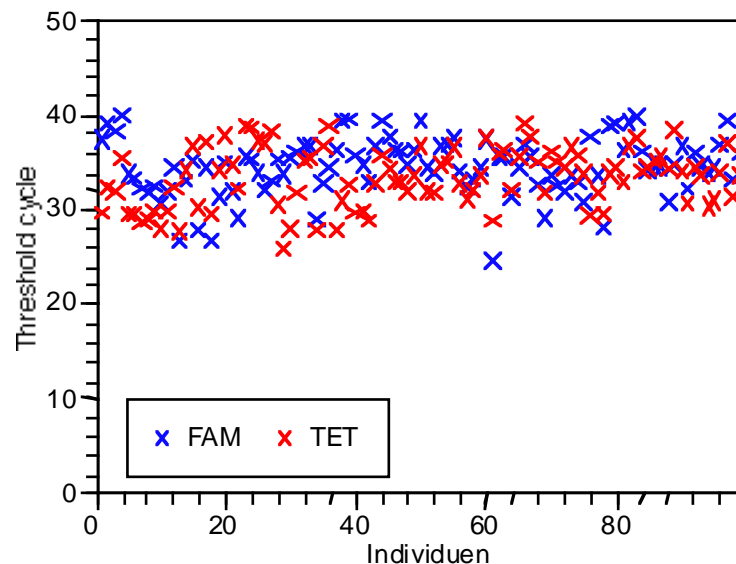


Abb. 20: Ermittelte Ct-Werte der *RHD*- und *RHCE*-spezifischen Sonden von serologisch als RhD- positiv typisierten Proben.

positives Reportersignal (FAM bzw. TET) detektiert wurde. Bei allen hundert Proben gab es keine falsch negativen Ergebnisse, die *RHD*-spezifische, FAM-markierte Sonde zeigte meßbare Fluoreszenzen zwischen einer Zyklenanzahl von 20 bis 40. Ebenso war bei allen Proben *RHCE* als interner Standard detektierbar.

3.3 Genetische Risikofaktoren bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten

3.3.1 Probenmaterial und Patientenmerkmale

Es wurden insgesamt 851 Proben untersucht, die von Patienten der kardiochirurgischen Abteilung der Schüchtermann Klinik in Bad Rothenfelde (433 Proben) und der Kardiologie der Städtischen Kliniken Oldenburg (418 Proben) stammten.

Die Patientendaten sind in Tab.13 zusammengestellt. Der Anteil der Frauen war mit 34% (Schüchtermann Klinik) und 32 % (Städtische Kliniken) vergleichbar; das Durchschnittsalter der Frauen aus der Kardiologie war mit 62,6 Jahren etwas niedriger als das der Frauen aus der Kardiochirurgie (68,7 Jahre).

Tab.13: Daten der 851 Patienten

	Kardiochirurgie		Kardiologie	
	Frauen (n=111)	Männer (n=322)	Frauen (n=101)	Männer (n=317)
Alter (Jahre)	68,7	63,8	62,6	60,1
Bereich	44-62	34-99	29-85	29-85
Diabetes	45 (41%)	59 (19%)	49 (49%)	153 (48%)
Hypertonie	65 (59%)	162 (50%)	39 (39%)	149 (47%)
Myokard- infarkt	54 (49%)	191 (59%)	27 (27%)	134 (42%)
Zahl stenosierter Koronar- arterien	0 0	0	29 (29%)	57 (18%)
	1 13 (12%)	24 (7,5%)	17 (17%)	73 (23%)
	2 29 (26%)	100 (31%)	26 (26%)	96 (30%)
	3 69 (62%)	198 (62%)	29 (29%)	91 (29%)

Der Anteil der Frauen mit einem Myokardinfarkt in der Vorgeschichte lag bei den Patientinnen der Kardiochirurgie mit 49% deutlich höher als bei den kardiologischen Patientinnen. Bei den männlichen Patienten der Schüchtermann-Klinik hatten 59 % bereits einen Myokardinfarkt, bei den Patienten der Städtischen Kliniken waren es 42%. Der Anteil von Patienten mit 3 stenosierten Koronararterien - als Maß für die Schwere der Erkrankung - war mit 62% in der Kardiochirurgie gegenüber 29% in der Kardiologie deutlich höher.

3.3.2 HPA-1-Genotypisierung

Das Ergebnis der 851 auf das Thrombozyten-Antigen-1 untersuchten Proben zeigt Abb.21.

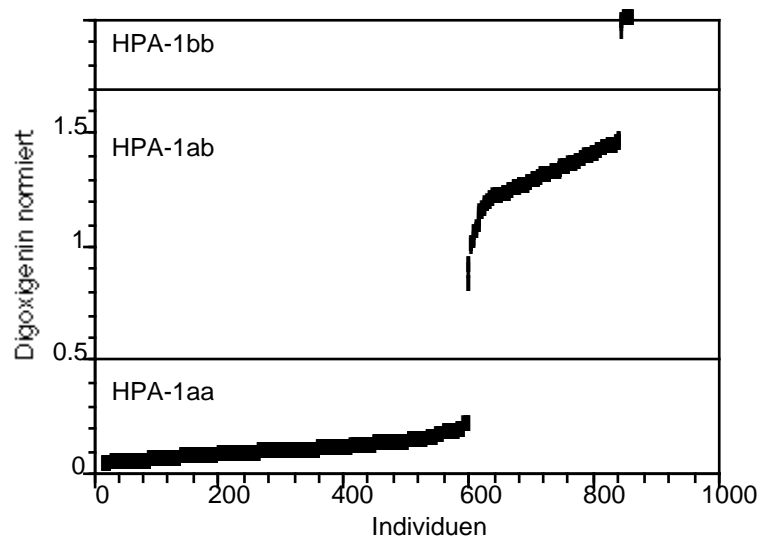


Abb. 21 : HPA-1 Genotypisierung von 851 Patienten der kardiologischen und kardiochirurgischen Abteilung.

Bei 583 (68,5%) der untersuchten Proben konnte HPA-1aa homozygot nachgewiesen werden, 268 (31,5%) waren HPA-1b positiv. Eine Aufteilung der Ergebnisse nach Klinik und Geschlecht (Tab.14) zeigte eine ähnliche Verteilung der Genotypen.

Tab.14: HPA-1-Merkmale der 851 Patienten nach Geschlecht und Klinik

	Kardiochirurgie		Kardiologie	
	Frauen (n=111)	Männer (n=322)	Frauen (n=101)	Männer (n=317)
HPA-1aa	76 (69%)	228 (71%)	65 (64%)	214 (68%)
HPA-1ab	31 (28%)	84 (26%)	32 (32%)	96 (30%)
HPA-1bb	4 (3,6%)	10 (3,1%)	4 (4,0%)	7 (2,1%)
HPA-1b-positiv	35 (32%)	94 (29%)	36 (36%)	103 (32%)

In den vier Gruppen war der Anteil der homozygoten HPA-1-aa-Typen 64% - 71%; auf die HPA-1-b-positiven entfielen 29% - 36%. Die Zuordnung der ermittelten Genotypen zu den Patientengruppen mit und ohne Infarkt in der Vorgeschichte zeigt Tab.15. Im Vergleich zu der Verteilung im Gesamtkollektiv ist ein Zusammenhang von Genotyp und Myokardinfarkt-Anamnese nicht nachweisbar.

Tab.15: Verteilung der HPA-1-Genotypen nach Infarkt-Anamnese

	mit Infarkt (n=406)	ohne Infarkt (n=445)
HPA-1-aa	263 (65%)	320 (72%)
HPA-1-ab	133 (33%)	111 (25%)
HPA-1-bb	10 (2,5%)	14 (3,1%)
HPA-1-b-positiv	143 (35%)	125 (28%)

Der Anteil HPA-1b-positiver Männer und Frauen in Abhängigkeit von der Herzinfarkt-Anamnese für die Altersgruppe jünger und älter als 60 Jahre ist mit einer Frequenz von ungefähr 30% bei beiden Geschlechtern gleich verteilt. Allerdings stieg der Anteil der HPA-1b-positiven Männer, die jünger als 60 Jahre waren und bereits einen Infarkt erlitten hatten auf 38% an. Ein Vergleich der Häufigkeit der HPA-1b-positiven Männer mit und ohne Herzinfarkt in der Vorgeschichte in Abhängigkeit von einer diabetischen Begleiterkrankung zeigt Tab. 16.

Tab. 16: Verteilung der HPA-1b-positiven Männer in Abhängigkeit von Infarktanamnese und Diabetes

Alters- gruppe	mit Diabetes		ohne Diabetes	
	mit Infarkt	ohne Infarkt	mit Infarkt	ohne Infarkt
< 60 Jahre	22/49 (45%)	9/37 (24%)	23/71 (32%)	32/100 (33%)
≥ 60 Jahre	22/79 (28%)	21/65 (32%)	38/141 (27%)	35/115 (30%)

Für die Männer mit einem Alter unter 60 Jahren ist der Anteil der HPA-1b-positiven in der Gruppe mit Herzinfarkt und Diabetes signifikant höher als bei denen ohne diabetische Begleiterkrankung.

3.3.3 Faktor V-Mutation

Die heterozygote Form der Faktor-V-Mutation konnte im Gesamtkollektiv bei 13% der Frauen (28 von 212) und 16% der Männer (101 von 639)

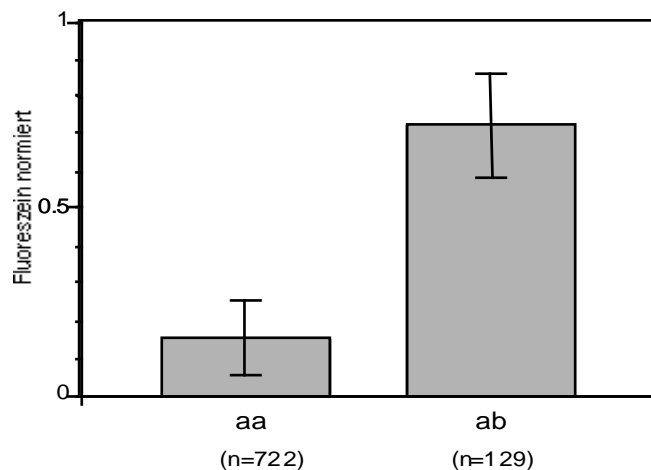


Abb. 22 : Faktor V-Genotypisierung von 851 Patienten (aa=Wildtyp; ab = heterozygote Mutation), dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung der normierten O.D.-Werte. Die homozygote Mutation konnte bei keinem Individuum aus diesem Kollektiv nachgewiesen werden.

nachgewiesen werden, die Mutation in ihrer homozygoten Form bei keinem Individuum (Abb.22). Bei den Patienten der Kardiochirurgie trugen beide

Geschlechter zu 14% die heterozygote Mutation. Im kardiologischen Patientenkollektiv entfiel der G1916A-Typ zu 12% auf die Frauen, bei den Männern trat er zu 17% auf. Unabhängig vom Geschlecht erhöhte sich bei Patienten mit Infarkt-Anamnese der Anteil der Mutation auf 17% entgegen 14% ohne Infarkt in der Vorgeschichte ($\chi^2 = 1,6$; $p = 0,2$). Die Häufigkeit der heterozygoten Mutation in Abhängigkeit von der Zahl stenosierter Koronararterien zeigen Abb.23 und Tab.17.

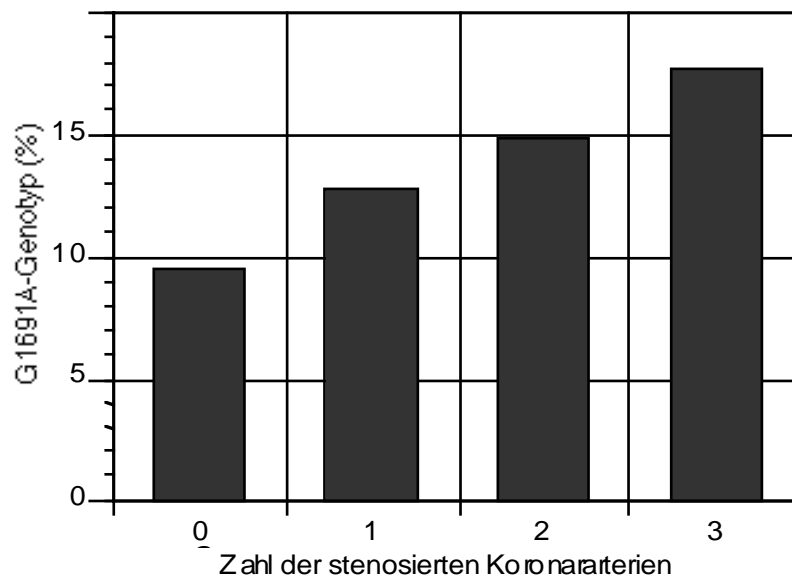


Abb. 23: Häufigkeit der FV-Mutation in Abhängigkeit von der Zahl der stenosierten Koronararterien.

Tab.17: Faktor-V-Mutation: Anteil des heterozygoten Genotypes in Abhängigkeit von der Zahl der stenosierten Koronararterien.

Zahl stenosierter Koronararterien	Faktor-V-Leiden (G1916A)			F-Wertp
	absolut	prozentual		
0	8 / 86	9,3		
1	16 / 127	12,6		
2	37 / 251	14,7		
3	68 / 387	17,6	4,6	0,03

Mit steigender Anzahl stenosierter Gefäße war eine Zunahme der Häufigkeit der Faktor V-Mutation zu erkennen. Patienten mit Stenose nur

eines Gefäßes wiesen mit 12,6% den heterozygoten Genotyp auf. Waren drei Gefäße stenosiert, so stieg der Anteil auf 17,6%.

3.3.4 Prothrombin G20210A Mutation

In dem Gesamtkollektiv von 851 Patienten beider Kliniken war die heterozygote Mutation des Prothrombin-Gens bei 9 Individuen (1,1%) nachzuweisen, die homozygote Form bei keinem. Die statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Prothrombin-Mutation und einem der erhobenen Parameter.

3.3.5 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

Die Untersuchung der Insertion/Deletion des ACE-Gens zeigte über das Gesamtkollektiv mit 24% und 23% eine annähernd gleiche Verteilung der homozygoten Deletion bzw. Insertion, die heterozygote Variante war mit

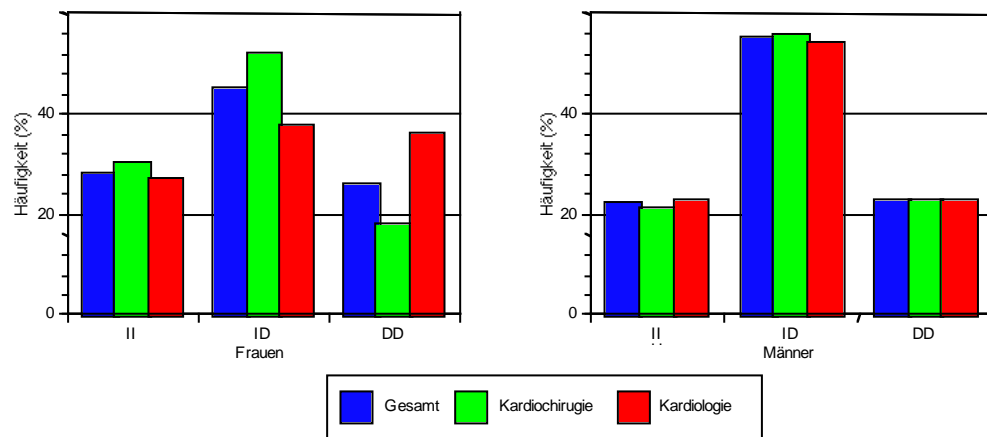


Abb. 24: Häufigkeit der Genotypen für das Gesamtkollektiv, die kardiochirurgischen und kardiologischen Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht.

53% vertreten. Sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern gab es keine signifikanten Abweichungen in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen im Vergleich zum Gesamtkollektiv. Bei den kardiochirurgischen Patientinnen trat die homozygote Deletion mit 18% weniger häufig auf als bei den kardiologischen Patientinnen mit 36%.

Unabhängig vom Geschlecht und der Klinik sollte untersucht werden, ob

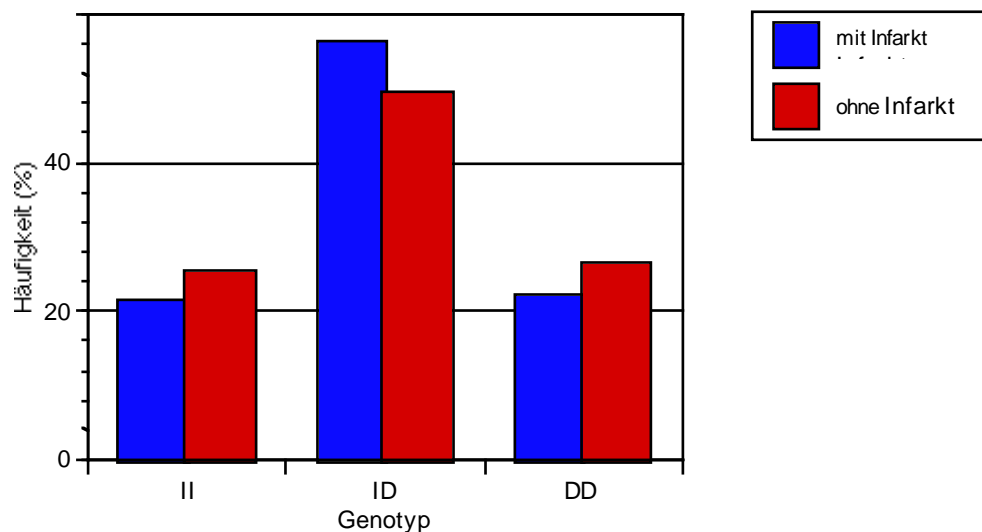


Abb. 25: Prozentuale Verteilung der ermittelten Genotypen bei Patienten mit und ohne Myokardinfarkt in der Anamnese.

ein Zusammenhang zwischen der Infarktanamnese und dem Genotyp festzustellen ist. Abb.25 zeigt die Häufigkeitsverteilung des Insertions-Deletions-Polymorphismus für die Patienten mit und ohne Infarkt in der Vorgeschichte. Wie für das Gesamtkollektiv beschrieben, entfallen auch hier 20-25% auf die homozygoten Genotypen, ein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Myokardinfarkt konnte nicht nachgewiesen werden. In Tab.18 ist abschließend das prozentuale Auftreten der Insertion bzw. Deletion in Abhängigkeit von der Anzahl der stenosierten Koronararterien zusammengestellt:

Tab.18: Häufigkeit des Insertions-/Deletions-Polymorphismus des ACE in Abhängigkeit von der Anzahl der betroffenen Gefäße

Zahl stenosierter Koronararterien	II	ID	DD
0	17%	50%	33%
1	28%	49%	24%
2	24%	57%	19%
3	23%	51%	25%

Ogleich die homozygote Deletion bei Patienten ohne stenosierte Koronargefäß mit einer Häufigkeit von 33% etwas über der des Gesamtkollektiv (24%) angesiedelt ist, konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Anzahl der betroffenen Gefäße festgestellt werden.

3.4 Anwendung der quantitativen Rhesus-D-PCR

3.4.1 *RHD* -Zygotie

Die Validierung des *RHD* -Nachweises mittels fluorogener Sonden umfaßte die Untersuchung von 100, serologisch als D-positiv vortypisierten Proben

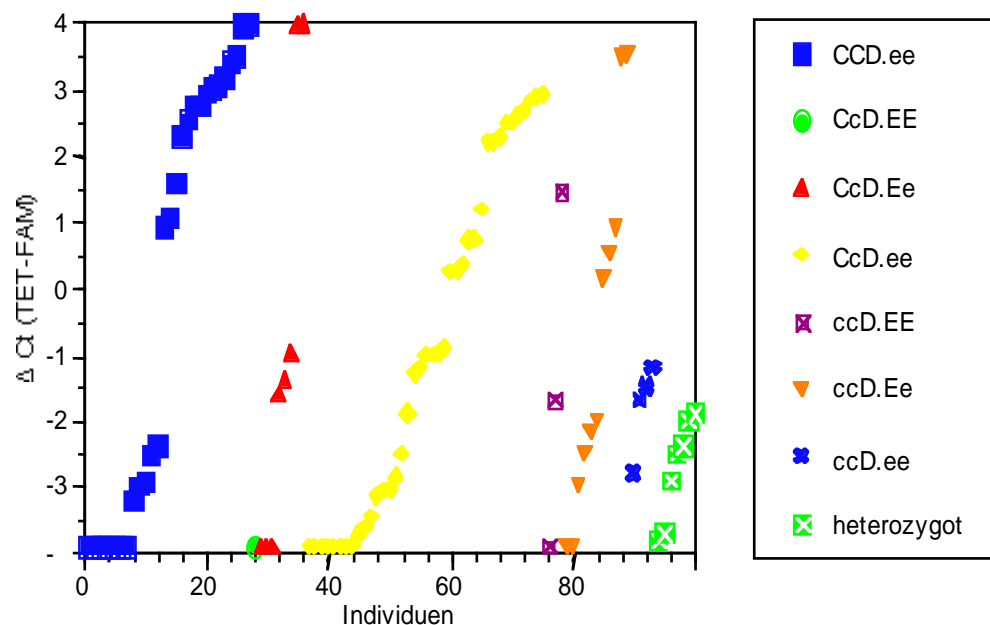


Abb. 26 : Bestimmung der *RHD*-Zygotie an 100 RhD-positiven Proben und Auftrennung der ermittelten Werte nach der Rhesus-Formel.

(vgl. 3.2.4). Für die Bestimmung der Zygotie dieser Proben wurde der Δ Ct-Wert (Ct-Wert der TET-Sonde minus Ct-Wert der FAM-Sonde) von acht Replikaten bestimmt. Als Vergleichsmaßstab dienten DNA-Proben D-positiver Kinder von D-negativen Müttern. Diese heterozygoten Standards zeigten Δ Ct-Werte von $\leq -1,5$ (Abb.26). Bei 61% der untersuchten Proben war der Δ Ct-Wert ≤ -1 , Werte ≥ 0 wurden 39% zugeordnet. Den Bereich zwischen 0 und -1 umfaßte keine der beiden Probengruppen.

Die Berechnung der ΔCt -Werte erfolgte bei der halbmaximalen Steigung der FAM- bzw. TET-Kurve (siehe 2.2.3). Den Einfluß des gesetzten Schwellenwertes (Threshold) für die Bestimmung des ΔCt -Wertes zeigt Abb. 27. Aus den Amplifikationsprotokollen dieses Experimentes ergab sich eine

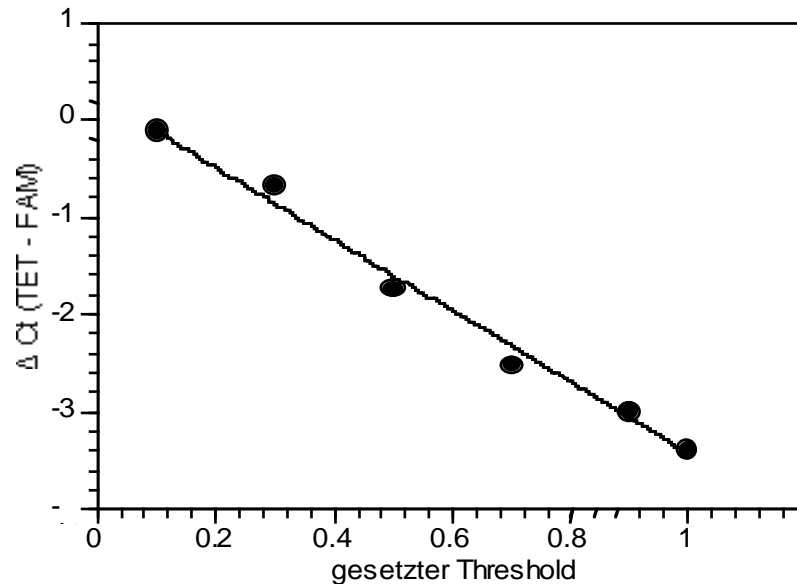


Abb. 27: Einflußnahme des gesetzten Schwellenwertes auf den ΔCt -Wert.

halbmaximale Steigung der Kurven bei einem gesetzten Threshold von 0,8; der untersuchten Probe ist somit ein ΔCt -Wert von -2,9 zuzuordnen und sie entspricht dem heterozygoten *RHD*. Eine Bestimmung des ΔCt -Wertes in der Anlaufphase der Reaktion, beispielsweise bei einem Threshold von 0,1 würde eine Differenz der Kurven von 0 ergeben und damit auf einen homozygoten *RHD*-Typ weisen. Im Bereich des exponentiellen Kurvenverlaufs, in diesem Beispiel zwischen einem gesetzten Threshold von 0,4 bis 1, errechnen sich ΔCt -Werte ≤ -2 , entsprechend dem heterozygoten *RHD*-Typ. Daraus resultierend wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit unterschiedlicher PCR-Läufe die halbmaximale Steigung der Kurve als Berechnungsgrundlage gewählt.

Trotz dieser Festlegung zeigten sich in den durchgeführten Experimenten wiederholt Proben, denen ΔCt -Werte von -5 bis maximal -23 zugeordnet werden mußten. In Abb. 28 ist zu erkennen, daß diese sehr niedrigen ΔCt -Werte mit einem späten Detektionszeitpunkt der *RHD*-spezifischen FAM-Sonde in Zusammenhang stehen. Aus dieser Erkenntnis wurde für die Bewertung der Zygotie ein Grenzwert für den Threshold Cycle - sowohl der

FAM- als auch der TET-markierten Sonde - von ≤ 40 festgelegt. Proben, die diesen Wert überschritten, wurden erneut untersucht.

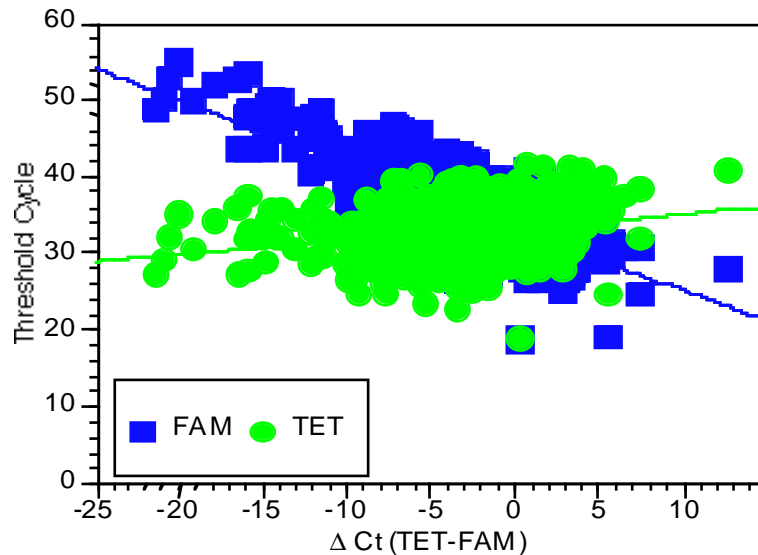


Abb. 28: Berechnete ΔCt -Werte der *RHD*-/*RHCE*- spezifischen Sonde in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des ersten detektierbaren Signals.

Für eine weitergehende Überprüfung der Methode wurden D- positive Kinder untersucht, deren Mütter nachweislich D-negativ waren. Die kindlichen Proben wurden aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen

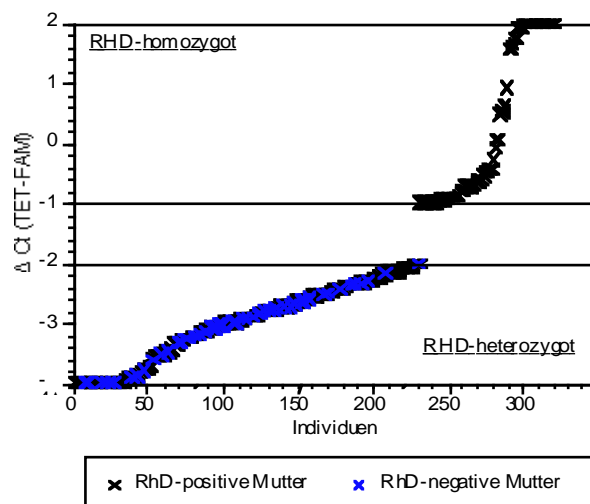


Abb. 29: Berechnete ΔCt -Werte von 337 auf die *RHD*-Zygotie untersuchten DNA-Proben aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen. Für einen besseren Vergleich der ermittelten Werte sind die heterozygoten Kinder RhD-negativer Mütter blau unterlegt.

gewonnen, das routinemäßig zu einem Antikörper-Suchtest eingesandt wurde. Der Rhesus-Status der Mutter wurde von dem betreuenden Gynäkologen bestätigt.

Insgesamt wurde von 337 Neugeborenen die DNA aus dem Nabelschnurblut isoliert und in die Methode für die Bestimmung der *RHD*-Zygotie eingesetzt. Als *RHD* -homozygot wurden 106, als heterozygot 231 der untersuchten Kinder eingestuft.

Abb.29 zeigt die berechneten Δ Ct-Werte (TET-FAM) für die *RHD* -homozygoten und -heterozygoten Proben. Bei einem ermitteltem Δ Ct-Wert < -2 wurde die entsprechende Probe dem heterozygoten Genotyp, bei einem Wert > -1 dem homozygoten Typ zugeordnet.

Von den 231 als *RHD* -heterozygot typisierten Kindern waren 74 Mütter D-negativ, 157 waren D-positiv. Alle D-positiven Kinder von D-negativen Müttern wurden als *RHD* -heterozygot bestimmt

Tab.19 zeigt die Verteilung der Zygotie in Abhängigkeit von der Rhesus-Formel:

Tab.19: Verteilung der homozygoten und heterozygoten *RHD* -Genotypen von 337 untersuchten Neugeborenen in Abhängigkeit von der Rhesus-Formel

Rhesus-Formel	<i>RHD</i> - homozygot	<i>RHD</i> - heterozygot
CCD.ee	51 (15,1%)	19 (5,6%)
CcD.Ee	29 (8,6%)	13 (3,9%)
ccD.Ee	5 (1,5%)	46 (13,6%)
ccD.EE	10 (3,0%)	6 (1,8%)
ccD.ee	0 (0%)	6 (1,8%)
CcD.ee	11 (3,3%)	141 (41,8%)

Am häufigsten (41,8%) war der heterozygote *RHD*-Typ bei Individuen mit der Rhesus-Formel CcD.ee vertreten, während der homozygote Typ am stärksten bei den Kindern mit der Rhesus-Formel CCD.ee auftrat. Ein homozygoter *RHD* mit der Formel ccD.ee konnte nicht nachgewiesen werden.

3.4.2 Pränatal-Diagnostik

Die Detektion fetaler DNA im maternalen Plasma stellt hohe Anforderungen sowohl an die Methode der DNA-Isolierung als auch an die Sensitivität des Nachweissystems.

Für die Erhöhung der DNA-Ausbeute bei der Isolierung wurde ein Carrier eingeführt. Die Auswahl wurde unter dem Gesichtspunkt getroffen, daß die Träger-DNA keine, dem humanen Rhesus-Gen homologen Sequenzen aufweisen sollte. Auf eine Reaktion mit den verwendeten Primern und Sonden wurden DNA-Proben verschiedener Spezies untersucht (Tab.20):

Tab.20: Untersuchung verschiedener Spezies auf ihre Eignung als Träger-DNA-Quelle für die Isolierung fetaler DNA aus maternalem Plasma.

Spezie	Ct (FAM)	Ct (TET)
Schwein	> 40	> 40
Rind	> 40	> 40
Meerschwein	> 40	> 40
Huhn	> 40	> 40
Pferd	25	37
Fisch	> 40	> 40

Mit Ausnahme der DNA aus Pferd erfüllten die untersuchten Proben die Anforderungen. Aufgrund kommerzieller Verfügbarkeit wurde die DNA aus Fisch als Carrier eingesetzt.

Zur weiteren Sensitivitätssteigerung der Gesamtmethode wurden die Reaktionsbedingungen der PCR optimiert. Das Ergebnis einer Reduzierung der Sondenkonzentration und einer Herabsetzung der Annealing-Temperatur um 5°C ist in Abb.30 dargestellt.

Sowohl die FAM- als auch die TET-markierte Sonde wurde in ihrer Konzentration von 200 nM auf 50 nM herabgesetzt und die Annealing-Temperatur von 70°C auf 65 °C gesenkt. Dadurch stieg die Nachweismöglichkeit von 1000 pg auf 10 pg DNA, ohne durch die

herabgesetzte Temperatur an ihrer Spezifität zu verlieren.

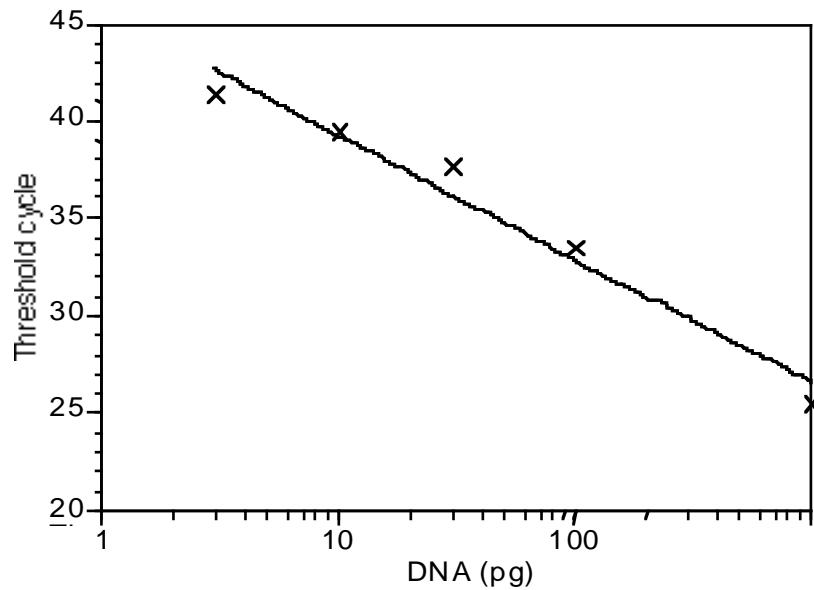


Abb. 30: Standardkurve einer *RHD*-positiven DNA für die Ermittlung der Sensitivität der quantitativen PCR. Die aufgetragenen Werte zeigen den Ct-Wert der *RHD*-spezifischen FAM-Sonde.

Eine Einflußnahme der eingesetzten Carrier-DNA auf die Sensitivität der Methode zeigen Abb.31 und 32. Zunächst wurde unabhängig von der

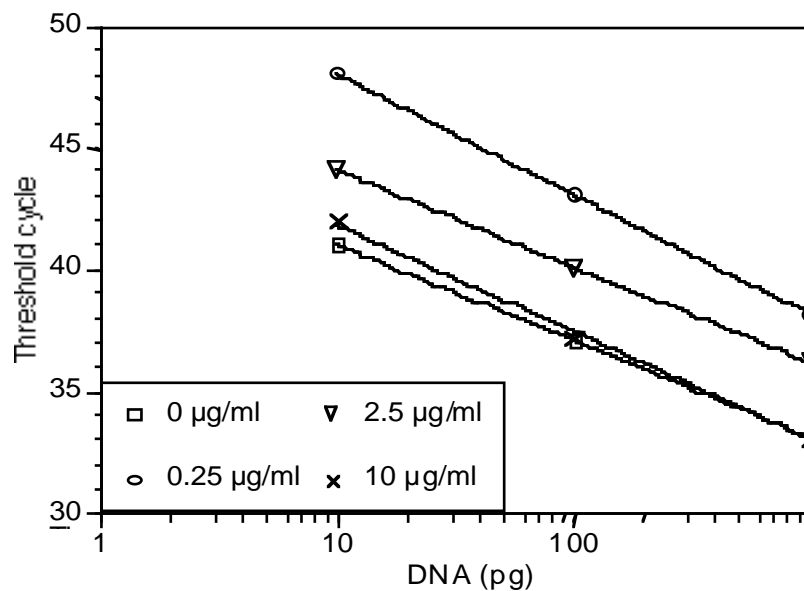


Abb. 31: Einfluß der Carrier-DNA auf die Sensitivität des *RHD*-Nachweises, dargestellt als Threshold-Cycle der *RHD*-spezifischen FAM-Sonde.

Nukleinsäure-Extraktion einem DNA-Standard verschiedene Konzentrationen Fisch-DNA zugegeben und anschließend eine Standardkurve erstellt. Um eine Sensitivität entsprechend dem DNA-Standard ohne Träger-DNA zu erzielen, ergab sich aus dem Experiment eine Konzentration von 10 µg/ml Fisch-DNA. Bei einer geringeren Konzentration des Trägermoleküls verschob sich der Ct-Wert der *RHD*-spezifischen FAM-Sonde von 41 (0 µg/ml) auf 44 (2,5 µg/ml) bzw. 48 (0,25 µg/ml) und zeigte damit eine verminderte Sensitivität an. Konzentrationen >10 µg/ml ergaben keine detektierbaren Signale der FAM- und TET-Sonde (Ergebnisse nicht dargestellt).

Für die Ermittlung der Sensitivität über die gesamte Prozedur erfolgte eine parallele DNA-Extraktion mit und ohne Zugabe des Trägermoleküls (Abb. 32). In dem Bereich von 100 -1000 pg eingesetzter DNA ergab sich ein paralleler Kurvenverlauf der beiden Ansätze, wobei die Probe ohne Carrier-

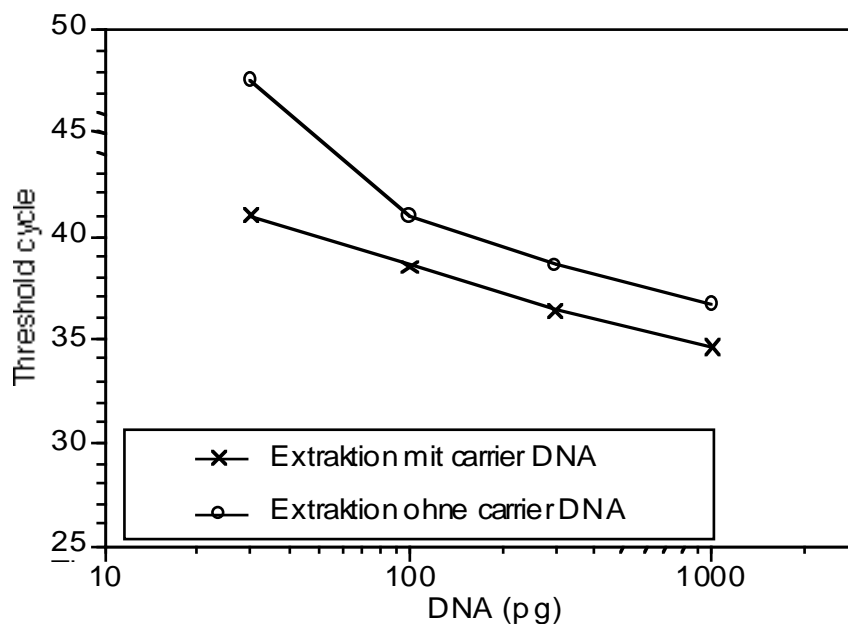


Abb. 32: Standardkurve einer *RHD*-positiven DNA, die einer RhD-negativen Plasmprobe zugegeben wurde und anschließend mit und ohne Carrier-DNA in die Extraktion eingesetzt wurde.

DNA über die Extraktion 2 Zyklen später detektierbar war als die Probe mit Träger-DNA. Unterhalb von 100 pg DNA zeigte die mit einem Carrier isolierte DNA-Probe weiterhin einen linearen Kurvenverlauf, während der Threshold Cycle der Probe ohne Trägermolekül während der Extraktion steil ansteigt.

Ein abschließender Vergleich der Sensitivität mit und ohne Nukleinsäure-Extraktion ist in Abb. 33 dargestellt. Bei einem Ct-Wert von 40 sind bei einer DNA-Verdünnungsreihe ohne Einbeziehung der Isolierung noch 10 pg DNA detektierbar, während sich dieser Wert über die gesamte Prozedur auf 30 pg reduziert.

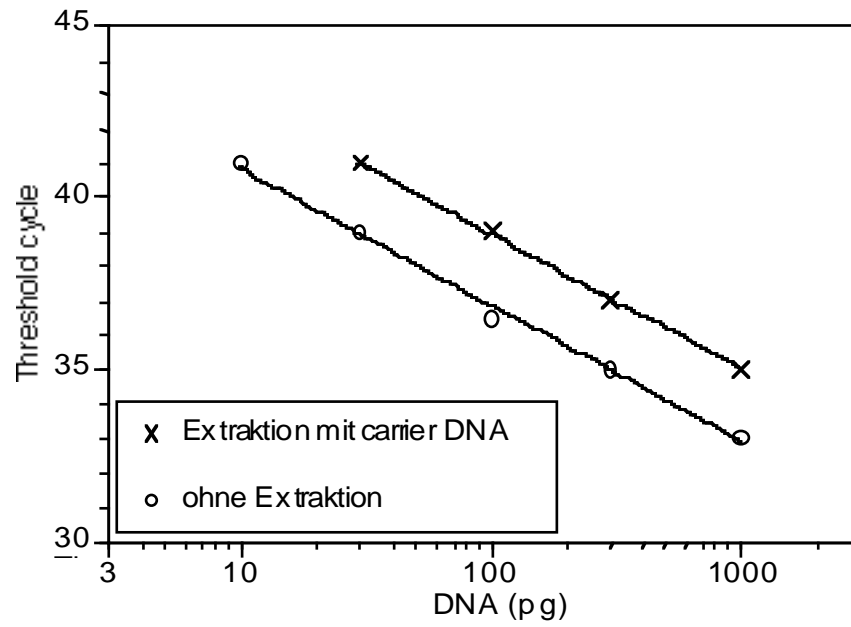


Abb. 33: Sensitivität des *RHD*-Nachweises im Plasma: Vergleich der Standardkurve ohne Einbeziehung der Extraktion und mit Berücksichtigung der Isolierungsprozedur.

Ihm Rahmen einer Zusammenarbeit mit den Frauenkliniken der Universität Münster und der Stadt Oldenburg wurde bei Frauen, die sich einer Amnioskentese zwecks fetaler *RHD* -Bestimmung unterzogen, zusätzlich eine Blutprobe entnommen. Dadurch war ein Vergleich des aus dem mütterlichen Plasma ermittelten *RHD* -Status des Kindes mit einer etablierten Methode (Gassner et al. 1997) möglich.

Tab.21: Vergleich der fetalen *RHD* -Bestimmung im maternalen Plasma (Sequenz Detektion System 7700) mit der fetalen *RHD* -Typisierung im Fruchtwasserpunktat (Gene Analyser 310).

Anzahl der Proben	Sequenz Detektion System 7700	Gene Analyser 310
50	RHD positiv	RHD positiv
16	RHD negativ	RHD negativ
10	RHD positiv	RHD negativ
7	RHD positiv	kein Ergebnis
6	RHD negativ	kein Ergebnis
4	kein Ergebnis	RHD positiv
1	kein Ergebnis	RHD negativ

In einem Zeitraum von einem Jahr wurden 94 Blutproben auf den fetalen *RHD*-Typ untersucht (Tab.21). Bei 50 Proben konnte das Kind sowohl bei Probennahme aus dem maternalen Plasma als auch aus dem Fruchtwasser als *RHD* -positiv typisiert werden, 16 zeigten den *RHD* - negativen Genotyp. Bei 10 Proben ergab der Nachweis aus dem mütterlichen Blut ein falsch positives Ergebnis, ein falsch negatives Resultat wurde nicht beobachtet. In 5 Fällen war die Isolierung der fetalen DNA aus dem maternalen Plasma nicht erfolgreich. 13 Proben lieferten mit dem Sequenz Detektion System ein Ergebnis, ein Vergleich mit der zweiten Methode war jedoch nicht möglich, da keine ausreichende Menge an kindlicher DNA aus dem Fruchtwasserpunktat isoliert werden konnte.

4. Diskussion

4.1 PCR-ELISA-Methode

Um den Stellenwert genetischer Komponenten bei komplexen Erkrankungen wie dem Herzinfarkt herauszuarbeiten, müssen große Patientenkollektive untersucht werden. Bislang basieren Nachweismethoden für Genpolymorphismen überwiegend auf der Kombination von PCR mit Detektion der Reaktionsprodukte per Gelelektrophorese (Fujiwara et al. 1995; Klüter et al. 1996; Skogen et al. 1994; Cavanagh et al. 1997; Meyer et al. 1999). Bei der Untersuchung hunderter oder gar tausender Patientenproben auf verschiedene Polymorphismen wird der Nachweis der Amplikons zum limitierenden Schritt. Deshalb war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, eine neuartige Strategie für den möglichst einfachen Nachweis der PCR-Produkte zu entwickeln und zu validieren.

Die Strategie ist in Abb. 7 auf Seite 27 dargestellt. Da die Allel-spezifischen Primer unterschiedlich markiert sind, sollte es gelingen, mittels Multiplex-PCR in Gegenwart der beiden Allel-spezifischen und eines gemeinsamen Primers markierte PCR-Produkte zu generieren und dann per ELISA zu erfassen.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen die besondere Leistungsfähigkeit dieser neuen Methode. Untersuchungen zur Sensitivität der PCR-ELISA-Methode haben gezeigt, daß Amplifikate über einen Bereich von 3-100 ng Gesamt-DNA pro Ansatz zuverlässig nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb.12, Seite 32). Ein praktisch bedeutsamer Vorteil dieses weiten Arbeitsbereichs der neuen Methode liegt darin, daß der DNA-Gehalt der Proben bei Routineextraktion der DNA nicht für jede einzelne Blutprobe bestimmt werden muß. Mit der großen Sensitivität des Nachweissystems eröffnen sich Möglichkeiten, sogar solche Proben zu untersuchen, die aufgrund ihres geringen DNA-Gehaltes bei der Detektion des PCR-Produktes in einem Agarose-Gel keine Ergebnisse liefern. Damit wird die PCR-ELISA-Methode auch zu einem neuen attraktiven Werkzeug in der Pränataldiagnostik, bei der oft nur sehr geringe DNA-Mengen für die Untersuchungen isoliert werden können.

Die positive Eigenschaft der großen Sensitivität birgt allerdings die Gefahr in sich, daß auch unspezifische PCR-Produkte nachgewiesen werden können. Um dies zu verhindern, muß die PCR unter stringenten Bedingungen durchgeführt werden, so daß bei einem Nachweis im Agarose-Gel keine Nebenbanden erkennbar sind, die zu falschen Signalen im ELISA-Detektionssystem führen. Es zeigte sich aber, daß die Beurteilung des Agarose-Gels aufgrund der geringeren Sensitivität nicht immer einen Ausschluß unspezifischer Reaktionen im ELISA-Test bedeutet. Sicherheit bietet hier das Erstellen von Verdünnungskurven, in denen die Reaktionsprodukte auch in sehr geringen Mengen eingesetzt werden. Gelingt auch unter Einsatz geringster Amplikonmengen noch eine sichere Diskriminierung der Allele, ist die Spezifität der ELISA-Teste belegt. Neben der Festlegung des Meßbereiches, in denen die Amplikonskonzentrationsabhängig nachgewiesen werden, kann in dieser Phase die Antikörperkonzentration so optimiert werden, daß keine unspezifischen Signale im ELISA stören..

Die bei jedem Experiment mitgeführten Standardproben zeigen die sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Der Einsatz sowohl von nichtamplifizierten DNA-Standardproben als auch von Amplifikaten als Kontrollen, gewährleistet eine Überprüfung der gesamten PCR-ELISA-Methode. Zu schwache Meßsignale der DNA-Standards bei guten Resultaten der Amplifikat-Kontrollen weisen auf eine Störung in der PCR hin, während unzureichende Meßergebnisse der Amplifikat-Standards einen Fehler im ELISA-Nachweissystem signalisieren. Durch dieses Konzept der getrennten Kontrollen wird die Fehlersuche deutlich vereinfacht

Ein weiterer Vorteil dieser neuen Methode ist die Halbierung der Anzahl der für eine Genotypisierung notwendigen PCR-Ansätze und die einfache Automatisierbarkeit der ELISA-Teste. Darüberhinaus zeigen die Resultate, daß dies Prinzip für verschiedenartige PCR-Nachweise unter anderem auch von Deletions- oder Insertionspolymorphismen geeignet ist.

Allerdings mußten in dem Beispiel des „Angiotensin-converting Enzyme“ die PCR-Bedingungen so gestaltet werden, daß eine Amplifikation des größeren Produktes unterbunden wird, da es ansonsten zu einer falsch heterozygoten Genotypisierung gekommen wäre (vgl. Abb.34). Bei einem getrennten PCR-

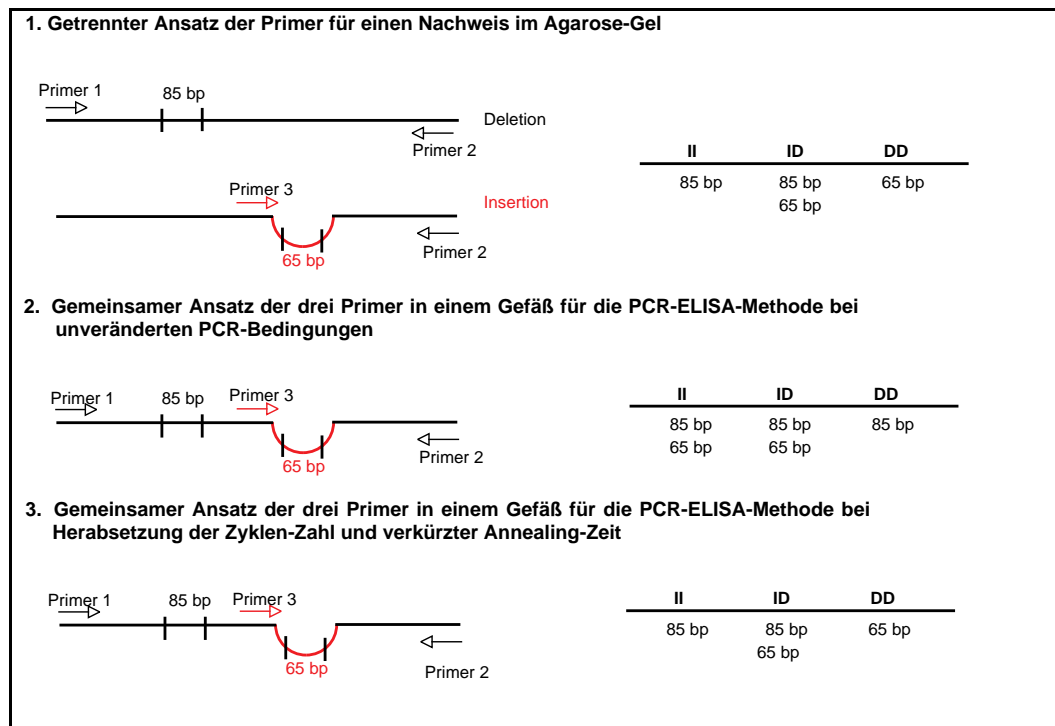


Abb.34: Schematische Darstellung der Schwierigkeiten bei der Anpassung der PCR-ELISA-Methode an den Insertions- / Deletions-Polymorphismus des Angiotensin-converting Enzyms. Primer 1: spezifisch für die Deletion; Primer 2= spezifisch für die Insertion; Primer 3= antisense Primer

Ansatz für die Insertion bzw. Deletion ist eine eindeutige Typisierung der Proben möglich. Aufgrund der Position des antisense-Primers tritt bei der Kombination aller drei Primer in einem gemeinsamen Ansatz die Situation auf, daß sowohl das insertions- als auch das deletions-spezifische Produkt gebildet werden.

Reduziert man die Anzahl der PCR-Zyklen und die Annealing-Zeit, so entsteht nur das kleinere Produkt. Unter diesen Bedingungen war die PCR-ELISA-Methode für den Nachweis des Insertions-/Deletions-Polymorphismus des ACE anwendbar.

4.2 Genetische Risikofaktoren bei Koronarpatienten für einen Herzinfarkt und das Ausmaß der Koronarveränderungen

Der Mechanismus der Blutstillung ist ein fein abgestimmter Prozeß. Ist dieser Ablauf gestört, so kommt es entweder zu einer verstärkten Blutungsneigung oder zur Ausbildung von Thrombosen.

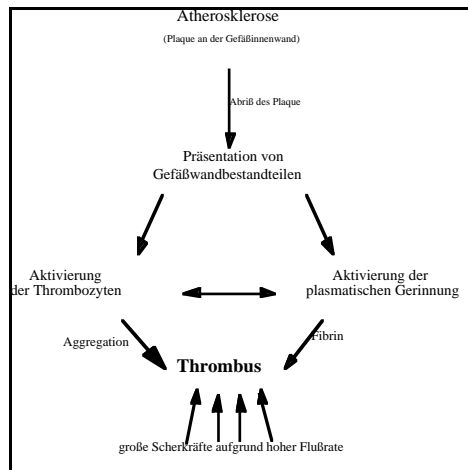


Abb.35: Entwicklung eines arteriellen Gefäßverschlusses (schematisch).

Abb. 35 und 36 zeigen die wichtigsten Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Thrombosen. Die arterielle Thrombose beruht auf einer Verletzung der Gefäßinnenwand, die zu einer Anlagerung von Thrombozyten führt. Der Prozeß der Thrombozytenadhäsion verläuft überaus effektiv, so daß kaum

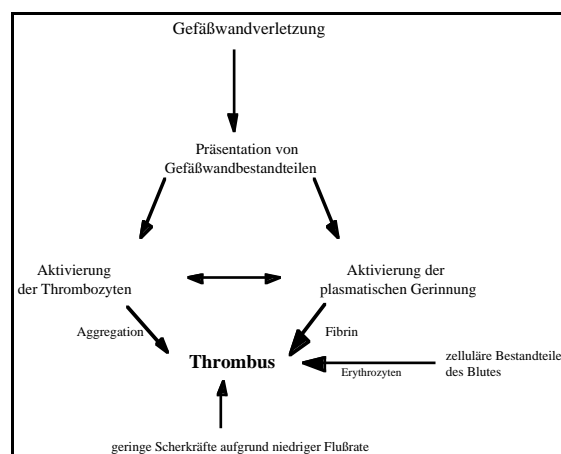


Abb.36: Entwicklung einer venösen Thrombose (schematisch)

andere Blutzellen in dem wachsenden Thrombus enthalten sind. Der sehr hohe Anteil an Blutplättchen verleiht einem arteriellen Verschuß ein helles Aussehen und daher wird auch von einem „weißen“ Thrombus gesprochen. Demgegenüber sind in den venösen Thromben auch Erythrozyten vertreten, so daß von einem roten Thrombus gesprochen wird. Blutplättchen sind im Vergleich zum arteriellen Thrombus nicht so stark vertreten (Alevriadou et al. 1994).

Bei diesem komplexen Zusammenspiel von Blut, Blutströmung und Gefäßwand ist zu erwarten, daß neben erworbenen Faktoren auch genetische Komponenten beteiligt sind. Da diese genetischen Faktoren von Umwelteinflüssen unabhängig sind und sich über den gesamten Untersuchungs- bzw. Lebenszeitraum nicht ändern, bietet die molekulargenetische Diagnostik einen attraktiven Ansatz zur Abschätzung von Krankheitsrisiken. Bei Patienten mit venösen Thrombosen und Embolien bei hereditärer Thrombophilie ist der Einfluß genetischer Faktoren gesichert, für arterielle Thrombosen fehlen bislang konsistente Ergebnisse.

Daher stieß die von Weiss et al. 1996 im New England Journal of Medicine veröffentlichte Studie über den HPA-1-Polymorphismus des Thrombozytenglykoproteins IIIa als Risikofaktor für Koronarthrombosen auf großes Interesse.

4.2.1 Thrombozytenglykoprotein IIIa (HPA-1)

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Untersuchung der 851 kardiochirurgischen und kardiologischen Patienten ergab keinen Zusammenhang zwischen dem HPA-1b-Status und dem Infarktisiko bei koronarer Herzerkrankung (28% bei Patienten ohne Myokardinfarkt; 35% bei einem Infarkt in der Anamnese). Zu dem gleichen Ergebnis kommt die Arbeitsgruppe von Ridker et al. (1997), die eine HPA-1-Genotypisierung an Personen mit Myokardinfarkt (n=374) und Schlaganfall (n=209) durchführten. HPA-1b wurde bei dieser Studie mit 26,4 % in der Kontrollgruppe (n=704), und in einer ähnlichen Verteilung bei Patienten mit Myokardinfarkt (25,2%) und Schlaganfall (25,3%) nachgewiesen. Auch die Untersuchung von Marian et al. (1996) konnte keinen signifikanten

Zusammenhang zwischen dem HPA-1b-Status und dem Infarkt-Risiko zeigen.

Eine mögliche Ursache für die diskrepanten Ergebnisse im Vergleich zu der Weiss-Studie mag in der geringen Fallzahl liegen. Daneben sind auch Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, Hypertonie oder die Cholesterinkonzentration von Bedeutung. So zeigt eine Untersuchung von Carter et al. (1997), daß unter Einbeziehung erworbener Risikofaktoren das HPA-1b-Allel zu 50% bei jungen Männern (<47 Jahre) mit Myokardinfarkt oder fortgeschrittener Stenose - im Vergleich zu 27% in der Kontrollgruppe - auftritt. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung an den 851 norddeutschen Patienten mit koronarer Herzkrankheit bestätigen, daß die Kombination Diabetes und HPA-1b mit einem signifikant erhöhten Risiko für Herzinfarkte einher geht.

4.2.2 Mutationen des Gerinnungsfaktors V und Prothrombins

Die Bedeutung der Gerinnungsfaktor V-Mutation bei venösen Thrombosen und erblich bedingter Thrombophilie ist bereits seit längerem bekannt. Konsistente Ergebnisse im Zusammenhang mit arteriellen Thrombosen - insbesondere dem Myokardinfarkt - sind bislang nicht vorhanden.

Für die Entwicklung koronarer Gefäßerkrankungen wird vermutet, daß Thrombin eine Schlüsselrolle spielt. Eine überschießende Bildung von Thrombin wird normalerweise über den Rückkopplungsmechanismus des aktivierten Protein C verhindert. Das von Thrombomodulin gebundenem Thrombin aktivierte Protein C spaltet gemeinsam mit Protein S die aktivierten Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa und drosselt somit die Thrombinbildung. Da die G1691A Mutation von Faktor V diesen Feedback-Mechanismus beeinträchtigt, wird vermehrt Thrombin gebildet.

In Übereinstimmung mit der Untersuchung von Ridker et al. (1995) und Inbal et al. (1999) war ein signifikanter Zusammenhang zwischen der G1691A-Mutation von Faktor V und dem Auftreten eines Myokardinfarktes in dieser Studie nicht nachweisbar (14% ohne MI versus 17% mit Infarkt). Es konnte aber gezeigt werden, daß es eine Korrelation zwischen der Anzahl stenosierter Gefäße und der Häufigkeit der Faktor V-Mutation gibt. War kein koronares

Gefäß zu über 50% durch eine angiographisch nachweisbare Stenose verengt, so lag die Frequenz der heterozygoten Mutation bei 9% und stieg auf 17,6% bei drei stenosierten Gefäßen an.

Sieht man in dem Myokardinfarkt den Schlußpunkt einer koronaren Gefäßstenose, dann überrascht dieses Ergebnis auf den ersten Blick. Allerdings bestätigen Beobachtungen an Patienten mit koronarer Herzkrankheit immer wieder, daß nicht selten Gefäßabschnitte von einem Verschluß betroffen sind, die in der Koronarangiographie kurz zuvor unauffällig waren.

Eine Untersuchung an 2210 Männern konnte keinen Zusammenhang zwischen der Schwere der Gefäßerkrankung und der Faktor V-Mutation nachweisen (Gardemann et al. 1998). In einer Studie mit jungen Frauen (18-44 Jahre) war die Kombination aus erworbenen (Rauchen) und genetischen (Faktor V-Mutation) Risikofaktoren jedoch mit einem erhöhten Infarktrisiko verknüpft (Rosendaal et al. 1997).

Das prozentuale Auftreten der Prothrombin G20210A-Mutation von 1.1% der untersuchten Proben ließ auf keinen signifikanten Zusammenhang des Polymorphismus mit einer koronaren Herzerkrankung schließen. Rosendaal et al.(1997) zeigten an einer Subpopulation von jungen Frauen mit Myokardinfarkt, daß die Mutation isoliert betrachtet keinen Risikofaktor dargestellt, sehr wohl aber in Kombination mit anderen Faktoren.

Tabelle 22 stellt eine Zusammenfassung der bislang durchgeführten Studien

Tab.22: Zusammenstellung von Literaturdaten über die Häufigkeit der Prothrombin G20210A-Mutation bei Patienten mit einem Myokardinfarkt. (verändert nach Franco et al. 1999). * Frauen; ** Männer

Ort	Patienten	Kontrollen	OR	Referenz
USA*	4/79 (5,1%)	6/381 (1,6%)	3,3	Rosendaal et al.1997
Niederlande**	10/560 (1,9%)	8/646 (1,2%)	1,5	Doggen et al.1998
Brasilien	7/220 (3,2%)	2/295 (0,7%)	4,8	Arruda et al. 1998
Israel**	6/83 (7%)	6/166 (3,9%)	2,1	Inbal et al. 1997
Niederlande	7/173 (4,1%)	4/400 (1%)	4,2	Franco et al. 1999

dar. Das Problem aller Untersuchungen des Prothrombin-Polymorphismus ist die geringe Frequenz der Mutation. In Anbetracht einer Häufigkeit von nur ca. 1% müssen sehr große Patientenkollektive untersucht werden, um zuverlässige Ergebnisse zu erarbeiten. Die in Tabelle 22 aufgelisteten Häufigkeiten der Mutation für die Patientenkollektive variieren zwischen 7 % bei 83 untersuchten Personen und 1,9% bei einer vergleichbaren Gruppe mit 560 Personen. Allerdings fällt auf, daß auch das Kontrollkollektiv der erstgenannten Untersuchung mit 3,9% deutlich über der Frequenz anderer Untersuchungen liegt.

Darüberhinaus berichteten Rosendaal et al. (1998) über eine geographische Verteilung der Prothrombin G20210A-Mutation. Die Häufigkeit der Mutation fällt von 3,9% in Südeuropa auf 1,7% in Nordeuropa ab.

4.2.3 Angiotensin-Converting Enzyme

Im Unterschied zu den Untersuchungen von Evans et al. (1994) wurde eine Korrelation des ACE-Polymorphismus mit einem Herzinfarkt in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen. Einschränkend muß allerdings angemerkt werden, daß in der Evans-Studie ausschließlich Proben von tödlich verlaufenden Myokardinfarkten retrospektiv untersucht wurden und sich die Patientenkollektive dadurch sehr unterscheiden.

Eine erhöhte Frequenz des D-Allels bei Personen aus Familien mit einer erhöhten Rate an plötzlichem Herztod konnte eine Untersuchung von Marian et al. (1993) zeigen. Interessanterweise stieg die relative Gefahr des plötzlichen Herztodes in der Kombination der ACE-Deletionsvariante mit einer β -MHC-Mutation (β -myosin-heavy-chain mutation).

Für zukünftige Untersuchungen eines Zusammenhanges zwischen koronaren Herzerkrankungen und dem ACE-Polymorphismus ist die Einbeziehung anderer Risikofaktoren - sowohl genetischer als auch erworbener - sicherlich von großem Nutzen.

Waren viele Arbeitsgruppen bisher auf der Suche nach einem Zusammenhang dieser Polymorphismen mit arteriellen Thrombosen wie dem Myokardinfarkt, so wird jetzt verstärkt die Korrelation des HPA-1-Status und der ACE-Insertion/Deletion mit venösen Thrombosen analysiert (Poort et al. 1996; Alhenc-Gelas et al. 1999; Lindmarker et al. 1999).

4.2.4 Zusammenfassung

Strukturelle Veränderungen von Proteinen können deren Funktion erheblich beeinflussen wie das Beispiel der Faktor V Mutation verdeutlicht. Polymorphismen von Gerinnungsfaktoren, Rezeptoren für Moleküle aus der plasmatischen Gerinnung und einem zentralen Enzym der Blutdruckregulierung gelten als Kandidaten für Risikofaktoren koronarer Herzerkrankungen.

Wird die Funktion der Proteine verändert, kann die Regulation der Hämostase gestört werden und aufgrund einer überschießenden Reaktion ein Thrombus entstehen. Verschließt der Thrombus ein Herzkranzgefäß, dann manifestiert sich diese Thrombose klinisch als Herzinfarkt.

Die mit dieser Arbeit vorgelegte Untersuchung von kardiologischen und kardiochirurgischen Patienten konnte keinen Zusammenhang zwischen einem der Faktoren und dem Auftreten eines Myokardinfarktes nachweisen. Allerdings zeigte sich, daß die Kombination von Diabetes und dem HPA-1b ein erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt darstellt.

Langfristig sollten neue Einblicke in Struktur-Funktionsbeziehungen aus der molekularbiologischen Grundlagenforschung und effiziente Methoden zur molekulargenetischen Diagnostik an großen Patienten- und Kontrollgruppen wesentlich dazubetragen, daß anhand einer zuverlässigeren Einschätzung des individuellen Erkrankungsrisikos und des zu erwartenden Nutzens neuer aufwendiger Therapieansätze die bestmögliche Behandlung für den einzelnen Patienten gefunden werden kann.

4.3 *RHD* -Zygotie

Bei einer möglichen feto-maternalen Rhesus-Inkompatibilität ist die Rhesus-Bestimmung des Fötus von entscheidender Bedeutung. Für die Abschätzung des Risikos einer Unverträglichkeit dient die Bestimmung der *RHD*-Zygotie. Ist der Kindsvater einer D-negativen Schwangeren *RHD*-heterozygot, so besteht eine 50%ige Chance, daß der Fötus *RHD*-negativ ist und somit keine Komplikationen zu erwarten sind. Andererseits kann im homozygoten Fall sicher davon ausgegangen werden, daß das ungeborene Kind *RHD*-positiv ist.

4.3.1 Methode

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Strategie für den Nachweis der *RHD*-Zygotie beruht auf einer quantitativen Bestimmung des *RHD*- und *RHCE*-Gens. Eine für jede Probe erstellte *RHD*- und *RHCE*-Verdünnungskurve erlaubte eine Berechnung des relativen Abstandes der beiden Kurven. Bei identischer Amplifikationseffizienz in der PCR und gleicher Empfindlichkeit der fluorimetrischen Sondendetektion für den *RHCE*- und den *RHD*-Nachweis, sollten für *RHD*-Homozygote die Verdünnungskurven für die *RHCE*- und *RHD*-Sonden übereinstimmen. Praktisch ergaben sich aber unter den beschriebenen Bedingungen für die heterozygoten Proben Werte (Signal für *RHCE* minus Signal für *RHD*) <-2 und für die homozygoten Proben eine Differenz von >-1 .

Der Nachweis der *RHD*-Zygotie beruht auf einer Multiplex-PCR mit optimalen Amplifikationsbedingungen für die Gesamtreaktion. Die Amplifikationseffizienz der Einzelreaktionen kann aber durch die spezifischen Primer und fluorogenen Sonden unterschiedlich sein. Auch die Markierung der Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt mit unterschiedlicher Effizienz. So zeigt die Erfahrung, daß Sonden mit einer FAM-Markierung bessere Ergebnisse liefern als ein mit TET oder JOE gekoppeltes Oligonukleotid.

Bei gleichzeitigem Einsatz der *RHD*- und der *RHCE*-spezifischen Sonde in einem Reaktionsgefäß kann der Nachweis des *RHCE*-Gens als Bezugsgröße herangezogen werden. Bei einem getrennten Ansatz müßte eine zusätzliche interne Kontrolle eingeführt werden, um unterschiedliche Bedingungen in der PCR (z.B. durch Inhibitoren) über einen Korrekturfaktor berücksichtigen zu können.

Wie in den Ergebnissen beschrieben, gibt es einige seltene Proben, die eine sehr große Differenz der beiden Kurven aufzeigen. Bei diesen Proben weist das erste detektierbare Signal der *RHD*-spezifischen Sonde einen Ct-Wert > 40 auf (vgl. Abb. 28; Seite 51). Wären Inhibitoren die Ursache, so müßte auch die Amplifikation des *RHCE*-Gens gehemmt sein. Da dies nicht der Fall ist, wird eine selektive Störung der *RHD*-PCR vermutet, die jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden kann.

Für die Entwicklung eines Nachweissystems stand keine Referenzmethode zur Verfügung. Um auf definierte Proben zurückgreifen zu können, diente die DNA D-positiver Kinder von D-negativen Müttern als heterozygoter Standard.

Die Richtigkeit der Ergebnisse von Analysen der *RHD*-Zygotiebestimmung kindlicher Proben D-positiver Mütter können in langwierigen Familienuntersuchungen bestätigt werden. Da keine Familien mit bekannten D-Typen zur Verfügung standen, sollen die erarbeiteten Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen werden (Tab. 23).

Tab.23: Ermittelte *RHD* -Zygotie im Vergleich mit den publizierten Daten von Boormann et al. (1977)

Rhesus-Formel (Phänotyp)	eigene Daten (%)	Boormann et al.1977 (%)
a) <u>homozygot</u>		
CCD.ee	15,1%	17,7 %
CcD.Ee	8,6 %	11,9 %
ccD.Ee	1,5 %	0,7 %
ccD.EE	3,0 %	2,0 %
ccD.ee	0 %	0,07 %
CcD.ee	3,3 %	2,2 %
b) <u>heterozygot</u>		
CCD.ee	5,6 %	0,8 %
CcD.Ee	3,9 %	1,5 %
ccD.Ee	13,6 %	11,0 %
ccD.EE	1,8 %	0,3 %
ccD.ee	1,8 %	2,0 %
CcD.ee	41,8 %	32,7 %

Die als *RHD*-homozygot eingestuften Proben entsprechen in ihrer Verteilung den Daten von Boormann et al. (1977). Eine Ausnahme bildet der Phänotyp ccD.Ee, dessen Anteil laut Literaturangaben ungefähr 0,7% ist, während in den eigenen Untersuchungen der Anteil doppelt so hoch war. Ob hierbei ein methodischer Fehler vorliegt oder die Abweichung auf die geringe Probenzahl ($n=5$) bzw. andere Ursachen zurückzuführen ist, kann nur durch die Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben geklärt werden.

Bei den *RHD*-heterozygoten Proben zeigt sich bei den Genotypen mit geringen Frequenzen (CcD.Ee und ccD.EE) ein ähnliches Bild. Auch hier müssen für eine Einschätzung der Richtigkeit eine größere Anzahl von Proben untersucht werden.

Für einen Vergleich der eigenen Daten mit den Literaturangaben muß auch das unterschiedliche methodische Vorgehen bei der Ermittlung der Häufigkeiten in Betracht gezogen werden.

Da bislang keine Methode zu einem direkten Nachweis der *RHD*-Zygotie verfügbar war, beruhen die publizierten Daten auf phänotypischen Beobachtungen von Familien und einer daraus resultierenden Kalkulation der Genotypen, während die eigenen Daten zur Häufigkeitsverteilung auf der Grundlage einer molekulargenetischen Untersuchung erhoben wurden.

Für die Zuverlässigkeit der Methode spricht die Richtigkeit der als *RHD*-heterozygot bestimmten 74 Kinder, deren Mütter D-negativ sind.

4.4 Nachweis fetaler DNA im maternalen Plasma

Die von Lo et al. (1998) publizierte Arbeit über das Vorhandensein fetaler DNA im maternalen Plasma bietet - alternativ zu der bisherigen Vorgehensweise der Fruchtwasserpunktion - einen attraktiven Ausgangspunkt für nicht-invasive Strategien des pränatalen *RHD*-Nachweises.

4.4.1 Isolierung fetaler DNA

Da nur sehr geringe Mengen fetaler DNA im mütterlichen Plasma vorhanden sind, sollte die Isolierung der Nukleinsäure so effizient wie möglich sein. Die in der Publikation von Lo et al. nicht näher beschriebene DNA-Isolierung basierte auf einem Probevolumen von 800 μ l. In den eigenen Versuchserien lieferte dies Vorgehen keine konsistenten Ergebnisse. Um die

Wahrscheinlichkeit zu vergrößern, in der zu untersuchenden Probe eine ausreichenden Menge an fetaler DNA zu finden, wurde der für die Isolierung eingesetzten Probe (1 ml) Fremd-DNA als Träger zugesetzt. Der Einsatz der Carrier-DNA vergrößerte die Ausbeute an fetaler DNA um das Dreifache.

Da die Carrier-DNA den PCR-Nachweis der Ziel-DNA beeinträchtigen kann, mußte die optimale Konzentration der Träger-DNA ausgetestet werden. Die Experimente zeigten, daß eine zu geringe Konzentration des Carriers zu einer verminderten Sensitivität führt, und eine zu hohe Konzentration keine Amplifikation der Ziel-DNA mehr zuläßt.

Eigene Untersuchungen bestätigen, daß sogar bei einem 80- fachen Überschuß an *RHD*-negativer DNA der Nachweis einer *RHD*-positiven DNA noch zuverlässig möglich ist.

Neben dem zur DNA-Isolierung eingesetzten Probenvolumen und der Konzentration der Carrier-DNA ist die Qualität der extrahierten DNA von Bedeutung. Um potentielle Hemmstoffe - insbesondere Ethanolreste aus der Isolierungsprozedur - zu entfernen, wurde die DNA-Lösung im Vakuum unter Zentrifugation eingeeengt. Durch die Resuspendierung der getrockneten DNA in einem geringeren Volumen wurde die DNA zusätzlich angereichert.

Die Ergebnisse, die mit diesen methodischen Verbesserungen erreicht werden konnten, werden im folgenden Absatz diskutiert.

4.4.2 Fetale *RHD*-Typisierung

Von den 94 untersuchten Proben konnten 76 sowohl mit der etablierten Standardmethode der DNA-Typisierung aus Zellen im Fruchtwasser und der neuen quantitativen PCR-Methode aus einer Blutprobe der Mutter beurteilt werden. Von diesen Proben lieferten 66 (87%) übereinstimmende Ergebnisse mit beiden Methoden, zehn Proben (13%) ergaben ein falsch positives Ergebnis mit der quantitativen PCR.

85% der korrekt typisierten Proben waren *RHD*-positiv, die restlichen 15% *RHD*-negativ, was der Verteilung des D-Merkmals in der Bevölkerung entspricht.

Nicht sämtliche Proben lieferten mit beiden Methoden Ergebnisse. Die Erklärung liegt darin, daß die Optimierung - sowohl der DNA-Isolierung als auch der PCR - mit den nur in kleinen Volumina zur Verfügung gestellten

Originalproben durchgeführt werden mußte. Insbesondere die Extraktion der Nukleinsäure aus Plasma erforderte im Verlauf der Experimente wesentliche Verbesserungen, da in einigen Proben nach Extraktion offensichtlich zu wenig DNA vorhanden war. Nachdem ein Ankonzentrierungsschritt der Nukleinsäure im Vakuum unter Zentrifugation eingeführt wurde, trat dieses Problem nicht mehr auf. Demgegenüber ist eine geringe Anzahl kindlicher Zellen in Fruchtwasserpunktaten häufig zu beobachten, was zu Schwierigkeiten bei der konventionellen DNA-Typisierung mittels Fragmentlängen-Analyse führt. Um bei dieser Methode aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, ist eine - im Vergleich zu einer PCR mit fluorogenen Sonden - um den Faktor 100 höhere DNA-Konzentration erforderlich.

Mit der vorgestellten Methode der fetalen *RHD*-Typisierung ist es möglich, geringste Mengen an DNA zu detektieren (vgl. Sensitivität : Abb. 33; Seite 56). Lo et al. (1998) kalkulieren einen ungefähren DNA-Gehalt pro Zelle von 7,8 pg. Mit dem Nachweis von DNA aus 3 bis 4 Zellen geht die Gefahr einher, geringste Kontaminationen *RHD*-positiver DNA zu erfassen. Dies könnte die Ursache der falsch positiv typisierten Proben sein. Es ist denkbar, daß es schon während der maternalen Blutentnahme bzw. bei der Probenaufbereitung zu einer Verunreinigung der Probe mit *RHD*-positiver DNA oder -Zellen kommt. Auch eine Kontamination der PCR-Vorbereitungsräume ist nicht auszuschließen. Eigene vertiefte Untersuchungen mit 20 Proben bestätigten, daß bei konsequenter Beachtung steriler Handhabung - sowohl der Extraktion als auch des PCR-Ansatzes - vorher falsch *RHD*-positive Proben nach einer erneuten DNA-Isolierung unter den strikten Bedingungen als *RHD*-negativ typisiert werden konnten.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Lo et al. (1998) wurde keine falsch *RHD*-negative Typisierung beobachtet. Allerdings berichtet die Arbeitsgruppe von diesem Problem nur bei einer Probenahme im ersten Trimester der Schwangerschaft. Hier wurden 2 von 9 *RHD*-positiven Proben fälschlicherweise als *RHD*-negativ typisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben stammten dagegen alle aus einer Venenpunktion während des zweiten und dritten Trimesters der Schwangerschaft und lieferten keine falsch negativen Resultate.

Falsch negative Ergebnisse der *RHD*-Typisierung können prinzipiell auch durch das folgende Problem bedingt sein. Schon sehr früh wurde beobachtet, daß bei der *RHD*-Typisierung Fehler auftreten können (Carrit et al. 1994). Ein Vergleich der Methoden von Simsek et al.(1994) und Bennett et al. (1993) konnte zeigen, daß es bei einigen Proben zu diskrepanten Ergebnissen kam (Müller et al. 1997). Durch die Untersuchung von Rouillac et al. (1995) wurde erstmals deutlich, daß sehr seltene Varianten des RhD Proteins, die sogenannten D-Kategorien, auf einen Austausch einzelner Exone zwischen dem *RHD*-und *RHCE*-Gen beruhen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Beckers et al. 1996; Wagner et al. 1998). Die Amplifikation in nur einem Exon birgt bei der Untersuchung von *RHD* - *RHCE* -Hybrid-Genen die Gefahr falsch negativer Ergebnisse.

Obleich das für die fetale Genotypisierung ausgewählte Exon 3 bislang keine falsch negativen Ergebnisse geliefert hat, besteht theoretisch auch hier die

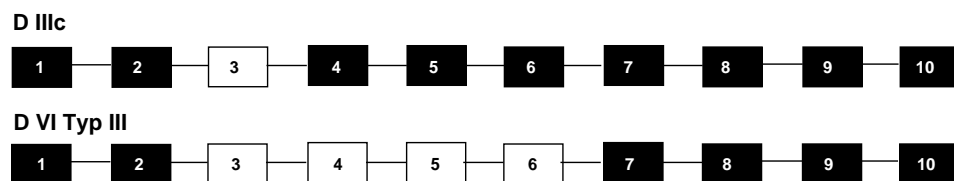


Abb.37 : Schematische Darstellung der *RHD* - *RHCE* -Hybrid-Gene, die bei der Detektion von Exon 3 zu einem falsch negativen *RHD*-Nachweis führen können. Die schwarzen Kästchen entsprechen den *RHD*-, die weißen den *RHCE*-spezifischen Exons.

Möglichkeit einer fehlerhaften Genotypisierung. Abb. 37 zeigt die Anordnung der Exons für die sehr selten vorkommenden D -Kategorien IIIc und VI (Typ III), bei denen das Exon 3 des *RHD*-Gens durch das des *RHCE*-Gens ausgetauscht ist. Untersuchungen von Proben dieser Kategorien würden deshalb zu einem falsch negativen Ergebnis führen.

Die schematische Darstellung der *RHD*-*RHCE*-Hybrid-Gene verdeutlicht, daß bei ausreichender DNA-Konzentration ein Exon-Screening (Gassner et al. 1997) die sicherste Methode ist, falsche Genotypisierungen auszuschließen. Bei einer fetalen *RHD*-Typisierung aus maternalem Plasma ist diese Möglichkeit aufgrund der geringen DNA-Menge nicht gegeben. Da die das Exon 3 betreffenden *RHD*-*RHCE*-Hybridgene aber nur sehr selten

vorkommen, bietet die fetale *RHD*-Genotypisierung im Exon 3 die größtmögliche Sicherheit, ein falsch negatives Ergebnis zu vermeiden.

4.4.3 Zusammenfassung

D-negative Mütter mit D-Antikörpern weisen bei einer Schwangerschaft mit einem D-positiven Kind ein großes Gefährdungspotential für Komplikationen vor und während der Geburt auf. Eine erste Abschätzung des Risikos kann über die Bestimmung der *RHD*-Zygotie des Kindsvaters erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Nachweis der *RHD*-Zygotie mittels quantitativer PCR vorgestellt. Für eine Validierung der Methode wurden 74 D-positive Kinder von D-negativen Müttern untersucht. Diese Proben wurden ausnahmslos als *RHD*-heterozygot typisiert und weisen damit auf die sehr gute Anwendbarkeit des neuen Nachweissystems hin.

Nichtinvasive Methoden für die fetale *RHD*-Bestimmung sind von herausragendem Interesse in der Pränataldiagnostik, da selbst eine Fruchtwasserpunktion unter sonographischer Kontrolle das Leben des Kindes gefährden kann. Der fetale *RHD*-Nachweis aus maternalem Blut stellt hohe Anforderungen sowohl an die Qualität der DNA-Extraktion als auch an die Sensitivität des Detektionssystems. Mit dem Zusatz von Träger-DNA während der Isolierung und Anreicherung der DNA gelang der Nachweis von Konzentrationen, die der Gesamt-DNA aus nur 3 bis 4 Zellen pro Milliliter Plasma entsprachen. Mit dieser großen Sensitivität geht die Gefahr einher, auch geringste Kontaminationen von *RHD*-positiven Zellen oder -DNA zu detektieren. In einem Vergleich fetaler *RHD*-Bestimmung aus dem Blut der Mutter mit DNA aus Fruchtwasser-Zellen stimmten die Ergebnisse in den meisten Fällen überein. Eine falsch negative *RHD*-Typisierung, die bei dem klinischen Einsatz dieser neuen Methode katastrophale Konsequenzen für das Kind haben könnte, wurde in keinem einzigen Fall beobachtet.

5. Zusammenfassung

Der molekulargenetische Nachweis klinisch relevanter Polymorphismen erschließt der modernen Medizin ungeahnte diagnostische Möglichkeiten. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themenbereiche behandelt, die das breite Spektrum verdeutlichen: die *RHD*-Bestimmung in der Pränatal-Diagnostik und die Identifizierung genetischer Risikofaktoren für einen Herzinfarkt. Während die nicht diagnostizierte D-Inkompatibilität das Leben eines Kindes bereits vor oder kurz nach der Geburt gefährden kann, zählen Koronarthrombosen zu den häufigsten Todesursachen älterer Menschen in den Industrienationen.

Für die Diagnostik wurden zwei unterschiedliche Strategien eingesetzt. Die Abschätzung einer genetischen Disposition für einen Herzinfarkt erfolgte mit einer neuentwickelten PCR-ELISA-Methode. Die unterschiedliche Markierung der Allel-spezifischen Primer mit Digoxigenin bzw. Fluoreszein ermöglichte eine Multiplex-PCR in einem Reaktionsgefäß. Über den gemeinsamen biotinylierten Primer wurden die Amplikons an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gebunden und mit Hilfe Enzymgekoppelter Antikörper in einer Farbreaktion nachgewiesen.

Für die *RHD*-Typisierung wurde die Produktanreicherung während der PCR anhand der Entstehung fluorogener Produkte in Echtzeit verfolgt. Die Messung der Fluoreszenz ist außerordentlich sensitiv und ermöglichte den zuverlässigen Nachweis der DNA nur weniger Zellen.

Die Untersuchung auf genetische Risikofaktoren für Koronarthrombosen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Kardiologie der Städtischen Kliniken Oldenburg und der Schüchtermann-Klinik in Bad Rothenfelde. Insgesamt wurden 851 Patienten mit koronarer Herzkrankheit auf Polymorphismen des Thrombozyten-Glykoproteins IIIa (HPA-1), der Gerinnungsfaktoren II und V sowie der Insertion / Deletion im Gen des „Angiotensin Converting Enzyme“ (ACE) getestet. Die Parameter wurden aufgrund ihrer pathophysiologischen Rolle in der Hämostase (HPA-1, Faktor V und II) bzw. der Blutdruckregulierung (ACE) ausgewählt.

Für keinen dieser Parameter wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Auftreten eines Myokardinfarktes beobachtet.

Allerdings konnte gezeigt werden, daß es zu einem signifikant höherem Herzinfarktrisiko bei einer Kombination von Diabetes und dem HPA-1b Typ kommt. Darüberhinaus korrelierte die Frequenz der G1691A-Mutation des Gerinnungsfaktors V mit der Zahl stenosierter Koronargefäße. Da die Faktor V Mutation die Inaktivierung des aktivierten Faktors V durch aktiviertes Protein C und somit die Rückkopplungshemmung der Thrombinbildung beeinträchtigt, erhärtet dies Ergebnis die Hypothese, daß die lokale Thrombinbildung die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit stimuliert.

Schwangerschaften D-negativer Mütter - die D-Antikörper entwickelt haben - mit einem D-positiven Kind sind mit einem hohen Komplikationsrisiko verbunden. Die individuelle Risikokonstellation hängt wesentlich von der *RHD*-Zygotie des Kindsvaters ab. Ist der Vater *RHD* heterozygot, so besteht eine 50%ige Chance, daß das Ungeborene *RHD*-negativ ist. Da bei D-negativen Kaukasiern bis auf sehr seltene Ausnahmen eine Deletion des *RHD*-Gens vorliegt, ist für die Bestimmung der Zygotie ein quantitativer Nachweis erforderlich. Die Strategie bestand darin, neben der Amplifikation des *RHD*-Gens eine Ko-Amplifikation des *RHCE*-Gens durchzuführen und das Verhältnis der beiden PCR-Produkte zubesimmen.

Die für den Fetus risikofreie Diagnostik feto-maternaler D-Inkompatibilität durch den Nachweis von Spuren fetaler DNA im maternalen Plasma ist eine der anspruchsvollsten Herausforderungen für die molekulargenetische Diagnostik. In Zusammenarbeit mit den Frauenkliniken der Städtischen Kliniken Oldenburg und der Universität Münster wurde Schwangeren anlässlich einer Amnioskentese eine Blutprobe entnommen und die fetale DNA aus dem maternalen Plasma isoliert. Durch den Zusatz von Träger-DNA und Anreicherung der extrahierten DNA gelang es, fetale DNA reproduzierbar aus dem Plasma der Mutter zu isolieren. Mit Ausnahme einiger Proben mit falsch positivem Ergebnis (vermutlich durch Kontamination) stimmten der *RHD*-Typ der DNA aus dem mütterlichen Plasma mit dem aus Fruchtwasser überein.

6. Literaturverzeichnis

- Aldermann, M.H.; Madhavan, S.H.; Ooi, W.L.; Cohen, H.; Sealey, J.E.; Laragh, J.H.: Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *New England Journal of Medicine* 1991. Vol. 324: 1098-1104.
- Alevriadou, B.R.; McIntire, L.V.: Rheology. in: Loscalzo, J.; Schafer, A.I. (Edit.): *Thrombosis and Hemorrhage*. Blackwell Scientific Publications Inc. 1994. Cambridge. Oxford. London. Edinburgh. Carlton Victoria. Seite 369ff.
- Alhenc-Gelas, M.; Arnaud, e.; Nicaud, v.; Aubry, M.L.; Flessinger, J-N.; Aiach, M.; Emmerich, J.: Venous thromboembolic disease and the prothrombinb , methylene tetrahydrofolate reductase and factor v genes. *Thrombosis Hemostasis* 1999. Vol. 81: 506-510.
- Amant, C.; Bauters, C.; Bodart, J-C.; Lablanche, J-M.; Grollier, G.; Danchin, N.; Hamon, M.; Richard, F.; Helbecque, N.; McFadden, E.P.; Amouyel, P.; Bertrand, M.E.: *D* Allele of the angiotensin I - converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation* 1997. Vol. 96: 56-60.
- Arce, M.; Thompson, E.S.; Wagner, S.; Coyne, K.E.; Ferdman, B.A.; Lublin, D.M.: Molecular cloning of Rh D cDNA derived from a gene present in Rh D positive but not Rh D-negative individuals. *Blood* 1993. Vol. 82: 651-655.
- Arruda, V.; Annichino-Bizzacchi, J.; Goncalves, M.; Costa, F.: Prevalence of the prothrombin gene variant (nt 20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1997. Vol. 78: 1430-1433.
- Avent, N.D.; Ridgewell, K.; Tanner, M.J.A.; Anstee, D.J.: cDNA cloning of a 30kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus) blood group expression. *Biochemical Journal* 1990. Vol. 271: 821-825.
- Avent, N.D.: Prenatal determination of fetal Rh status using the PCR. *Biotest Bulletin* 1997. Vol. 5: 429-438.
- Beckers, E.A.M.; Faas, B.H.W.; von dem Borne, A.E.G.K.; Overbeeke, M.A.M.; van Rhenen, D.J.; van der Schoot, C.E.: The R_0^{Har} Rh:33 phenotype results from substitution of exon 5 of the *RHCE* gene by the corresponding exon of the *RHD* gene. *British Journal of Haematology* 1996. vol. 92: 751-757.
- Bennett, P.R.; Le Van Kim, C.; Colin, Y.; Warwick, R.M.; Path, F.R.C.; Cherif-Zahar, B.; Fisk, N.M.; Catron, J.P.: Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *New England Journal of Medicine* 1993. Vol. 329: 607-610.

- Bertina, R.; Koeleman, B.; Koster, T.; Rosendaal, F.; Dirven, R.; de Ronde, H.; van der Velden, P.; Reitsma, P.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994. Vol. 369: 64-67.
- Beutler, E.; Lichtmann, M.A.; Coller, B.B.; Kipps, T.J.: *Williams Hematology . Fifth Edition. Library of Catalogin - in - Publication Data. U.S. 1995; S.1171*
- Boormann, K.E.; Dodd, B.E.; Lincoln, P.J.: *Blood Group Serology. 5.Edition. Churchill. Livingstone. Edinburgh. London. New York. 1977. Seite 75.*
- Carrit, B.; Steers, F.J.; Avent, N.D.: Prenatal determination of fetal RhD type. *The Lancet* 1994. Vol. 344: 205-206.
- Carter, A.M.; Ossei-Gerning, N.; Grant, P.: Platelet glycoprotein IIIa Pl^A polymorphism and myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine (Correspondence). Vol. 335: 1072-1073.*
- Carter, A.M.; Ossei-Gerning, N.; Wilson, I.; Grant, P.: Association of the platelet Pl^A polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen BB448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 1997. Vol. 96:1424-1431.
- Cavanagh, G.; Dunn, A.N.; Chapman, C.E.; Metcalfe, P.: HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfusion Medicine* 1997. Vol. 7: 41-45.
- Chan, W.P.; Lee, C.K.; Kwong, Y.L.; Lam, C.K.; Liang, R.: A novel mutation of Arg 306 of Factor V Gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998. Vol. 91: 1135-1139.
- Chen, D-F.; Pastucha, L.T.; Chen, H-Y.; Kadar, J.G.; Stangel, W.: Simultaneous Genotyping of Human Platelet Antigens by Hot Start Sequence-Specific Polymerase Chain Reaction with DNA Polymerase AmpliTaq Gold. *Vox Sanguinis* 1997. Vol. 72: 192-196.
- Colin, Y.; Cherif-Zahar, B.; Le van Kim, C.; Raynal, V.; van Huffel, V.; Catron, J.: Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991. Vol. 78: 2747-2752.
- Dahr, W.; Schmitz, G.; Ernst, M.; Gielen, W.; Sonneborn, H-H.: Rh antigens and cysteine modification. *Biotest Bulletin* 1997. Vol. 5: 451-457.
- Doggen, C.; Cats, V.; Bertina, R.; Rosendaal, F.: Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associates with factor V Leiden or prothrombin 20210 A. *Circulation* 1998. Vol. 97: 1037-1041.

- Evans, A.E.; Poirier, O.; Kee, F.; Lecerf, L.; McCrum, E.; Falconer, T.; Crane, J.; O'Rourke, d.F.; Cambien, F.: Polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary disease. *Quarterly Journal of Medicine* 1994. Vol. 87: 211-214.
- Flegel, W.A.; Wagner, F.F.; Müller, TH.; Gassner, C.: Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion Medicine* 1998. Vol. 8:281-302.
- Franco, R.F.; Trip, M.D.; ten Cate, H.; von den Ende, A.; Prins, M.H.; Kastelein, J.J.P.; Reitsma, P.H.: The 20210 G → A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *British Journal of Haematology* 1999. Vol.104: 50-54.
- Fujiwara, K.; Tokunaga, K.; Isa, K.; Miyamoto, M.; Wang, L.; Akaza, T.; Tadokoro, K.; Shibata, Y.; Juji, T.: DNA-based typing of human platelet antigen systems by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism method. *Vox Sanguinis* 1995. Vol. 69: 347-351.
- Funke, I.; Wiesneth, M.; Kubanek, B.: Platelet Substitution. *Biomedical Progress* 1999. Vol. 12:48-53
- Gardemann, A.; Humme, J.; Stricker, J.; Nguyen, Q.D.; Katz, N.; Philipp, M.; Tillmanns, H.; Hehrlein, F.W.; Rau, M.; Haberbosch, W.: Association of the platelet glycoprotein IIIa P1A1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thrombosis Hemostasis* 1998. Vol. 80: 214-217.
- Gassner, C.; Schmarda, A.; Kilga-Nogler, S.; Jenny-Feldkircher, B.; Rainer, A.; Müller, T.H.; Wagner, F.F.; Flegel, W.A.; Schönitzer, D.: RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion* 1997. Vol. 37: 1020-1026.
- Hamlington, J.; Cunningham, J.; Mason, g.; Mueller, R.; Miller, D.: Prenatal detection of rhesus D genotype. *Lancet* 1997. Vol. 349:540.
- Hezard, N.; Cornillet, P.; Droulee, C.; Gillot, L.; Potron, G.; Nguyen, P.: Factor V Leiden: Detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position. *Thrombosis Research* 1997. Vol. 88: 59-66.
- Horsewood, P.; Smith, J.W.; Kelton, J.G.: Monoclonal Antibodies Against Platelet Glycoproteins. *Transfusion Medicine Reviews* 1993. Vol. VII, No. 3 (July): 156-172
- Inbal, A.; Freimark, D.; Modan, B.; Chetrit, A.; Matezky, S.; Rosenberg, N.; Dardik, R.; Baron, Z.; Seligsohn, U.: Synergistic effects of prothrombotic polymorphism and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood* 1999. Vol. 93: 2186-2190.

- Inbal, A.; Fraimark, D.; Modan, B.; Chetrit, A.; Hod, H.; Rosenberg, N.; Dardik, R.; Seligsohn, U.: Prothrombotic polymorphic markers in young patients with myocardial infarction. *Blood* 1997. Vol. 90. (abstr. suppl.) 150a.
- Klüter, H.; Fehlau, K.; Panzer, S.; Kirchner, H.; Bein, G.: Rapid typing for human platelet antigen systems -1,-2,-3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sanguinis* 1996. Vol. 71: 121-125.
- Koster, T.; Rosendaal, F.R.; de Ronde, H.; Briet, E.; Vandenbroucke, J.P.; Bertina, R.M.: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993. Vol. 342: 1503-1506.
- Lindmarker, P.; Schulman, S.; Sten-Linder, M.; Wiman, B.; Egberg, N.; Johnsson, H.; DURAC Trial Study Group: The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. *Thrombosis and Haemostasis* 1999. Vol. 81:684-689.
- Lo, Y.-M.D.; Bowell, P.J.; Selinger, M.; Mackenzie, I.Z.; Chamberlain, P.; Gillmer, M.D.G.; Littlewood, T.J.; Fleming, K.A.; Wainscoat, J.S.: Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 1993. Vol.341: 1147-1148.
- Lo, Y.-M.D.; Noakes, L.; Bowell, P.J.; Fleming, K.A.; Wainscoat, J.S.: Detection of fetal RhD sequence from peripheral blood of sensitized RhD-negative pregnant women. *British Journal of Haematology* 1994. Vol. 87: 658-660.
- Lo, Y.-M.D.; Hjelm, N.M.; Fidler, C.; Sargent, I.L.; Murphy, M.f.; Chamberlain, P.F.; Poon, P.; Redman, C.W.G.; Wainscoat, J.S.: Prenatal diagnosis of fetal RhD Status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine* 1998. Vol. 339: 1734-1738.
- Marian, A.J.; Brugada, R.; Kleiman, B.: Platelet glycoprotein IIIa Pl^A polymorphism and myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine (Correspondence)*. Vol. 335: 1071-1072.
- Marian, A.J.; Yu, Q-t.; Workman, r.; Greve, G.; Roberts, R.: Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *The Lancet* 1993. Vol. 342: 1085-1086.
- Meyer, O.; Hildebrandt, M.; Schulz, B.; Blasczyk, R.; Salama, A.: Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5. *Transfusion* 1999. Vol.39: 1256-1258.
- Müller, TH.: Pharmacodynamic models to evaluate antithrombotics in clinical pharmacology, *J Clin Pharmacol.* 1977. Vol. 37:49S-58S.

- Müller, T.H.; Lammers, I.; Gran, S.; Neuse, I.; Leo, A.; Schunter, F.: Routine rhesus-D genotyping in amniotic fluid: analysis of exon 10 versus intron 4 by polymerase chain reaction. *Beitr. Infusionther.Transfusionsmed.* 1997. Vol. 34: 210-214.
- Müller-Eckhard, C.; Kiefel, V.; Santoso, S.: Review and Update of Platelet Alloantigen Systems. *Transfusion Medicine Reviews* 1990. Vol. IV; No.2: 98-109.
- Müller-Eckhard, C.: Platelet antigens and antibodies and their clinical implications. in: A review of 50 years of the Rh blood group system and special reviews to platelet and HLA diagnosis. *Biotest Bulletin* 1997; Vol.5, No.4; Seite 529-538.
- Newman, P.J.: Nomenclature of Human Platelet Alloantigens: A Problem with the HPA System? *Blood* 1994. Vol. 83, No. 6: 1447-1451
- Peerschke, E.I.B.: Platelet Membrane Glycoproteins. Functional Characterization and Clinical Applications. *American Journal of Clinical Pathology* 1992. Vol. 98, No.4 : 455-463
- Phillips, d.R.; Charo, I.F.; Parise, L.V.; Fitzgerald, L.A.: The Platelet Membrane Glycoprotein IIb-IIIa Complex. *Blood* 1988. Vol. 71, No. 4: 831-843.
- Poort, S.R.; Rosendaal, F.R.; Reitsma, P.H.; Bertina, R.M.: A common genetic variation of the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996. Vol. 88: 3698-3703.
- Poulter, M.; Kemp, T.J.; Carritt, B.: DNA-Based Rhesus Typing: Simultaneous Determination of RHC and RHD Status Using the Polymerase Chain Reaction. *Vox Sanguinis* 1996. Vol. 70: 164-168.
- Raynold, M.V.; Bristow, M.R.; Bush, E.W.; Abraham, W.T.; Lowes, B.D.; Zisman, L.S.; Taft, C.S.; Perryman, M.B.: Angiotensin-converting enzyme *DD* genotype in patients with ischaemic oder idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993. Vol. 342: 1073-1075.
- Ridker, P.M.; Hennekens, C.H.; Lindpainter, K.; Stampfer, M.J.; Eisenberg, P.R.; Miletich, J.P.: Mutation in the gene encoding for coagulation factor V and he risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. *The New England Journal of Medicine* 1995. Vol.332, No. 14: 912-917.
- Ridker, P.M.; Hennekens, C.H.; Schmitz, C.; Stampfer, M.J.; Lindpaintner, K.: PI^{A1/A2} polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *The Lancet* 1997. Vol. 349:385-388.
- Rigat, B.; Hubert, C.; Alhenc-Gelas, F.; Cambien, F.; Corvol, P.; Soubrier, F.: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigations* 1990. Vol. 86: 1343-1346.

- Rosendaal, F.; Siscovick, D.; Schwartz, S.; Psaty, B.; Longstreth, W.T.; Raghunathan, T.; Koepsell, T.D.; Reitsma, P.H.: Factor V-Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997. Vol. 89: 2817-2821.
- Rosendaal, F.; Siscovick, D.; Schwartz, S.; Psaty, B.; Raghunathan, T.; Vos, H. A common prothrombin variant (20210 G to A) increase the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997. Vol. 90: 1747-1750.
- Rouillac, C.; Colin, Y.; Hughes-Jones, N.C.; Beolet, M.; D'Ambrosio, A.-M.; Cartron, J.-P.; Le Van Kim, C.: Transcript analysis of D-category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood* 1995. Vol. 85: 2937-2944.
- Schild, T.: Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. Fa. PE Applied Biosystems. 7700 SDS Workshop.
- Simsek, S.; Faber, N.M.; Bleeker, P.M.; Vlekke, A.B.; Hiuskes, E.; Goldschmeding, R.; von dem Borne, A.E.: Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme)analysis. *Blood* 1993. Vol. 81: 835-840.
- Simsek, S.; Bleeker, P.M.M.; von den Borne, A.E.G.K.: Prenatal determination of fetal RhD type. *The New England Journal of Medicine* 1994. Vol. 330: 795-796.
- Simsek, S.; Faays, B.H.W.; Bleeker, P.M.M.; Overbeeke, M.A.M.; Cuijpers, H.Th.M.; van der Schoot, C.E.; von dem Borne, A.E.G.Kr.: Rapid Rh D Genotyping by Polymerase Chain Reaction-Based Amplification of DNA. *Blood* 1995. Vol. 85: 2975-2980.
- Skogen, B.; Bellissimo, D.B.; Hessner, M.J.; Santoso, S.; Aster, R.H.; Newman, P.J.; McFarland, J.G.: Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. *Transfusion* 1994. Vol. 34, No. 11: 955-960.
- Tanaka, S.; Taniue, A.; Nagao, N.; Ohnoki, S.; Shibata, H.; Okubo, Y.; Yamaguchi, H.: Simultaneous DNA Typing of Human Platelet Antigens 2,3 and 4 by an Allele-Specific PCR-Method. *Vox Sanguinis* 1995. Vol. 68: 225-230.
- Tiret, L.; Rigat, B.; Visvikis, S.; Breda, C.; Corvol, P.; Cambien, F.; Soubrier, F.: Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *American Journal of Human Genetics* 1992. Vol.51: 197-205.
- Tiret, L.; Kee, F.; Poirier, O.; Nicaud, V.; Lecerf, L.; Evans, A.; Cambou, J.-P.; Arveiler, D.; Luc, G.; Amouyel, P.; Cambien, F.: Deletion polymorphism in angiotensin-converting-enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 1993. Vol. 341: 991-992.

- Unkelbach, K.; Kalb, R.; Santoso, S.; Kroll, H.; Mueller-Eckhardt, C.; Kiefel, V.: Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw (PIA), Ko, Bak and Br (HPA-1,2,3,5). *British Journal of Haematology* 1995. Vol.85: 227-229.
- Wagner, F.F.; Gassner, C.; Müller, T.H.; Schönitzer, D.; Schunter, F.; Flegel, W.: Three Molecular Structures Cause Rhesus D Category VI Phenotypes With Distinct Immunohematologic Features. *Blood* 1998. Vol. 91: 2157-2168.
- Weiss, E.J.; Bray, P.F.; Tayback, M.; Schulman, S.P.; Kickler, T.S.; Becker, L.C.; Weiss, J.L.; Gerstenblith, G.; Goldschmidt-Clermont, P.J.: A Polymorphism Of A Platelet Glycoprotein Receptor As An Inherited Risk Factor For Coronary Thrombosis. *The New England Journal of Medicine* 1996. Vol.334, No. 17:1090-1096.
- Williamson, D.; Brown, K.; Luddington, R.; Baglin, C.; Baglin, T: Factor V Cambridge: A new mutation (Arg³⁰⁶ → Thr) associated with resistance to activated Protein C. *Blood* 1998. Vol. 91: 1140-1144.
- Yusuf, S.; Pepine, C.J.; Garces, C.; Pouleur, H.; Salem, D.; Kostis, J.; Benedict, C.; Rousseau, M.; Bourassa, M.; Pitt, B.: Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. *Lancet* 1992. Vol. 340:1173-1178.
- Zee, R.Y.L.; Lou, Y.-k.; Griffiths, L.R.; Morris, B.G.: Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992. Vol. 184: 9-15.

Danksagung

Nach Vollendung der Arbeit ist es nun an der Zeit, mich bei den Personen zu bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Herrn Priv.Doz. Dr. T.H. Müller bin ich zu größtem Dank verpflichtet, da ohne seine Initiative diese Arbeit nie geschrieben worden wäre. Seine Fähigkeiten als Leiter der Arbeitsgruppe Molekularbiologie führten zu einem Arbeitsklima, in dem sowohl fruchtbare Diskussionen als auch der Spaß an der gemeinsamen Arbeit gedeihen konnten.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. F. Schunter, der dem „Experiment“ einer Doktorarbeit im Institut des Blutspendedienstes des Deutschen Roten Kreuzes bereitwillig seine Zustimmung und Unterstützung gab.

Den Mitarbeiterinnen des DNA-Labores bin ich für ihre tatkräftige Unterstützung zu Dank verpflichtet, insbesondere Frau Sylvia Horst für die Untersuchung der Fruchtwasserproben per Multiplex-PCR und Frau Inka Behrens für die Zweituntersuchung der Thrombozyten-Antigene mittels konventioneller PCR.

Für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und die gute Zusammenarbeit möchte ich folgenden Personen danken:

- Herrn Dr. Steuernagel (Frauenklinik der Städtischen Kliniken Oldenburg)
- Herrn Dr. Cornelius (Frauenklinik der Städtischen Kliniken Oldenburg)
- Herrn Dr. Louwen (Frauenklinik der Universität Münster)
- Herrn Dr. Glauner (Schüchtermann Klinik Bad Rothenfelde)
- Herrn Prof. Reill (Kardiologie der Städtischen Kliniken Oldenburg)

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. C. Richter-Landsberg für ihre Bereitschaft, als Gutachterin einer externen Doktorarbeit zu fungieren.

Nicht zuletzt danke ich meinem Lebensgefährten Michael Fischer. Es erfordert ein hohes Maß an Geduld und Toleranz, über einen längeren Zeitraum die Reduzierung der gemeinsamen Freizeit mit Verständnis und Humor zu akzeptieren.

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Lebenslauf

Name: Döscher
Vorname: Andrea
Geburtsdatum: 15.08.1960
Geburtsort: Bremerhaven
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

1967 - 1971 Grundschule Wilhelmshaven
1971 - 1977 Realschule Wilhelmshaven
1977 - 1979 Ausbildung zur Arzthelferin in einer
 internistischen Facharztpraxis
1979 - 1981 MTA-Ausbildung an der Staatlichen Lehranstalt
 für med.-techn.Assistenten Oldenburg
1984 - 1987 Oldenburg Kolleg: Staatliches Institut zur
 Erlangung der Hochschulreife
1987 - 1994 Studium der Biologie an der Universität
 Oldenburg

Beruflicher Werdegang:

1981 - 1982 Hormonlabor der II. Medizinischen Klinik des
 Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf
1982 - 1984 Zentrallabor des Pius-Hospitals Oldenburg
1989 - 1995 Beschäftigung als Honorarkraft bei der
 Gesellschaft für wirtschaftlichen
 Computereinsatz (GWCE)
1995 - heute Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes