

**Aus den Kliniken und Polikliniken für Kinderheilkunde und
Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Charité**

- Abteilung Allgemeine Pädiatrie -

Direktor Professor Dr. med. G. Gaedicke



[PDF-VERSION]

DISSERTATION

Molekulare Charakterisierung der β -Thalassämie bei Probanden deutscher Herkunft

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

**von
Frau Claudia Schwarz-Muche
geb. am 08. September 1970 in Erfurt**

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: Prof. A. E. Kulozik (Charité, Campus Virchow-Klinikum, Kinderklinik)

Prof. Sperling (Charité, Campus Virchow-Klinikum, Genetik)

Prof. E. Kohne (Universitätsklinikum Ulm, Kinderklinik)

Datum der Einreichung: 31.03.1998

Datum der mündlichen Prüfung: 26.10.1998

Zusammenfassung

Die β -Thalassämie gehört weltweit zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten. Die Thalassämien treten endemisch in der Bevölkerung des Mittelmeerraumes, in Westafrika und in weiten Teilen Asiens auf. In der einheimischen Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland gehört die homozygote Form der β -Thalassämie zu den seltenen Erkrankungen. Häufiger ist das Auftreten der heterozygoten Form, die als Differentialdiagnose der mikrozytären, hypochromen Anämie eine besondere Rolle spielt. Blutproben von 214 deutschen Personen mit einer heterozygoten β -Thalassämie wurden mittels Allel-spezifischer Oligonukleotid-Hybridisierung, Restriktionsanalyse und direkter Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA analysiert. Insgesamt konnten 96,3 % (206/214) der Proben molekular charakterisiert werden. Die mediterranen Mutationen stellen einen Anteil von etwa 2/3 aller identifizierten Veränderungen, häufig sind insbesondere NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A und IVS1-1 G \rightarrow A. Das übrige Mutationsspektrum setzt sich aus sehr seltenen Mutationen (IVS1-1 G \rightarrow T, IVS1-2 T \rightarrow G, IVS1-2 T \rightarrow C, NS 15 G \rightarrow A, NS 121 G \rightarrow T, FS 8/9 +G, FS 44 -C, FS 51 -C, FS 82/83 -G, Initiations-Kodon-Mutationen ATG \rightarrow ACG/ \rightarrow GTG/ \rightarrow ATA) und einer neuen Mutation (IVS1-129 A \rightarrow G) zusammen. In 6 Fällen konnte nach vollständiger molekularer Analyse kein Gendefekt als Ursache der β -Thalassämie gefunden werden. Diese Probanden könnten β -Thalassämiedeterminanten tragen, die nicht an den β -Globingen-Komplex gekoppelt sind oder regulative Sequenzen außerhalb des β -Globingens darstellen. Die erhobenen Daten zeigen, daß der Ursprung der β -Thalassämie in der deutschen Bevölkerung in den Mittelmeerländern liegt, ein Drittel der Fälle scheint sich jedoch lokal entwickelt zu haben.

Schlagwörter: β -Thalassämie, Deutschland, β -Globingen-Mutationen, Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Abstract

The β -thalassemia belongs to the most common monogenic disorders worldwide. Endemically in the Mediterranean population, some parts of Asia and Western Africa, β -thalassemia is a rare disease in Germany. Nevertheless, heterozygous forms of β -thalassemia minor occur more frequently in the German population and should be considered in the differential diagnosis of hypochromic anemia. To investigate the molecular biological background of β -thalassemia in Germany, 214 non-immigrant German individuals suffering from heterozygous β -thalassemia were characterized by allele-specific oligonucleotid hybridization, restriction analysis and sequencing of the β -globin gene. By these techniques, 26 different mutations were identified. Most frequently, the Mediterranean mutations NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A, and IVS1-1 G \rightarrow A were detected. Although otherwise rare, the frameshift mutation of codon 83 (FS 83 -G) was also relatively common (5 %) in the analyzed population. Other previously described mutations (IVS1-1 G \rightarrow T, IVS1-2 T \rightarrow G, IVS1-2 T \rightarrow C, NS 15 G \rightarrow A, NS 121 G \rightarrow T, FS 8/9 +G, FS 44 -C, FS 51 -C, initiation codon mutation ATG \rightarrow ACG/ \rightarrow GTG/ \rightarrow ATA) were demonstrated in < 10 individuals. Interestingly, sequence analysis identified a novel mutation affecting position -2 of the splice acceptor site (IVS1-129 A \rightarrow G). In 6 individuals diagnosed as heterozygous β -thalassemia, a mutation of the β -globin gene could not be demonstrated. The data indicate the β -thalassemia to be introduced from the Mediterranean population into Germans in two-thirds of the cases whereas the remaining third probably is of local origin.

Keywords: β -thalassemia, Germany, β -globin gene mutations, genotype-phenotype-correlation

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung und Problemstellung	8
1.1. Überblick	8
1.1.1. Historisches	8
1.1.2. Struktur und Funktion des normalen und anomalen Hämoglobins	8
1.1.2.1. Ontogenese des Hämoglobins	10
1.1.2.2. Molekulare Anatomie und Physiologie des β -Globingen-Komplexes	11
1.1.2.3. Molekulare Pathologie	12
1.1.3. Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie der β -Thalassämie	15
1.1.3.1. Pathophysiologie der β -Thalassämie	15
1.1.3.2. Klinisches Bild	16
1.1.3.3. Diagnostik	17
1.1.3.4. Therapie	18
1.1.3.4.1. Konventionelle Behandlungsverfahren	18
1.1.3.4.2. Neue Strategien der Therapie: Supportiv und kurativ.	20
1.1.4. Geographische Verteilung der Erkrankung und populations-genetische Aspekte	22
1.1.5. Die β -Thalassämie in der deutschen Bevölkerung	23
1.2. Problemstellung	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Untersuchungsmaterial	26
2.1.1. Auswahl der Probanden	26
2.1.2. Geräte	26
2.1.3. Chemikalien	26
2.2. Methoden	28
2.2.1. DNA-Extraktion	28
2.2.2. PCR	28
2.2.2.1. Prinzip der Methode	28
2.2.2.2. Primerauswahl	28
2.2.2.3. PCR-Optimierung	29
2.2.2.4. Agarosegelelektrophorese	29
2.2.3. Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung	29
2.2.3.1. Prinzip der Methode	29
2.2.3.2. Markierung der Oligonukleotide	30
2.2.3.3. Dot-Blotting	31
2.2.3.4. Hybridisierung	31
2.2.3.5. Waschen der Filter	32
2.2.3.6. Detektion	32
2.2.3.6.1. Prinzip der Detektion	32
2.2.4. Sequenzierung	33
2.2.4.1. Sequenzierung nach der Didesoxymethode	33
2.2.4.2. PCR mit biotinmarkierten Primern	34
2.2.4.3. Sequenzierung einzelsträngiger DNA mit der T7-Polymerase	34
2.2.5. Restriktionsanalyse	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Screening auf häufige β-Thalassämie-Mutationen der Endemiegebiete	37
3.1.1. Auswahlkriterien	37
3.1.2. ASO und Restriktionsverdau	37
3.1.3. Häufigkeiten der Mutationen bei Probanden deutscher Herkunft	43

3.2. Identifikation seltener β-Thalassämie Mutationen	45
3.2.1. Sequenzanalyse	45
3.2.2. Seltene Mutationen und ihre Häufigkeiten in der einheimischen deutschen Bevölkerung	45
3.3. Identifizierung einer seltenen und einer neuen Mutation	52
3.3.1. Restriktionsanalyse	52
3.3.2. Darstellung eines ungewöhnlichen Restriktionsmusters nach <i>DdeI</i> -Verdau	52
3.3.3. Nachweis der Mutationen mittels Sequenzanalyse	54
3.3.4. IVS1-129 A \rightarrow G: Eine <i>neue</i> Mutation.	55
3.4. Zusammenfassung aller identifizierten Mutationen	56
4. Diskussion	58
4.1. Die β-Thalassämie in der einheimischen deutschen Bevölkerung	58
4.1.1. Vergleich zwischen dem Mutationsspektrum in der einheimischen deutschen Bevölkerung und anderen Populationen der Nicht-Endemiegebiete	59
4.2. Seltene β-Thalassämie-Gene	64
4.2.1. Die <i>Frameshift</i> -Mutation am Übergang vom Kodon 82/83.	64
4.2.2. Die <i>Nonsense</i> -Mutation im Kodon 121.	64
4.3. Die <i>neue</i> IVS1-129 A \rightarrow G-Mutation	66
4.4. β-Thalassämie ohne Mutation im β-Globingen	69
5. Zusammenfassung und Thesen	72
5.1. Zusammenfassung	72
5.2. Thesen	74
6. Literaturverzeichnis	75

Abkürzungsverzeichnis

Zusammensetzungen von Chemikalien sind im Abschnitt Material und Methoden erläutert. Für Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code und der Drei-Buchstaben-Code verwendet.

AA	gesunder Proband
AP	Alkalische Phosphatase
AS	heterozygoter Träger der Sichelzellmutation
ASO	Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung
AT	heterozygoter Träger einer beliebigen β -Thalassämie-Mutation
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$	$\alpha\text{-}^{35}\text{S}$ Schwefel-markiertes Desoxy-Adenin-Triphosphat
β°	β -Globingenexpression vollständig inaktiviert
β^{+}	β -Globingenrestaktivität bis etwa 20 %
β^{++}	β -Globingenrestaktivität über etwa 20 %
β^A	normales β -Globingen
β^S	β -Globingen mit Sichelzellmutation
β^T	β -Globingen einer Thalassämie
bp	Basenpaare
BP 1	<i>Beta Protein 1</i>
cd	Kodon
CSPD	<i>Disodium 3-(-4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl phenyl phosphate</i>
dATP	Desoxy-Adenin-Triphosphat
ddA (C, G, T, U)TP	Didesoxy-Adenin (Cytosin, Guanin, Tyrosin, Uridin)-Triphosphat
DFO	Deferoxamin
DIG-Hyb-Mix	Digoxigenin-Hybridisierungs-Mix
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DPG	Diphosphoglyzerat
EDTA	Ätylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
EKLF	<i>Erythroid Krüppel Like Factor</i>
FS	Verschiebung des Leserahmens (<i>Frameshift</i>)
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
Hb	Hämoglobin
HLA	humanes Leukozyten Antigen (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
HPFH	hereditäre Persistenz fetalen Hämoglobins
HS	<i>Hypersensitive Sites</i>
IVSx-y	Sequenz im x-ten Intron an Position y (<i>Intervening Sequence</i>)
kb	Kilobasen
KMT	Knochenmarktransplantation
LCR	Lokus Kontroll Region (<i>Locus Control Region</i>)
M	Mutation
max.	maximal
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>)
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>)
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen (<i>Main Cell Volume</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Anzahl, Häufigkeit
NaCl	Natriumchlorid
NS	<i>Nonsense</i> -Mutation
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
o. A.	ohne Angabe

OH	Hydroxyl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger-RNA</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
snRNP	<i>small nuclear Ribonucleo Protein Particle</i>
SS	homozygoter Träger der Sichelzellmutation
SSC	<i>Sodium Chloride Sodium Citrate</i>
SSPE	<i>Sodium Chloride Sodium Phosphate EDTA</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Thal.	Thalassämie
TMACL	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute
UTR	nichttranslatierte Sequenz (<i>Untranslated Region</i>)
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Überblick

1.1.1. Historisches

Die erste Beschreibung der β -Thalassämie geht auf Thomas B. Cooley aus Detroit zurück. Seine Beobachtungen veröffentlichte er 1925 unter dem Titel "*A Series of Cases of Splenomegaly in Children, with Anemia and peculiar Bone Changes*". Der Erstbeschreiber ging davon aus, daß es sich zwar um eine angeborene, jedoch nicht um eine vererbare Erkrankung handelt. Der Begriff „Thalassämie“ wurde 1932 durch Whipple und Bradford das erste Mal benutzt [Weatherall & Clegg, 1981]. Das Wort ist dem griechischen „thalassa“, das Meer, entlehnt und spiegelt das häufige Vorkommen dieser Erkrankung in den Ländern des Mittelmeerraumes wider. Erst 1938 publizierte der griechische Arzt Caminopetros, daß die Thalassämien genetisch determinierte Erkrankungen sind.

1959 lieferten Ingram und Stretton ihr Modell der genetischen Basis der Thalassämien und zeigten, daß es zwei Hauptklassen der Thalassämien gibt, die α - und β -Thalassämie. Kurz darauf konnte die komplette Aminosäuresequenz für die α -, β - und γ -Ketten des Hämoglobins bestimmt werden [Kacian et al., 1973].

In den darauffolgenden Jahren wurde deutlich, daß es sich um eine heterogene Gruppe genetischer Erkrankungen handelt, deren Existenz sich nicht auf die mediterrane Region beschränkt. Die Entdeckung des Enzyms Reverse Transkriptase spielte eine Vorreiterrolle auf dem Weg zur molekularen Charakterisierung der Thalassämien. Somit war die Möglichkeit gegeben, die mRNA von Thalassämiepatienten mittels molekularer Hybridisierung zu analysieren und zu erkennen, daß die Erkrankungen auf einer verringerten Globin-mRNA-Produktion basieren. [Housman et al., 1973].

1.1.2. Struktur und Funktion des normalen und anomalen Hämoglobins

Das Hämoglobin ist ein tetrameres Protein, bestehend aus 2 Paaren von 4 Globinketten mit je einer Farbstoffkomponente, dem Häm. Das Molekulargewicht beträgt ca. 64.500. Je 2 Globinketten sind identisch und ihr Vorkommen ist abhängig vom Entwicklungsalter (Tab. 1). So wird das adulte Hämoglobin aus 2 α -Ketten mit je 141 Aminosäuren und 2 β -Ketten aus je 146 Aminosäuren gebildet.

Namenskürzel	Globinketten	Vorkommen
HbA	$\alpha_2\beta_2$	≈ 97 % des normalen Hb des Erwachsenen
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$	$\approx 2,5$ % des normalen Hb beim Erwachsenen
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	fetales Hb, $\approx 0,5$ % beim Erwachsenen
Hb Gower-1	$\zeta_2\varepsilon_2$	Embryonales Hb
Hb Gower-2	$\alpha_2\varepsilon_2$	Embryonales Hb
Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$	Embryonales Hb

Tab. 1: Die physiologischen menschlichen Hämoglobine, nach Weatherall & Clegg, 1981.

Die Hauptfunktion des Hämoglobins besteht im Transport des Sauerstoffs aus der Lunge in die Gewebe, der sich reversibel an das Häm bindet. Um die Effizienz dieses Transportes bestimmen zu können, bedient man sich der Sauerstoffbindungskurve und ermittelt den P50 (Wert, bei dem 50 % des Sauerstoffs gebunden vorliegen). Der normale Wert bei pH 7,4 und 37° liegt um 26 mmHg. Im typischen sigmoiden Verlauf der O₂-Bindungskurve eines tetrameren Hämoglobins kommt die veränderte O₂-Affinität bei verschiedenen Sauerstoffdrücken zum Ausdruck. Sie reflektiert die Kooperativität der Untereinheiten, die einerseits von der heterotetrameren Struktur des Hämoglobins und andererseits von den intramolekularen strukturellen Veränderungen abhängig sind, die während der Oxygenation und Desoxygenation ablaufen.

Faktoren wie Temperatur, pH, pCO₂, 2,3 Diphosphoglyzerat (DPG) und der Austausch von Aminosäuren können die O₂-Affinität charakteristisch verändern. Dabei kommt dem 2,3 DPG eine Sonderrolle zu. Das auf einem Nebenweg der Erythrozyten-Glykolyse entstehende Produkt [Rapoport et al., 1968], hat die Eigenschaft, sich bevorzugt an die β -Ketten des Hb zu binden und dadurch Einfluß auf O₂-Aufnahme und -Abgabe zu nehmen. Durch Anlagerung des 2,3 DPG an das desoxygenierte Hb-Molekül wird die O₂-Affinität herabgesetzt. Das erleichtert die O₂-Abgabe in die periphere Zirkulation und gewährleistet eine bessere O₂-Versorgung des Gewebes [Benesch & Benesch, 1969; Perutz, 1970]. Über die Struktur- und Funktionsbeziehungen ist folgendes bekannt: Im reduzierten Hämoglobin haben sich die beiden β -Globinketten soweit voneinander entfernt, daß das 2,3 DPG genau in diese Lücke paßt, durch seine Bindung an die Proteinstrukturen die Desoxyform stabilisiert und dadurch die O₂-Affinität herabsetzt. Das HbF ($\alpha_2\gamma_2$) unterscheidet sich vom HbA durch seine verminderte 2,3 DPG-Bindungsfähigkeit, wodurch die O₂-Affinität der fetalen Erythrozyten steigt. Das weniger ausgeprägte Bindungsvermögen des HbF für 2,3 DPG ermöglicht deshalb einen optimalen O₂-Transfer vom mütterlichen zum fetalen Organismus [Bauer et al., 1968; Benesch & Benesch, 1969].

Durch Austausch einer Aminosäure innerhalb der Globinkette kann die Löslichkeit (z.B. HbS [$\beta 6$ Glu→Val]), Stabilität (z.B. Hb Köln [$\beta 98$ Val→Met]) oder die O₂-Affinität (selten, z. B. Hb Kansas [$\beta 102$ Asn→Thr]) des Hämoglobins verändert werden. Solche Abweichungen werden durch sogenannte *Missense*-Mutationen hervorgerufen und stellen strukturelle Abnormitäten des Hb dar. Nur ein geringer Teil der 693 (März 1996) [Huisman et al., 1996] bekannten Hb-Anomalien gehen mit klinischen Symptomen einher, diese werden Hämoglobinopathien genannt. Anfangs bezeichnete man die verschiedenen anomalen Hämoglobine mit den Großbuchstaben des Alphabets, als die Zahl rasch zunahm, wurde auf den Entdeckungsort bzw. den Geburtsort

des Patienten zurückgegriffen. Als häufigste und weitverbreitetste Hämoglobinopathie ist das 1949 von Pauling et al. entdeckte HbS bekannt. Seine molekulare Aufarbeitung zeigte einen Aminosäureaustausch (Glutaminsäure zu Valin) an Position 6 der β -Kette.

Die Bezeichnung Hämoglobinopathie erstreckt sich im weiteren Sinne auf Strukturanomalien mit normaler Syntheserate und die Thalassämien mit einer quantitativen Störung der Hämoglobinsynthese. Ein typisches Beispiel für den ambivalenten Gebrauch des Begriffes Hämoglobinopathie ist das HbE (β 26 Glu→Lys). Beim HbE handelt es sich um eine Hämoglobinanomalie durch die *Missense*-Mutation im Kodon 26, die eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat. Andererseits bewirkt die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle gleichzeitig die Bildung einer qualitativ und quantitativ abnormen mRNA [Orkin et al., 1982 a].

1.1.2.1. Ontogenese des Hämoglobins

Die embryonalen Hämoglobine werden in der 3.- 8. Schwangerschaftswoche im Dottersack produziert. Um die 8. Woche übernimmt die Leber die Produktion des HbF. Gegen Mitte der Schwangerschaft löst die Milz und dann das Knochenmark die Leber ab und gewährleisten die Bildung der Blutzellen. Ab der 6. Woche nach der Geburt ist das Knochenmark das einzig normale Gewebe der Blutzellenbildung. HbA wird in kleinen Mengen schon sehr früh in der Entwicklung gebildet, so daß es in der 6. SSW 7 % des gesamten Hb ausmacht. Allmählich steigt dann die HbA-Synthese bis zur Geburt an, bis es zu einem plötzlichen Umschalten der bis dahin dominierenden HbF- zur HbA-Synthese kommt. Die Umschaltung von HbF auf HbA ist jedoch erst nach dem 6. Lebensmonat abgeschlossen, der HbF-Spiegel fällt exponentiell, im Alter von 4 Jahren liegt er normalerweise unter 1 %.

Abbildung 1 zeigt das Auftreten der verschiedenen Polypeptidketten während der Ontogenese.

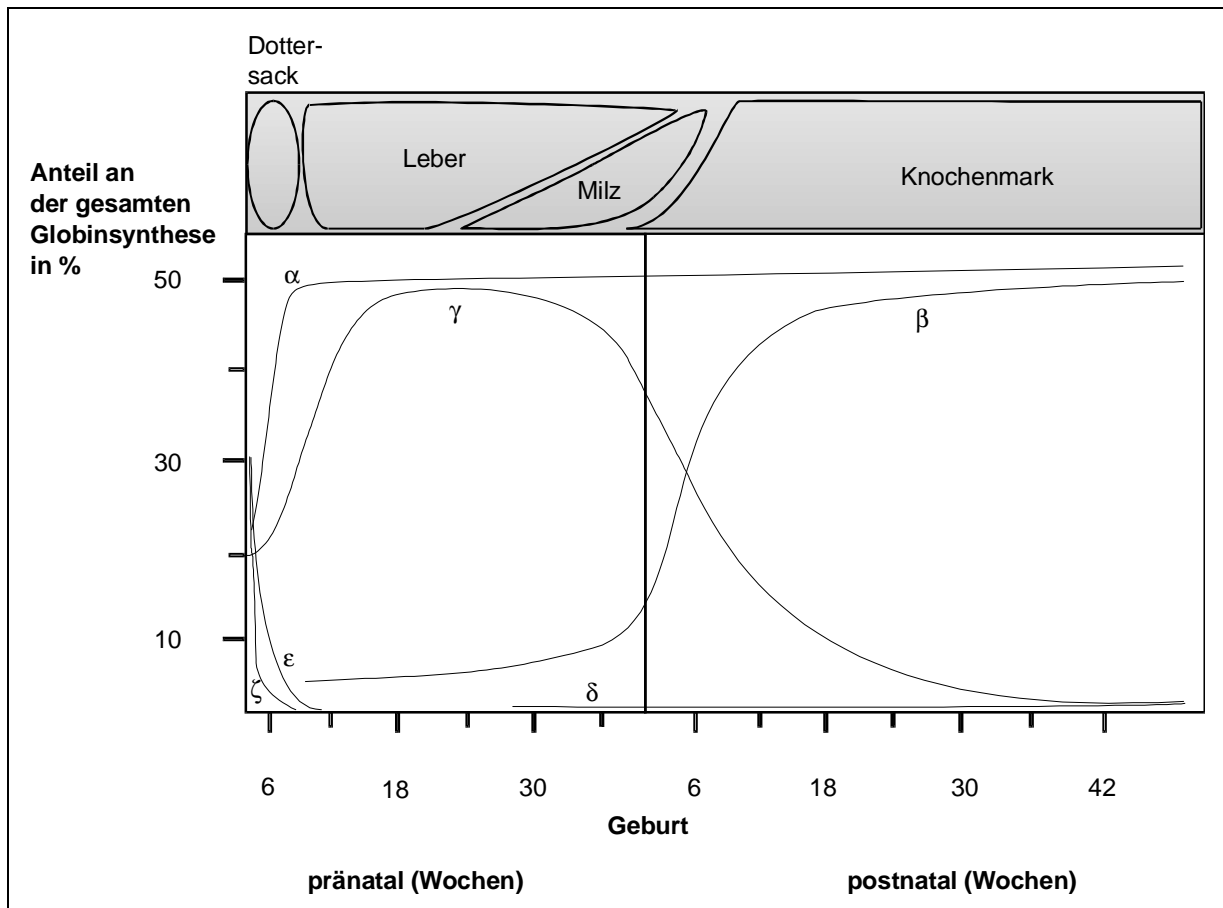


Abb. 1: Die Präsenz verschiedener Polypeptidketten während der Ontogenese, modifiziert nach Weatherall & Clegg, 1981.

1.1.2.2. Molekulare Anatomie und Physiologie des β -Globingen-Komplexes

Die Globingene werden in zwei Gruppen unterteilt: die α -Globingene liegen auf Chromosom 16 und umfassen einen Genkomplex von 50 kb, während die β -Globingene in einer 60 kb Region auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 liegen. Das β -Globingen selbst ist nur ein Teil des 60 kb Genkomplexes und liegt mit dem embryonalen ϵ -, den fetalen γ -Globingen und dem adulten δ -Globin in folgender Anordnung: 5' - ϵ γ^G γ^A Ψ β δ β - 3'. Dabei sind die fünf funktionellen Gene in der Reihenfolge angeordnet, in welcher sie während der Ontogenese exprimiert werden.

Das β -Globingen ist mit 1,6 kb ein kleines Gen. Die kodierende Information findet sich auf drei Exonen, die durch 2 Introns getrennt sind. Die Funktion der Introns ist im wesentlichen unbekannt. Der „Kopf“ und der „Schwanz“ des ersten und dritten Exons bestehen aus nichttranslatierten Sequenzen, die aus diesem Grund den Namen 5'UTR (*untranslated region*) und 3'UTR tragen [Bunn & Forget, 1986]. Die 5'UTR umfaßt 50 bp und die 3'UTR 131 bp.

Der unmittelbar 5' vom Transkriptionsbeginn (CAP-Stelle) liegende Promotor reguliert die Genaktivität. Dieser Globingen-Promotor beinhaltet 4 wichtige Sequenzelemente, die essentiell für die Induktion der Transkription und deren Effizienz sind. Das der CAP-Stelle am nächsten liegende Element (26-31 bp *upstream*) ist die sogenannte TATA-Box, eine AT-reiche Sequenz, die die Stelle der Transkriptionsinitiation determiniert. Weiter 5' finden sich die konservierte CAAT-Box (72-76 bp *upstream* vom CAP) und zwei

CACCC-Boxen (86-90 bp und 101-105 bp *upstream* vom CAP), welche die Effizienz der Transkription erhöhen, indem sie der Bindung ubiquitärer und erythroid spezifischer Transkriptionsfaktoren dienen [Ikuta et al., 1996]. Zusätzlich gibt es 5' vom ϵ -Globingen eine Region, die man als Lokus-Kontroll-Region (LCR) bezeichnet. Die β -LCR ist charakterisiert durch eine Reihe DNase I-hypersensitiver Stellen, HS1, 2, 3 und 4, verteilt über ca. 15 kb *upstream* des ϵ -Globingens. Ihre funktionelle Bedeutung wurde deutlich, als es mit ihrer Hilfe gelang, die Expression des menschlichen β -Globingens gewebespezifisch und zum richtigen ontogenetischen Zeitpunkt in transgenen Mäusen zu induzieren. In Abwesenheit der β -LCR wurde das menschliche β -Globingen in vermindertem Maße exprimiert [Grosveld et al., 1987]. Zusätzlich stellte man fest, daß die Bindung spezifischer Proteine notwendig für die Funktion dieser Regionen sind [Ikuta & Kan, 1991]. Nach neuesten Erkenntnissen favorisiert man folgendes Modell: ein chromosomales *looping* ermöglicht die physische Interaktion der β -LCR mit dem Globingen-Promotor und erlaubt dadurch die Expression der *downstream* gelegenen Gene [Orkin, 1995]. Die LCR ist unerlässlich für die Aktivierung des β -Globingens und spielt gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der spezifischen Expression der einzelnen β -Globingene während der Entwicklung [Ikuta et al., 1996].

Die Genexpression umfaßt mehrere Schritte, wobei der erste die Transkription der DNA in die Vorläufer-RNA (pre-RNA) beinhaltet. Dazu ist die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an den Promotor und die LCR notwendig. Liegt das Transkript vor, wird sein 5'-Ende modifiziert, d.h. ein methyliertes Guanodin (CAP) angefügt. Ebenfalls wird das 3'-Ende über das Anfügen einer Reihe von Adenosin-Resten (Poly-A Schwanz) verändert. Dieser Vorgang wird durch ein sogenanntes Poly-A-Signal gesteuert, welches circa 25 bp 5' vor der Transkriptionstermination lokalisiert ist.

Im Anschluß werden die noch enthaltenen Introns der pre-mRNA herausgeschnitten. Dieser aktive Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und läßt eine reife mRNA entstehen, deren einzelne Exone zusammengefügt vorliegen. Der beschriebene Mechanismus erfordert Signalsequenzen an der 5'(Donor) und 3'(Akzeptor) Exon/Intron Grenze sowie innerhalb des Introns. Diese Sequenzen werden als Konsensussequenzen bezeichnet, da sie im Laufe der Evolution konserviert wurden. Der Konsensus an der **Donor-Spleißstelle** umfaßt 9 Nukleotide, 3 im Exon und 6 im Intron. Position 1 und 2 im Intron werden dabei meist durch ein **GT** gebildet (*splice junction*), die anderen Nukleotide sind weniger stringent konserviert und dadurch variabler. Der Konsensus der **Akzeptor-Spleißstelle** weist regelmäßig ein **AG** Dinukleotid am 3'-Ende des Introns auf und ein weniger stringent konserviertes Pyrimidin an Position -3 [Mount et al., 1982]. Der Spleißvorgang wird durch ein Ribonukleoprotein-Komplex, das Spleißosom vermittelt [Lewis, 1994]. Die reife mRNA wird ins Zytoplasma transportiert, um dort in Protein translatiert zu werden.

1.1.2.3. Molekulare Pathologie

Die meisten Formen der β -Thalassämie sind Punktmutationen des β -Globingens. Deletionen dahingegen sind selten, spielen jedoch klinisch eine Rolle, wenn sie zur hereditären, postnatal persistierenden HbF-Synthese (HPFH) führen. Es sind mehr als 180 verschiedene Mutationen bekannt, die eine β -Thalassämie hervorrufen [Baysal & Carver, 1995]. Dabei kann die Expression des β -Globingens auf jedem Schritt des Weges von der DNA zum Protein gestört werden: (s. auch Tab. 2)

DNA-Ebene

Bei ganz oder teilweise deletiertem β -Globingens fehlt den betroffenen Chromosomen die genetische Information zur Synthese des β -Globins. Das klinische Bild ist abhängig von der Aktivität der γ -Globingene und der damit verbundenen HbF-Synthese. Kleine Deletionen erhöhen die HbF-Produktion nur in geringem Maße oder gar nicht und bewirken im homozygoten Zustand ein schwer verlaufendes Krankheitsbild. Im Gegensatz dazu verursachen größere Deletionen eine HPFH und somit einen mildereren Phänotyp [Bunn & Forget, 1986].

Transkriptionsebene

Um eine effiziente Bindung der Transkriptionsfaktoren zu gewährleisten ist ein intakter Promotor Voraussetzung. Dementsprechend vermindern Punktmutationen wichtiger Promotorsequenzen die Transkriptionseffizienz; sind z. B. die TATA- oder CACCC-Boxen betroffen, beträgt die Restaktivität des Gens noch 20-50 % [Orkin et al., 1984; Antonarakis et al., 1984; Kulozik et al., 1991a]. Diese verbleibende hohe Aktivität läßt einen relativ milden Phänotyp zu (β^{++} -Thal., dabei stellt das $^{+}$ ein Maß der Restaktivität dar), so daß homozygot betroffene Patienten nicht regelmäßig transfundiert werden müssen.

Zusätzlich gibt es Deletionen der HS2-4 der LCR, die das β -Globingens vollständig inaktivieren, obwohl es strukturell unangetastet bleibt [Vanin et al., 1983; Curtin & Kan, 1988; Driscoll et al., 1989]. Eine isolierte Deletion der HS1 wirkt sich dagegen funktionell nicht aus [Kulozik et al., 1991b].

Ebene der RNA-Verarbeitung

Mutationen der CAP-Stelle oder des Poly A-Signals beeinträchtigen die RNA-Stabilität, die Effizienz der weiteren RNA-Verarbeitung und die Proteinsynthese. So verursacht eine A \rightarrow C-Mutation des CAPs einen milden Phänotyp, denn die Restaktivität des Gens beträgt 50 % [Myers et al., 1986; Wong et al., 1987]. Im anderen Fall weisen Mutationen des Poly A-Signals eine verbleibende Aktivität von nur 10-20 % auf [Orkin et al., 1985].

Ein anderer Mutationstyp stört den Vorgang des Spleißens, indem eine Änderung der physiologischen Konsensussequenzen erfolgt. Sind die hochkonservierten GT/AG-Nukleotide betroffen, kann keine normale RNA-Reifung stattfinden. Das Gen ist vollständig inaktiviert und somit funktionslos, eine β° -Thalassämie resultiert [Treisman et al., 1983]. Homozygot betroffene Patienten erleiden eine schwere, transfusionsbedürftige Thalassaemia major. Sind jedoch die weniger stringent konservierten Konsensussequenzen verändert, trifft man auf eine β^{+} - oder β^{++} -Thalassämie [Wainscoat et al., 1983 a; Lapoumeroulie et al., 1986]. Beispiele hierfür sind die G \rightarrow A-Mutation an Position 5 (IVS1-5 G \rightarrow A) und die T \rightarrow C-Mutation an Position 6 des ersten Introns (IVS1-6 T \rightarrow C). Im Gegensatz dazu bewirken die G \rightarrow T- und G \rightarrow C-Mutationen an Position 5 des ersten Introns (IVS1-5) eine Restaktivität von weniger als 5 %, was sich klinisch in einer schweren Form der Thalassämie niederschlägt, ein Beispiel für die unterschiedliche Relevanz der genannten Mutationen [Treisman et al., 1983; Kazazian et al., 1984; Atweh et al., 1987].

Bei einem weiteren Mutationstyp entstehen pathologische Konsensussequenzen, die eine abnorme RNA-Verarbeitung zur Folge haben. Hierzu zählen die G \rightarrow A-Mutation an Position 110 des ersten Introns (IVS1-

110 G → A) und die C → G-Mutation an Position 745 des zweiten Introns (IVS2-745 C → G). Erstgenannter Basenaustausch verändert die normale TTGG-Sequenz zu TTAG, die identisch mit der physiologischen Spleißakzeptorstelle 20 bp weiter 3' ist. Infolgedessen werden 90 % der pre-RNA an diesem kryptischen Spleißsignal falsch gespleißt. Die Restaktivität des Gens macht sich im Vergleich zu einer β^0 -Thalassämie (keine Restaktivität des β -Globingens) klinisch kaum bemerkbar, homozygote Patienten sind regelmäßig transfusionsbedürftig [Spritz et al., 1981; Westaway & Williamson, 1981]. Analog verhält es sich mit der IVS2-745 C → G-Mutation, die eine pathologische Spleiß-Donorsequenz entstehen läßt [Treismann et al., 1983].

Vergleichbare Mutationen sind auch in den Protein-kodierenden Bereichen zu finden, erwähnenswert sind das HbE und das Hb-Knossos, die außer der Veränderung der Aminosäuresequenz des β -Globingens noch eine Aktivierung verborgener Spleißsignale zur Konsequenz haben [Orkin et al., 1982 a; Bunn & Forget, 1986].

Translationsebene

Dem physiologischen Ablauf entsprechend wird die Nukleotidsequenz in Protein translatiert. Dabei signalisieren die Kodons UAA, UAG und UGA das Ende der Proteinsynthese, sie fungieren als Stopkodons. Pathologische Stopkodons entstehen durch Basensubstitutionen oder durch Deletionen bzw. Insertionen, die das normale Leseraster verschieben. Erstere bezeichnet man als *Nonsense*-Mutationen und letztere als *Frameshift*-Mutationen; beide setzen das Gen vollständig außer Kraft (β^0 -Thalassämie).

Posttranslationale Ebene

Ein Teil der Mutationen, die die Aminosäuresequenz ändern (*Missense*-Mutationen), verursachen den vorzeitigen Abbau der β -Globinketten im Knochenmark, da diese eine starke Instabilität aufweisen [Kazazian & Boehm, 1988]. Andere Mutationen führen zur Synthese instabiler Ketten, die nicht vorzeitig abgebaut werden, sondern in den Erythrozyten ausfallen und so eine Innenkörper- β -Thalassämie hervorrufen. Diese seltene Form der β -Thalassämie folgt dem autosomal dominanten Erbgang [Thein et al., 1990].

Die klinische Variabilität der homozygoten β -Thalassämie erklärt sich einerseits durch die verschiedenen Mutationen, die ihrerseits die Genexpression unterschiedlich stark beeinflussen. Dadurch entsteht ein breites Spektrum an β -Globingen Restaktivitäten.

Andererseits spielen auch Veränderungen der α - oder γ -Globingenexpression eine entscheidende Rolle für die klinische Variabilität der homozygoten β -Thalassämie. So kann der für die homozygote β -Thalassämie pathogenetisch entscheidende Überschuß an α -Ketten durch eine α -Thalassämie, bei der 2 der 4 α -Gene inaktiviert sind, so vermindert werden, daß eine *Thalassaemia intermedia* entsteht. Im umgekehrten Fall jedoch kann aus einer asymptomatischen heterozygoten β -Thalassämie ein schwereres Krankheitsbild entstehen, wenn überschüssige α -Globingene vererbt werden [Wainscoat et al., 1983 b; Kanavakis et al., 1982; Thein et al., 1984].

Einen ebenfalls günstigen Effekt auf den Verlauf einer homozygoten β -Thalassämie hat die zusätzliche genetisch bedingte Bildung von γ -Globinketten, wie im Falle der HPFH (*Hereditäre Persistenz fetalen*

Hämoglobins). Bei dieser Konstellation können sich die überschüssigen α -Globinketten mit den vermehrt produzierten γ -Ketten zu HbF verbinden (s. auch Übersicht S. 14) [Wood et al., 1977; Giglioni et al., 1984; Kulozik et al., 1988].

Das Verständnis der molekularen Pathologie der β -Thalassämie ist für den Kliniker von besonderem Interesse, da es als praktische Konsequenz die Möglichkeit einer spezifischen Diagnostik, einschließlich der pränatalen Krankheitserkennung, und nicht zuletzt eine prognostische Abschätzung der Erkrankung ermöglicht [Kulozik, 1991c].

Ebene der Genexpression	Mutationstyp	Beispiele	Phänotyp
DNA Transkription	Deletion	619 bp	β°
	Promotormutation	-28 A \rightarrow C -87 C \rightarrow G	β^{++} β^{++}
RNA-Verarbeitung Capping Spleißen	Deletion der HS2-4		β°
	Mutation der CAP-Stelle	ACA \rightarrow CCA	β^{++}
	Mutation der <i>splice junction</i>	IVS1-1 G \rightarrow A	β°
	Mutation der weniger stringenten Konsensussequenzen	IVS1-5 G \rightarrow A IVS1-6 T \rightarrow C	β^{++} β^{++}
	Aktivierung verborgener Spleißsignale	IVS1-110 G \rightarrow A IVS2-745 C \rightarrow G	β^+ β^+
Polyadenylierung Translation	Mutation des Poly A-Signals	Codon 26 GAG \rightarrow AAG AATAAA \rightarrow AATGAA	β^+ /HbE β^+
	<i>Frameshift</i> -Mutationen	FS 8 AAG \rightarrow --G	β°
	<i>Nonsense</i> -Mutationen	NS 39 CAG \rightarrow TAG	β°
Gen-Produkt	Initiations-Kodon-Mutationen instabile β -Ketten	ATG \rightarrow ATA Hb ^{Terre Haute}	β° β^+ , autosomal dominant vererbte β -Thal.

Tab. 2: Durch β -Thalassämiemutationen gestörte Schritte der Genexpression, modifiziert nach Kulozik, 1991c.

1.1.3. Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie der β -Thalassämie

1.1.3.1. Pathophysiologie der β -Thalassämie

Die β -Thalassämie ist durch eine verminderte Bildung von β -Globinketten geprägt (Abb. 2). Zunächst ergibt sich aus dem mangelnden Angebot an β -Ketten eine gestörte Hämoglobinisierung der Erythrozyten, was sich als mikrozytäre, hypochrome Anämie bemerkbar macht. Pathophysiologisch besonders wirksam erweist sich jedoch der Überschuss an freien α -Ketten. Diese Ketten haben die Eigenschaft, schlecht wasserlöslich zu sein und somit schon in den erythroiden Vorläuferzellen des Knochenmarks zu präzipitieren. Sie schädigen die Zellmembran, bedingen einen vorzeitigen Untergang dieser Zellen und bewirken letztendlich eine ineffektive Erythropoese mit meist transfusionsbedürftiger Anämie. Die Anämie ihrerseits führt zu einer Erythropoetin-vermittelten Hyperplasie des Knochenmarks und damit verbundenen Skelettdeformitäten (sog. Facies thalassaemica), sowie zum gesteigerten Folat- und Energiebedarf. Die häufigen Transfusionen und die erhöhte

intestinale Eisenresorption lassen eine Häm siderose entstehen, in deren Folge Kardiomyopathie, Leberfibrose und multiple endokrine Ausfälle auftreten [Kulozik, 1994 a].

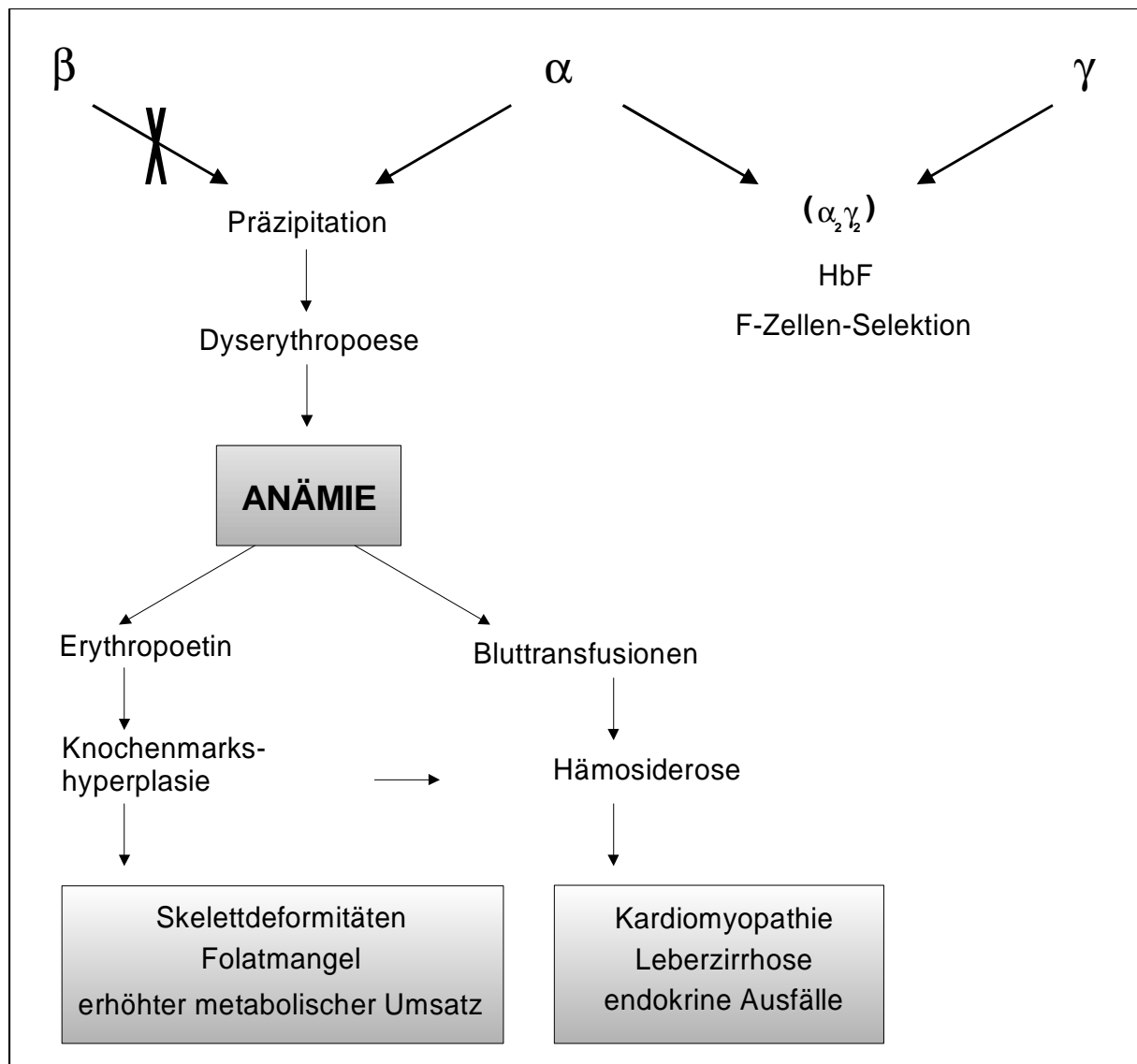


Abb. 2: Schematische Darstellung der Pathogenese der β -Thalassämie, modifiziert nach Kulozik, 1991c.

1.1.3.2. Klinisches Bild

Die β -Thalassämie ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung; heterozygote Überträger sind klinisch gesund. Im Blutbild fällt jedoch eine ausgeprägte Mikrozytose und Hypochromie der Erythrozyten auf, ohne oder mit geringer Anämie. Bei der heterozygoten β -Thalassämie spricht man von der **Thalassaemia minor**, eine der wichtigen Differentialdiagnosen des Eisenmangels und anderer Ursachen der Hypochromie. Die Diagnose ist durch das obligat erhöhte HbA₂ bei heterozygoten Probanden einfach zu stellen. Das erhöhte HbA₂ erklärt sich folgendermaßen: Normalerweise besitzen die δ - im Vergleich zu den β -Globinketten eine geringere Affinität zu den α -Globinketten. Liegt jedoch eine β -Thalassämie vor, sind weniger β -Globinketten verfügbar und das Angebot an freien α -Ketten steigt. Die Bildung des HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$) verschiebt sich zugunsten der Bildung von HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). Eine Erhöhung des HbF ist im Falle der heterozygoten β -Thalassämie nicht obligat.

Die Mikrozytose ist das Resultat des Überschusses an präzipitierenden α -Globinketten, die das erythrozytäre Zytoskelett oxidativ schädigen.

Ein weiteres typisches hämatologisches Kriterium im Vergleich zur Eisenmangelanämie ist die Erythrozytose bei nur gering erniedrigter Hämoglobinkonzentration. Wichtige morphologische Hinweise auf das Vorliegen einer heterozygoten β -Thalassämie sind eine Anisozytose, eine ganz geringe Poikilozytose sowie eine Hypochromasie und eine basophile Tüpfelung [Galanello et al., 1981; Joishy et al., 1986; Kutlar et al., 1990].

In manchen Fällen der heterozygoten β -Thalassämie kann es zur stärkeren Ausbildung der Erkrankung kommen, wie sich anhand der Pathophysiologie bzw. dem α -Globinkettenüberschuß leicht herleiten läßt. Solche Patienten besitzen fünf oder sechs statt der normalen vier α -Globingene, die den schon vorhandenen α -Ketten- Überschuß noch verstärken [Galanello et al., 1983; Sampietro et al., 1983; Kulozik et al., 1987].

Homozygote Patienten der β -Thalassämie bilden eine **Thalassaemia major** aus. Dieser Phänotyp ist von einer lebenslang transfusionsbedürftigen Anämie geprägt, die unbehandelt schon im frühen Kindesalter zum Tode führt. Jedoch kann die homozygote Form den milderen Typ der **Thalassaemia intermedia** ausbilden, wenn der α -Globinkettenüberschuß weniger ausgeprägt ist. Diese Patienten haben den Vorteil, nicht dem Zwang einer regelmäßigen Transfusion zu unterliegen, in besonders günstigen Fällen kann auf Transfusionen ganz verzichtet werden. Die Pathogenese der Thalassaemia intermedia kann der nachfolgenden Übersicht entnommen werden [Kulozik, 1994 a].

Pathogenese der Thalassaemia intermedia bei

a) homozygoter β -Thalassämie

Thalassämie Mutationen mit einer hohen Restaktivität des β -Globingens

HPFH-Mutationen

α -Thalassämie Mutationen

b) heterozygoter β -Thalassämie

triplizierte α -Globingene

autosomal vererbte β -Thalassämie

instabile β -Globinketten

1.1.3.3. Diagnostik

Die Diagnose einer Thalassaemia major wird meist im 1. Lebensjahr gestellt. Gedeihstörungen, zunehmende Blässe, Infektneigung und eine Auftreibung des Abdomens infolge der Hepatosplenomegalie sind die ersten Symptome. Entscheidendes klinisches Kriterium für die Definition der Thalassaemia major ist die permanente Transfusionsabhängigkeit.

Das Blutbild zeigt eine schwere Anämie mit Anisozytose und Poikilozytose, Targetzellen und Erythroblasten treten in Erscheinung. Gesichert wird die Diagnose durch das erhöhte HbF in der Hämoglobinanalyse. In Tab. 3 sind die hämatologisch wichtigen Daten der heterozygoten und homozygoten Thalassämie zusammengefaßt.

Kriterien	Referenzwerte	heterozygote β -Thal.	homozygote β -Thal.	
Hb	w: 12-15 g/dl m: 14-18 g/dl	7,5-10 mmol/l 9,0-11 mmol/l	~10g/dl ~ 6 mmol/l	< 8g/dl < 5 mmol/l
MCV	80-96 fl		60-70 fl	
MCH	28-33 pg	1,8-2,0 fmol	20-25 pg	↓
MCHC	31-37 g/dl	4,8-5,8 mmol/l		↓
HbA ₁ ($\alpha_2\beta_2$)	97 %			0 oder ↓↓↓
HbA ₂ ($\alpha_2\beta_2$)	2,50 %		3,5-6,0 %	normal oder ↑
HbF ($\alpha_2\gamma_2$)	0,50 %		< 1-(5) %	↑↑

Tab. 3: Hämatologische Daten zur Diagnosesicherung, modifiziert nach Galanello et al., 1981.

Von großer Bedeutung für die genetische Beratung und die Pränataldiagnostik ist die Identifikation der Thalassämie Mutationen und die damit verbundene Familienuntersuchung [Kulozik, 1994 a]. Durch genaue Kenntnis der molekularen Basis des genetischen Defekts lassen sich individuelle Prognosen abschätzen, die der großen klinischen Variabilität Rechnung tragen.

1.1.3.4. Therapie

1.1.3.4.1. Konventionelle Behandlungsverfahren

Die β -Thalassämie ist eine chronische Erkrankung, deren Behandlung zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Überleben bis in die vierte Lebensdekade hinein gewährleisten kann [Piomelli, 1993]. Große Studien ergaben jedoch, daß nur 60-70 % der Patienten das 20. Lebensjahr erreichen, lediglich 40 % davon ohne wesentliche Komplikationen [Gabutti et al., 1989; Ehlers et al., 1991]. Die Therapie der Thalassaemia major hat sich über einen Zeitraum von mehr als 30 Jahren entwickelt und zu einer wesentlichen Verbesserung der Lebenserwartung und -qualität beigetragen. Die Therapie stützt sich auf folgende Pfeiler: Transfusionen, Therapie mit Chelatbildnern, Splenektomie und Knochenmarktransplantation.

Für die Standardtherapie steht dem Patienten ein Protokoll zur Verfügung, bestehend aus einer täglichen Gabe von Chelatbildnern und einer in regelmäßigen Abständen durchgeführten Erythrozytensubstitution. Nicht weniger bedeutsam ist die umfassende Überwachungsdiagnostik zur Kontrolle der positiven und negativen Effekte der Therapie (Hämosiderose, Hepatitis oder HIV-Infektion nach Transfusion bzw. Infektionen nach Splenektomie) [Gabutti et al., 1989].

Transfusion

Die Thalassaemia major wird seit Beginn der 60iger Jahre durch Bluttransfusionen behandelt, mit dem Ziel, die endogene Erythropoese zu supprimieren und die Anämie komplett zu korrigieren. Die Bluttransfusionen sollten schon in früher Kindheit zur Anwendung kommen, um Knochenmißbildungen vorzubeugen. Den betroffenen Kindern wird so ein normales Wachstum ermöglicht und die Facies thalassaemica erspart. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß der Hämoglobinwert beständig bei 10,5 g/dl liegt [Rebulla & Modell, 1991]. In praxi müssen die Patienten aller 3-4 Wochen transfundiert werden [Piomelli, 1993].

Therapie mit Chelatbildnern

Die Nebenwirkungen der Transfusionen bestehen in der Ausbildung einer Häm siderose, die nach ersten Versuchen 1962 heute mit Deferoxamin (DFO) behandelt wird. Normalerweise liegt der Gesamteisengehalt des Menschen bei 4 g. Die intestinale Resorption reguliert dieses Gleichgewicht, indem nur soviel Eisen resorbiert wird, wie notwendig ist. Durch die Transfusionsbehandlung wird der intestinale Resorptionsblock umgangen, die Eisenüberladung ist vorprogrammiert. Bei einem durchschnittlichen Transfusionsbedarf von 200 ml Erythrozytenkonzentrat pro Jahr und kg Körpergewicht werden einem 30 kg schweren Patienten jedes Jahr 6 g Eisen, also das 1,5 fache des normalen Gesamtkörper Eisens zugeführt [Kulozik, 1994 a]. Erschwerend kommt hinzu, daß der menschliche Organismus über keinen Mechanismus der Eisenelimination verfügt. Die Organschäden betreffen in erster Linie das Herz, die Leber und die endokrinen Organe [Aldouri et al., 1990; Vullo et al., 1990]. Häufig kommt es zur Entwicklung eines Diabetes [De Sanctis et al., 1988].

Zur Vermeidung der Häm siderose wird das derzeit einzig zugelassene Medikament Deferoxamin verabreicht, das als eisenbeladenes Feroxamin ausgeschieden wird. Das Pharmakon ist nur als Dauerinfusion oder nach subkutaner Injektion wirksam, was eine hohe Kooperationsbereitschaft des Patienten und der Familie erfordert. Die Liste der Nebenwirkungen ist lang: Innenohrschwerhörigkeit, Katarakte, Visuseinschränkung, Knochen- und Gelenkschmerzen, Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit [Kulozik, 1994 a].

Splenektomie

Ein Großteil der Patienten leiden an einem Hypersplenismus, der mit einem gesteigerten Transfusionsbedarf (200 ml Erythrozyten/ kg KG und Jahr) assoziiert ist. Ursachen der Milzvergrößerung sind einerseits die extramedulläre Blutbildung und die Aktivierung des RES infolge der Stimulation durch chronische Hämolyse, rezidivierende Infektionen und Phagozytose präzipitierter α -Globinketten. Andererseits ist die Speicherung großer Erythrozytenmengen für die Splenomegalie verantwortlich. Nach Splenektomie sinkt der Bedarf an Erythrozytenkonzentraten auf 150-160 ml [Piomelli, 1993]. Ziel des Eingriffs ist die Reduktion der zugeführten Eisenmenge.

Der Langzeiteffekt einer Milzentfernung ist abhängig von der präoperativen Ausgangssituation jedes einzelnen Patienten. Eine retrospektive Studie von 30 splenektomierten Patienten ergab, daß Patienten mit einer Thalassaemia major, die vor dem Eingriff monatlich, nach der Splenektomie nur noch 5-8mal im Jahr transfundiert werden mußten. Leider blieb dieser positive Effekt nur für einen limitierten Zeitraum von 1-2 Jahren bestehen. Demgegenüber konnte bei Patienten mit einer Thalassaemia intermedia (0-4 Transfusionen pro Jahr) ein kontinuierlich verminderter Transfusionsbedarf assoziiert mit einer Erhöhung des Hämoglobinniveaus um 2-3 g/dl erreicht werden [Engelhard et al., 1975].

Knochenmarkstransplantation (KMT)

Die erste und erfolgreiche allogene KMT wurde 1981 in Seattle an einem 15 Monate alten Jungen durchgeführt. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte es noch keine kurative Behandlung der β -Thalassämie gegeben. Im gleichen Jahr wurde in Pesaro ein klinisches Programm für die KMT gestartet [Apperley, 1993]. Die Ergebnisse von 546 Transplantationen an Thalassämie erkrankten Patienten, davon 528 von Geschwistern mit identischem HLA-Genotyp und 18 von Eltern mit identischem HLA-Phänotyp, liegen jetzt vor. Dabei handelt

es sich in erster Linie um Transplantationen an Patienten unter 16 Jahren, die in drei Risikoklassen unterteilt wurden. Die Einteilung basierte auf folgenden Kriterien: vorliegende Hepatomegalie und/oder Leberfibrose, Qualität der Chelatbehandlung vor der Transplantation. Klasse-I-Patienten wiesen keine dieser Kriterien auf, Klasse-II-Patienten wiesen einen oder zwei der Risikofaktoren auf und Klasse-III-Patienten zeigten sowohl eine Hepatomegalie und Leberfibrose als auch eine schlecht geführte Therapie mit Eisenchelatabbildnern. Patienten, die älter als 16 Jahre waren, wurden der Klasse III zugeordnet. Tab. 4 faßt die Ergebnisse in Pesaro zusammen [Giardini et al., 1995 a].

	Klasse I	Klasse II	Klasse III		KMT bei Erwachsenen
Anzahl (n)	64	188	55 ¹	47 ²	58
Zeitraum	1985-1992	1985-1992	1983-1989	1989-1992	ab 1992
Überlebende (%)	95	86	55	87	78
Abstoßung des Transplantats (%)	5	6	9	29	4
Mortalität, nicht durch Abstoßung hervorgerufen (%)	5	12	42	11	22

Tab. 4: Ergebnisse des Zentrums für KMT; Pesaro, Italien [Giardini et al., 1995]. (¹ retrospektive Zuordnung zur Klasse III, ² prospektive Zuordnung zur Klasse III)

Obwohl die KMT die normale Hämatopoese wiederherzustellen vermag und die Patienten von regelmäßigen Transfusionen entbindet, verbleibt die Eisenüberladung für Jahre nach der KMT nachweisbar an einem permanent hohen Serumferritingehalt und histologisch gesicherten Eisenablagerungen in der Leber. Dies gilt in erster Linie für Patienten der Klasse III und teilweise für Klasse-II-Patienten, hervorgerufen durch ihre schlechte Ausgangslage hinsichtlich der Hämosiderose vor der KMT. Demgegenüber ist die Eisenüberladung in Klasse-I-Patienten nach erfolgreicher Transplantation nicht fortschreitend und die Menge des gespeicherten Eisens im Gewebe sinkt [Lucarelli et al., 1992; 1993]. Aus diesen Daten geht hervor, daß bei entsprechenden Patienten eine Eisendepletion fortgeführt werden muß. Neben der Therapie mit DFO kann die Phlebotomie eingesetzt werden, wenn die Blutwerte das erlauben und die Patienten diese Behandlung tolerieren. Ziel der Therapien ist der Stop des chronisch-entzündlichen Prozesses in der Leber und die Verhinderung einer Leberfibrose [Angelucci et al., 1993; Giardini et al., 1995 b].

Ungeachtet der großen Erfolge der KMT bleibt die konventionelle Therapie weiterhin ein wichtiger Baustein im Behandlungsregime der β -Thalassämie, denn ca. 60 % der Kinder haben keinen HLA-identischen Spender zur Verfügung [Apperley, 1993].

1.1.3.4.2. Neue Strategien der Therapie: Supportiv und kurativ.

Die Erprobung neuer Pharmaka zur Erhöhung des totalen Hb bzw. des HbF erfolgt mit dem Ziel, die Zahl der

Transfusionen zu verringern oder diese vollständig zu ersetzen. Getestet wurden unter anderem Erythropoetin, Hydroxyurea, Butyrate und Kombinationen dieser Agenzien [Rund & Rachmilewitz, 1995]. Besonders hoffnungsvoll erschienen Butyratderivate, welche in der Lage sind, die fetale Globinkettensynthese in vivo zu stimulieren. Gegenüber dem Butyrat haben sie den Vorteil, oral verfügbar zu sein und eine längere Plasmahalbwertszeit zu besitzen [Perrine et al., 1994; Collins et al., 1995]. Doch die klinischen Ergebnisse waren enttäuschend, da nur ein kleiner Teil der Patienten mit einer geringen Steigerung des HbF reagierte und transfusionsabhängige Patienten gar nicht auf die Therapie ansprachen [Collins et al., 1995; Sher et al., 1995].

Die Therapie mit oralen Chelatbildnern ist ein weiterer Weg zur Verbesserung der Lebensqualität, da sie die Infusionen ersetzen. Hoffnungsvolle Träger dieser Therapie (z. B. L₁ 1,2 Dimethyl-3-Hydroxypyrid-4-eins) müssen jedoch derzeit als ineffektiv und/oder sehr toxisch eingestuft werden; da Agranulozytose, Thrombozytopenie und Lupus erythematoses als schwere Nebenwirkungen beschrieben wurden [Hoffbrand et al., 1989; Bartlett et al., 1990; Mehta et al., 1991].

Wie schon erwähnt, hat nur ein kleiner Teil der Patienten einen HLA-kompatiblen Spender zur Verfügung. Aus diesem Grund müssen neue Wege gefunden werden, um alternative Quellen hämatopoetischer Stammzellen nutzbar zu machen. Zwei dieser neuen Quellen sind das Nabelschnurblut und die fetale Leber. Das Nabelschnurblut ist reich an hämatopoetischen Stammzellen und hat der KMT gegenüber folgende Vorteile: die Gewinnung der Stammzellen ist einfacher, das Risiko für den Fetus hinsichtlich einer stattgehabten viralen Exposition und des Auftretens von Abstoßungsreaktionen (GvHD) ist geringer [Wagner et al., 1994]. Stammzellen aus der fetalen Leber können von Aborten des ersten Trimesters gewonnen werden. Von Nachteil ist, daß diese Stammzellen intrauterin über eine intraperitoneale Injektion in den Empfänger gelangen müssen und diese Technik einer hohen Mortalitätsrate unterliegt. Der rationale Hintergrund dieser Vorgehensweise ist die immunologische Inkompetenz des Fetus, so daß HLA-nicht-kompatible Spenderzellen genutzt werden könnten [Touraine et al., 1992]. Darüberhinaus sollten neben den rationalen und technischen auch die ethischen Fragen dieser komplizierten Methode erörtert werden.

Das Konzept der Zukunft zur kurativen Behandlung der β -Thalassämie ist die somatische Gentherapie. Dabei werden die Körperzellen, nicht aber die Keimzellen genetisch verändert, wodurch die genetische Identität des Organismus erhalten bleibt.

Eine effektive Gentherapie setzt einen sicheren, effizienten und stabilen Transfer eines funktionellen β -Globingens in menschliche hämatopoetische Stammzellen voraus. In einem transgenen Mausmodell konnte der Transfer eines exogenen Globingens das Tier "heilen" [Costantini et al., 1986]. So gab es frühe und erfolgversprechende Ergebnisse bei der Expression von humanen β -Globingenen im Mäuseknochenmark [Dzierzak et al., 1988]. Kompliziert gestaltete sich jedoch die quantitativ ausreichende Expression des exogenen Gens. Nach Identifikation der LCR war die Ursache der geringgradigen Expression gefunden, denn durch Einbringung dieser wichtigen Sequenz kam es zu einer gewebespezifischen und quantitativ fast physiologischen Expression [Grosveld et al., 1987]. Bis heute ist es jedoch ein ungelöstes Problem, daß retrovirale Vektoren mit einem LCR gekoppelten β -Globingen strukturell besonders instabil sind [Kulozik, 1994 b; Rund & Rachmilewitz, 1995]. Daraus ergibt sich die eigentliche Schwierigkeit, die in der Entwicklung des geeigneten Vektors liegt. Retroviren benötigen sich teilende Zellen, die menschlichen

Knochenmarksstammzellen jedoch, die Zielzellen des β -Globin Gentransfers, teilen sich nicht aktiv und sind zudem noch sehr selten (1 von 10^6 Knochenmarkzellen) [Rund & Rachmilewitz, 1995].

1.1.4. Geographische Verteilung der Erkrankung und populations-genetische Aspekte

Die β -Thalassämien gehören zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten weltweit. Ihr Vorkommen beschränkt sich nicht auf die Mittelmeerländer, sie sind auch in Westafrika und weiten Teilen Asiens stark vertreten. Etwa 150 Millionen Menschen (3 % der Weltbevölkerung) tragen ein β -Thalassämie-Gen [Weatherall & Clegg., 1981]. Nicht alle 180 Mutationen sind auch in allen ethnischen Gruppen anzutreffen. So macht die *Nonsense*-Mutation im Kodon 39 (NS 39 C \rightarrow T) allein in Sardinien etwa 95 % aller Thalassämie-Gene aus. Die Populationsgenetik ist in Tab. 5 zu sehen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in den meisten ethnischen Gruppen ca. 10 Mutationen 90 % aller Thalassämie-Gene repräsentieren. Dadurch erfährt das genetische Screening und die Pränataldiagnostik eine Erleichterung [Kulozik, 1991c].

Land	Anzahl der Mutationen, die > 90 % aller β -Thalassämie-Gene repräsentieren	häufigste Mutationen	%
Italien			
Sardinien	1	NS 39	95
Sizilien	3	NS 39	35
		IVS1-6 T \rightarrow C	29
Griechenland	7	IVS1-110 G \rightarrow A	42
		NS 39	17
Jugoslawien	10	IVS1-110 G \rightarrow A	45
		IVS1-6 T \rightarrow C	19
Bulgarien	10	IVS1-110 G \rightarrow A	24
		NS 39	22
Türkei	10	IVS1-110 G \rightarrow A	39
		IVS1-6 C \rightarrow T	18
Zypern	4	IVS1-110 G \rightarrow A	70
Libanon	6	IVS1-110 G \rightarrow A	62
Schwarzamerikaner	6	- 29 A \rightarrow G	55
Indien	6	IVS1-5 G \rightarrow C	22
		619 bp Deletion	22
Malaysien	8	IVS1-5 G \rightarrow C	49
Indonesien	8	IVS1-5 G \rightarrow C	44
Süd-China	5	FS 41/42	46
Spanien	3	NS 39	64
Portugal	4	NS 39	53

Tab. 5: Geographische Heterogenität der molekularen Anatomie der β -Thalassämie, modifiziert nach Kulozik, 1991c.

Zwangsläufig stellt sich die Frage, warum in manchen Gebieten die Genfrequenz der β -Thalassämie so hoch ist, in anderen dagegen nicht. Haldane hatte schon vor über 40 Jahren eine Theorie. Die Thalassämien schützen ihre Träger vor Malaria; somit ist die natürliche Selektion verantwortlich für die Steigerung der

Genfrequenz in den Endemiegebieten des *Plasmodium falciparum*. Dabei haben wiederum die heterozygoten Träger einen Selektionsvorteil, da die homozygot Betroffenen sterben, bevor sie das reproduktive Alter erreichen. Die Verteilung der β -Thalassämie koinzidiert mit dem Vorkommen der Malaria und die Genfrequenz korreliert mit dem endemischen Auftreten der Malaria [Flint et al., 1993].

Luzzi et al. [1991] stellten eine Hypothese auf, die die Resistenz der an Thalassämie Erkrankten gegenüber *Plasmodium falciparum* erklärt. Sie fanden heraus, daß *Plasmodium falciparum* infizierte α - und β -thalassämische Blutzellen über eine spezifische Exprimierung von Oberflächenantigenen in der Lage sind, größere Mengen Antikörper zu binden als normale Zellen. Die gesteigerte Immunantwort ermöglicht folglich eine schnellere und effizientere Beseitigung der infizierten Blutzellen.

1.1.5. Die β -Thalassämie in der deutschen Bevölkerung

Die erste Beobachtung einer Thalassaemia major bei einem deutschen Kind geht auf 1941 zurück. Das Kind zeigte typische Zeichen der Cooley Anämie, jedoch war derzeit eine Diagnosesicherung über die Bestimmung des HbF noch nicht möglich [Graser, 1941]. Über je einen weiteren Fall der Thalassaemia major bei einem deutschen Kind berichteten Flatz et al. 1964 und Teichgräber & Kleihauer 1969. Die molekulare Charakterisierung des homozygoten Falles von Flatz et al., erfolgte 1989 durch Eigel et al., die nach Sequenzierung des Gens eine G \rightarrow T-Transversion an Position 5 des ersten Introns erkannten. Aus dem beobachteten Auftreten der Thalassaemia major mit einer Häufigkeit von $1:4 \times 10^6$ errechneten Weicker und Hauke die Häufigkeit der Thalassaemia minor in der deutschen Bevölkerung mit etwa 1:1000 [Flatz et al., 1964].

Betke & Kleihauer [1962] führten von 1959-1962 Reihenuntersuchungen an der Universitätsklinik Tübingen durch, um zu quantifizieren, wie häufig Hämoglobinanomalien in Deutschland sind. In 384 eingesandten Blutproben deutscher Patienten mit einer unklaren Anämie wurden 35 Fälle einer Thalassaemia minor mit erhöhtem HbA₂ gefunden.

Kohne & Kleihauer [1974] führten im Zeitraum von 1963-1973 die Untersuchungen von Betke & Kleihauer systematisch fort. Sie berichteten über die Ergebnisse von 5763 Hämoglobinanalysen bei Patienten deutscher Herkunft. Dabei wurde der 4. Fall einer homozygoten β -Thalassämie entdeckt und weitere 497 heterozygote Fälle identifiziert. Mit dieser Veröffentlichung wurden frühere Vorstellungen korrigiert, nach denen anomale Hämoglobine und Thalassämien in Deutschland eine Rarität darstellten, mit denen der praktische Arzt bei der einheimischen Bevölkerung kaum zu rechnen habe.

Laig et al. publizierten 1990 eine molekulare Analyse der β -Thalassämie in der deutschen Bevölkerung. Sie untersuchten 40 Gene deutscher Heterozygoter, die keine verwandtschaftlichen Beziehungen aufwiesen. Es gelang, 26 Gene zu typisieren, die alle mediterrane Mutationen zeigten (20x NS 39, 3x IVS1-110, 2x IVS2-1, 1x IVS1-1 G \rightarrow A). 13 Proben konnten nicht charakterisiert werden. Die Ergebnisse unterstreichen die Annahme, daß die bei Deutschen gefundenen Mutationen ursprünglich aus dem Mittelmeerraum stammen und durch Migration in das Gebiet der heutigen Bundesrepublik Deutschland gelangten. So werden eingewanderte italienische Gastarbeiter, deren Zahl um 1900 70.000 auf 56 Millionen Deutsche [Meyers, 1904] betrug, als "Importeure der mediterranen β -Thalassämie-Gene" bezeichnet. In der Untersuchung konnten keine regionalen

Unterschiede im Verhältnis von mediterranen zu nicht identifizierten Mutationen nachgewiesen werden, weshalb die Hypothese, daß es durch römische Ansiedlungen zur Verbreitung des Thalassämie-Gens in der deutschen Bevölkerung kam, widerlegt zu sein scheint. Diese Schlußfolgerung wird durch die geringe Wahrscheinlichkeit des Überlebens eines Gens über 60-70 Generationen ohne Selektionsdruck unterstützt.

1.2. Problemstellung

In der Bundesrepublik Deutschland zählt die β -Thalassämie zu den seltenen Erkrankungen. Dennoch gibt es einzelne Berichte über das Vorkommen homozygoter Fälle in der einheimischen deutschen Bevölkerung (s. unter 1.1.5.). Wesentlich häufiger ist jedoch das Auftreten der heterozygoten β -Thalassämie, die als Differentialdiagnose der mikrozytären, hypochromen Anämie einen besonderen Stellenwert erlangt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Dokumentation der molekularen Pathologie der β -Thalassämie bei Probanden deutscher Herkunft, d. h., die Analyse dieser monogenen Erbkrankheit in einem nicht-endemischen Gebiet.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Beantwortung folgender Fragen herangezogen werden:

1. Woher stammt die β -Thalassämie in der einheimischen deutschen Bevölkerung?
2. Welche β -Globingen-Mutationen sind häufig bei autochthon Deutschen? Kann die Hypothese erhärtet werden, daß die bei Deutschen gefundenen Mutationen ursprünglich aus dem Mittelmeerraum stammen und durch Migration in das Gebiet der heutigen Bundesrepublik Deutschland gelangten?
3. Können neue, in der Literatur nicht veröffentlichte Mutationen gefunden werden?
4. Welche populationsgenetischen Aussagen lassen sich treffen? Sind in diesem Zusammenhang Parallelen zu früheren Veröffentlichungen [Laig et al., 1990] zu erkennen?

Im einzelnen ergeben sich daraus folgende Aufgabenstellungen:

- a) Etablierung der molekulargenetischen Basisdiagnostik (Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung) für die β -Thalassämie.
- b) Etablierung einer PCR mit biotinmarkierten Primern und anschließende radioaktive Sequenzierung mittels [α - ^{35}S]dATP.
- c) Vollständige genotypische Charakterisierung der Probanden deutscher Herkunft mittels Allel-spezifischer Oligonukleotid-Hybridisierung und Sequenzanalyse.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

2.1.1. Auswahl der Probanden

Tiefgefrorene DNA-Proben oder EDTA-Blut von 214 Probanden deutscher Herkunft mit einer heterozygoten β -Thalassämie standen als Ausgangsmaterialien zur Verfügung. Vom Blut aller Patienten war eine Hb-Elektrophorese angefertigt und die Diagnose einer heterozygoten β -Thalassämie gestellt worden. Alle Blutproben sind durch Mikrozytose und Hypochromie mit einem $HbA_2 > 3,5$ gekennzeichnet. In den Familien der Probanden gibt es keine bekannten Vorfahren aus dem Ausland.

2.1.2. Geräte

Spectrophotometer-Ultraspec III (Pharmacia)

Hybaid Thermal Cycler-Omni Gene (MWG Biotech)

Wasserbad UB 12 (Techne)

Tischzentrifuge (Eppendorf)

UV-Transilluminator (Herolab), Video-Dokumentationssystem (Mitsubishi)

Hybaid-Hybridisierungsöfen (MWG Biotech)

Heizblock DB 2 A (Techne)

UV-Stratalinker 2400 (Stratagene)

Gelelektrophorese- horizontal, vertikal (MWG Biotech)

Film-Entwicklungsgerät (Kodak)

2.1.3. Chemikalien

Proteinase K:	Boehringer Mannheim
PBS	1,7 mmol/l NaCl; 0,064 mmol/l KCl; 0,375 % Tris; pH 7,4
Äthanol:	J. T. Baker
TE-Puffer:	10 mmol/l Tris pH 8,0; 1 mmol/l EDTA
PCR-Puffer:	100 mmol/l Tris pH 8,3; 500 mmol/l KCl; 30 mmol/l $MgCl_2$; 0,01 % Gelatine
$MgCl_2$	Roth
10x TBE:	0,9 mol/l Tris Borat; 0,02 mol/l EDTA
Taq:	Perkin Elmer, Pharmacia
Primer:	Pharmacia
dNTPs:	Pharmacia
Agarose:	SEA KEM Biozym
Marker ϕ X 174 <i>Hae</i> III	Promega

Ethidiumbromid:	Roth
NaCl	Roth
Ladepuffer:	15 % Ficoll; 0,05 % Bromphenolblau
Nylonmembran:	Schleicher/Schüll
DIG-Hyb-Mix:	ad 500 ml: 125 ml 20x SSC; 1,65 ml N-Laurylsarkosin; 0,50 ml 20 % SDS; 5 g Casein
20x SSC:	3 mol/l NaCl; 0,3 mol/l Na-Citrat
20x SSPE:	3 mol/l NaCl; 200 mmol/l NaH ₂ PO ₄ ; 20 mmol/l EDTA
TMACl-Wasch-Mix:	3 mol/l TMACl; 50 mmol/l Tris pH 8,0; 0,2 % SDS
Detektionspuffer 1:	0,1 mol/l Maleinsäure; 0,15 % NaCl
Detektions-Wasch-Puffer:	0,3 % Tween 20 in Detektionspuffer 1
Detektionspuffer 2:	10 % Blockingreagenz oder Casein in Detektionspuffer 1 (1:10)
Detektionspuffer 3:	100 mmol/l Tris-HCl, pH 9,5; 100 mmol/l NaCl; 50 mmol/l MgCl ₂
Blockingreagenz	Boehringer Mannheim
SDS:	Roth
binding & washing buffer:	2x konzentriert: 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5); 1 mmol/l EDTA; 2 mmol/l NaCl
rothiphorese Gel 40:	Roth
TEMED:	Serva
Ammoniumpersulfat:	Serva
Harnstoff:	Roth
[α - ³⁵ S]dATP:	Du Pont
Kits:	DIG Oligonucleotide 3'-Labeling Kit (Boehringer Mannheim) Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna) ³² P Sequenzing™ Kit (Pharmacia)

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Extraktion

Aus EDTA-Blut wurden zunächst Leukozyten präpariert: Die Reinigung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 3000 U/min) in PBS und Verwerfen des Überstandes. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert (Aqua bidest.) und von den verbleibenden Zellen getrennt (erneute Zentrifugation 30 min bei 3000 U/min).

Der Aufschluß der Leukozyten erfolgte mit 50 µl Proteinase K (10 mg/ml, 4-16 h im Wasserbad bei 37 °C). Im Anschluß wurden die Proteine durch Zugabe von 3 mol/l NaCl ausgefällt. Die DNA-Fällung erfolgte mit 100 %igem, die DNA-Waschung mit 70 %igem Äthanol. Nach Lösung der DNA in TE-Puffer konnte ihre Menge und Reinheit am Spektrophotometer bestimmt werden [Sambrook et al., 1989].

2.2.2. PCR

2.2.2.1. Prinzip der Methode

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Produktion einer enormen Anzahl spezifischer DNA-Sequenzen. Dazu bedient sich die DNA-Polymerase der Einzelstrang-DNA als Matrize zur Synthese eines neuen, komplementären Stranges. Diese Einzelstrang-DNA erzeugt man, indem doppelsträngige DNA nahe dem Siedepunkt erhitzt wird (1. Schritt: Denaturierung). Zusätzlich benötigt die DNA-Polymerase ein kurzes doppelsträngiges DNA-Stück, um mit der Synthese beginnen zu können, den sogenannten Primer. Im zweiten Schritt (*Primer-Annealing*) hybridisieren die Primer, die die jeweils interessierenden DNA-Abschnitte von beiden Seiten begrenzen, mit jeweils komplementären Basensequenzen. Während des Extensionsschrittes ergänzt die hitzebeständige Taq-Polymerase die fehlenden Stücke komplementär zur Vorlage (Syntheserichtung 5'→3'). Im Ergebnis sind 2 identische DNA-Doppelstränge entstanden, die im 2. Zyklus wieder durch Hitze gespalten werden. Der Prozeß beginnt von Neuem über ca. 30 Zyklen (Saiki et al., 1985).

2.2.2.2. Primerauswahl

Die Primer wurden so gewählt, das der gesamte kodierende Bereich des β-Globingens, die Region des Promotors, die 5'- und 3'-UTR, das 1. Intron und ein Teil des 2. Introns amplifiziert werden konnten [Lawn et al., 1980]. Diese Sequenz umfaßt erstens die in der Literatur veröffentlichten Mutationen, zweitens werden in diesem Bereich Mutationen vermutet, die noch nicht identifiziert, aber den Phänotyp einer β-Thalassämie auslösen können. Folgende Primer kamen zur Anwendung:

Primer 1	5' TATGCTTACCAAGCTGTGATTCCA 3'	-24mer
Primer 2	5' CCCCTTCCTATGACATGAACTTAA 3'	-24mer

Beide Primer lassen ein Amplifikat entstehen, das aus 863 bp besteht und die Sequenz des gesamten Promotors, der 5' UTR, des 1. und 2. Exons, des 1. Introns sowie 72 Nukleotide des 2. Introns enthält.

Primer 3	5' ACAATGTATCATGCCTCTTTGCAC 3'	-24mer
Primer 4	5' TCCCAAGGTTTGAAGCTAGCTCTTC 3'	-24mer

Dieses Primerpaar läßt ein Amplifikat mit 623 bp entstehen und beinhaltet 259 Nukleotide des 2. Introns, das anschließende Exon 3 und ca. 100 bp über die 3' UTR hinaus. Die verbleibenden 519 Nukleotide des 2. Introns zwischen Primer 2 und 3 bleiben unberücksichtigt, da in diesem nicht-kodierenden Bereich keine phänotypisch relevanten Mutationen erwartet werden.

2.2.2.3. PCR-Optimierung

Die 100 µl PCR-Reaktionsgemische enthielten selbst gefertigten PCR-Puffer mit 3 mmol/l MgCl₂; 0,2 mmol/l je dNTP, 30 pmol je Primer, 2 U Taq Polymerase und 1µg extrahierte DNA des jeweiligen Probanden. Nach Anfertigung der Reaktionsgemische wurden die jeweiligen Proben im *Thermal Cycler* folgenden Bedingungen unterzogen:

I.	initiale Denaturierung	10'	95°	
II.	30 Zyklen mit je	30''	95°	(Denaturierung)
		45''	60°	(Anlagerung der Primer)
		1'15''	72°	(Extension)
III.	abschließende Extension	10'	72°	

Diese Bedingungen garantierten die Amplifikation der spezifischen Sequenzen sowie eine hohe quantitative Ausbeute. Zur Optimierung der PCR-Reaktion mußten eine Reihe kritischer Parameter beachtet werden: Primerlänge und -sequenz, *Annealing*- und Denaturierungstemperaturen, Zykluszeiten und die Magnesiumkonzentration. Dabei stellt die Titration der Magnesiumkonzentration eine wichtige Optimierungsstrategie dar, da das Vorhandensein freier Magnesium-Ionen essentiell für die Funktionsfähigkeit der Taq-Polymerase ist. Die Konzentration der freien Magnesiumkonzentrationen beeinflusst die Anlagerung des Primers, die Schmelztemperatur des PCR-Produktes sowie die Produktspezifität [Scheinert et al., 1995].

2.2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in einem 1,5 %igem Agarosegel, welches 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, um die Amplifikate unter UV-Bestrahlung sichtbar zu machen. Dazu wurden 8 µl Amplifikat unter Zusatz von 2 µl Ladepuffer gegen einen Größenmarker (ϕX 174 *HAE* III) aufgetragen, um sicherzustellen, daß die spezifische Sequenz amplifiziert wurde. Zur Dokumentation wurden die Gele in UV-Durchleuchtung fotografiert (s. Abb. 6).

2.2.3. Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung

2.2.3.1. Prinzip der Methode

Wenn kurze Oligonukleotide an komplementäre DNA-Sequenzen binden, dann verhindert eine einzige Fehlpaarung die thermische Stabilität des Doppelstranges im Vergleich zur Stabilität des perfekt gepaarten

Doppelstranges. Diesen Umstand kann man sich mit markierten Oligonukleotid-Sonden zur Diagnostik von Punktmutationen nutzbar machen. Diese Sonden werden als Allel-spezifische Oligonukleotide bezeichnet. Dabei bindet eine Wildtyp (Wt)-Sonde nur an eine korrekte, nicht mutierte Sequenz und eine Mutations (M)-Sonde nur an eine mutierte, aber nicht an die Wildtypsequenz [Saiki et al. 1986; Wink & Wehrle, 1994].

Zunächst erfolgt die Amplifikation eines genomischen DNA-Fragmentes durch die PCR, welches anschließend hitzedenaturiert und im einzelsträngigen Zustand auf eine Nylonmembran aufgetropft wird (*Dot-Blotting*). Mittels UV-Bestrahlung wird die einzelsträngige DNA auf der Membran fixiert und kann nun mit den entsprechenden Oligonukleotid-Sonden hybridisiert werden. Um die Anlagerung der Oligonukleotide sichtbar zu machen, werden sie vorher Digoxigenin (DIG)-markiert. Nach Hybridisierung erfolgt die Waschung der Membranen unter definierten Bedingungen (Temperatur, Salzkonzentration). Dadurch bleiben nur solche Hybride stabil auf der Membran fixiert, die 100 %ig komplementär zueinander sind.

Ein Oligonukleotid mit der Wildtypsequenz gibt ein Signal mit homozygot normalen und heterozygoten DNA-Proben. Dahingegen gibt ein Oligonukleotid mit einer mutierten Sequenz ein Signal mit homozygot mutierten, aber auch mit heterozygoten DNA-Proben. Somit ermöglicht eine parallele Hybridisierung mit Wildtyp- und mutierter Sonde eine eindeutige Bestimmung des Genotyps an dieser Stelle. Durch den gezielten Einsatz von Sonden, die eine Mutation des β -Globingens tragen, kann ein Screening der Proben auf häufige β -Thalassämie Mutationen mittels ASO erfolgen.

2.2.3.2. Markierung der Oligonukleotide

Die Markierung der Oligonukleotide mit Digoxigenin-ddUTP wurde mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End-Labeling Kit von Boehringer durchgeführt.

Für jede β -Thalassämie-mutation wurde je ein mutiertes und je ein Wildtyp-Oligonukleotid am 3'-Ende markiert. Das markierte Oligonukleotid lag dann in einer Konzentration von 1 pmol/ μ l vor. Um die Effizienz der Markierung zu testen, wurden Verdünnungsreihen (1 μ g/ μ l; 100 pg/ μ l; 10 pg/ μ l; 1pg/ μ l; 0,1 pg/ μ l; 10 fg/ μ l) der markierten Oligonukleotide angefertigt und auf die Nylonmembran getropft. Die Detektion erfolgte wie unter 2.2.3.6. beschrieben. Folgende Sonden kamen zum Einsatz:

NS 39 Wt	5' CCCTTGGACC C AGAGGTTCT 3'
NS 39 M	5' CCCTTGGACC T AGAGGTTCT 3'
IVS1-1 Wt	5' TGGGCAG G TTGGTATCAAGG 3'
IVS1-1 M	5' TGGGCAG A TTGGTATCAAGG 3'
IVS1-6 Wt	5' TGGGCAGGTTGG T ATCAAGG 3'
IVS1-6 M	5' TGGGCAGGTTGG C ATCAAGG 3'
IVS1-110 Wt	5' CTGCCTATT G GTCTATTTTC 3'
IVS1-110 M	5' CTGCCTATT A GTCTATTTTC 3'
IVS2-1 Wt	5' AACTTCAGG G TGAGTCTATG 3'
IVS2-1 M	5' AACTTCAGG A TGAGTCTATG 3'
IVS2-745 Wt	5' ACAATCCAG C TACCATTCTG 3'
IVS2-745 M	5' ACAATCCAG G TACCATTCTG 3'
IVS1-5 Wt	5' TGGGCAGGTTG G TATCAAGG 3'
IVS1-5 M	5' TGGGCAGGTTG C TATCAAGG 3'
IVS1-5 M	5' TGGGCAGGTTG T TATCAAGG 3'
FS 8/9 Wt	5' GAG GAG AAG TCT GCC GTT AC 3'
FS 8/9 M	5' GAG GAG AAG GTC TGC CGT TA 3'
-87 Wt	5' TGGAGCCACAC C CTAGGGTT 3'
-87 M	5' TGGAGCCACAC T CTAGGGTT 3'

2.2.3.3. Dot-Blotting

Jeder Probanden-DNA wird genau ein Feld auf der Nylonmembran zugeordnet. 2 μ l Amplifikat reichen aus, um ein starkes Signal zu erhalten. Für die Hybridisierung werden je ein Mutationsfilter und ein Wildtypfilter benötigt. Neben der Probanden-DNA wurden auf dem Mutations- und Wildtypfilter entsprechende Positiv- und Negativkontrollen getropft. Eine Positivkontrolle für den Mutationsfilter ist ein Patient, der homozygot für die zu untersuchende Mutation ist, die Negativkontrolle kann eine beliebige Wildtyp-DNA sein. Für den Wildtypfilter gelten die Kontrollen im umgekehrten Sinn.

Die Amplifikate wurden 3 min bei 95° denaturiert, auf Eis gestellt und anschließend auf beide Filter aufgetragen. Nach Benetzung der Filter mit 20x SSC konnte die DNA mittels UV-Bestrahlung auf den Filtern fixiert werden.

2.2.3.4. Hybridisierung

Die Filter mit dem fixierten einzelsträngigen Amplifikat wurden im Hybrid Hybridisierungssofen (MWG) kontinuierlich mit 20 ml/100 cm² DIG-Hyb-Mix umspült. Die Prähybridisierung erfolgte bei 65° für 1-2 h und hat den Vorteil, daß unspezifische DNA auf dem Filter geblockt und ein unsauberer Hintergrund vermieden wird. Im Anschluß wurde der DIG-Hyb-Mix durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt, die 5 pmol markiertes Oligonukleotid/ml Hyb-Mix enthielt. Über Nacht hybridisierte der Mutationsfilter mit dem mutierten

Oligonukleotid, der Wildtypfilter mit dem Wildtyp-Oligonukleotid bei einer empirisch ermittelten Temperatur zwischen 65° und 68° (s. Tab. 6).

2.2.3.5. Waschen der Filter

Nach der Hybridisierung wurden die Filter jeweils 2x 5 min bei Raumtemperatur in 2x SSPE/0,1 SDS, danach 1x 20 min in TMACl-Waschmix unter empirisch ermittelten Temperaturen gewaschen. Die 3. Waschung muß unter äußerst stringenten Bedingungen erfolgen, um nur die stabilen Hybride auf der Membran zu belassen, die den Erhalt eines eindeutigen Signals gewährleisten.

Tab. 6 zeigt die empirisch eruierten Hybridisierungs- und Waschttemperaturen in Abhängigkeit von der Mutation im β -Globingen.

Mutation im β -Globingen	Hybridisierungstemperatur in °C M + Wt-Filter	Waschttemperatur in °C	
		M-Filter	Wt-Filter
NS 39	65	68	68
IVS1-1 G \rightarrow A	65	68	65
IVS1-6 T \rightarrow C	65	68	68
IVS1-110 G \rightarrow A	65	58	62
IVS2-1 G \rightarrow A	65	62	65
IVS2-745 C \rightarrow G	65	62	65
IVS1-5 G \rightarrow C	65	65	65
IVS1-5 G \rightarrow T	65	65	65
FS 8/9 +G	65 (Wt); 68 (M)	65	65
-87 C \rightarrow T	65	62	62

Tab. 6: Empirisch ermittelte Hybridisierungs- und Waschttemperaturen für ASO-Filter.

2.2.3.6. Detektion

2.2.3.6.1. Prinzip der Detektion

Nukleinsäuremoleküle können durch den Einbau eines Digoxigenin (DIG)-markierten Nukleotids nicht-radioaktiv gekennzeichnet werden. In diesem Fall werden Oligonukleotide an ihrem 3'-Ende unter Nutzung einer terminalen Transferase durch Inkorporation eines DIG-markierten Didesoxyuridin-Triphosphats (DIG-ddUTP) enzymatisch markiert. Die Detektion des DIG-Haptens erfolgt unter Verwendung hochmolekularer Konjugate aus DIG-spezifischen Antikörperfragmenten und Alkalischer Phosphatase (AP) als signalerzeugende enzymatische Komponente. Letztendlich geschieht die Detektion des Indikator-moleküls Alkalische Phosphatase über ein Chemilumineszenz-System, welches die Sichtbarmachung der Hybride auf einem konventionellen Röntgenfilm ermöglicht.

Die Detektion erfolgte nach dem Protokoll des 3'-End Labeling Kit von Boehringer Mannheim und gilt für 10 cm x 10 cm Filter:

- 5 min in Waschpuffer (Puffer 1 + Tween)
- 30 min in Puffer 2
- 30 min in Anti-DIG-AP-Lösung (1:10000 in Puffer 2)

- 2x 15 min in Wasch-Puffer
- 5 min in Puffer 3 äquilibrieren
- 5 min in Lumigen-(CSPD)-Lösung (1:100 in Puffer 3)

Während dieser Schritte muß auf eine gleichmäßige Umspülung der Filter geachtet werden. Die Lumineszenz-Reaktion erfolgte durch Inkubation der Filter bei 37° über einen Zeitraum von 15 Minuten. Zuletzt wurde ein Film ca. 15-20 min exponiert, anschließend entwickelt und ausgewertet.

2.2.4. Sequenzierung

2.2.4.1. Sequenzierung nach der Didesoxymethode

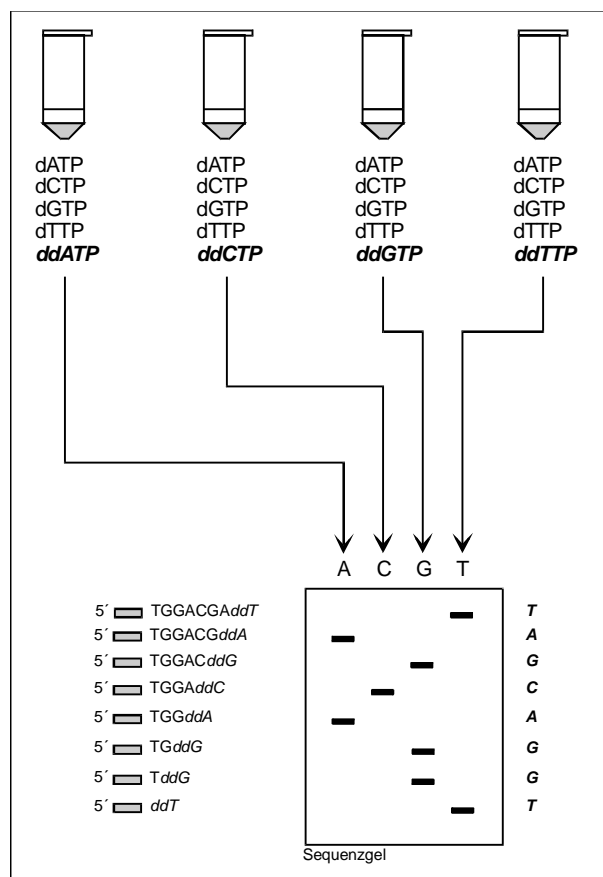


Abb. 3: Sequenzierung nach der Didesoxymethode, modifiziert nach Wink & Wehrle, 1994.

Phosphatgruppen der neu einzubauenden Nukleotide. Demzufolge führt der Einbau eines ddNTP an dieser Stelle zu einem Abbruch der Elongationsreaktion.

Nach Inkubation der 4 Reaktionsansätze befinden sich jetzt in jedem Ansatz eine Reihe von unterschiedlich langen neusynthetisierten DNA-Molekülen, die alle ein gemeinsames 5'-Ende aufweisen, sich aber an ihrem 3'-Ende unterscheiden. Somit kann über die 4 verschiedenen Reaktionsansätze, die je eines der unterschiedlichen ddNTPs enthalten, die gesamte Sequenz der Matrize bestimmt werden [Wink & Wehrle, 1994].

Zur Analyse der Sequenzprodukte müssen die Reaktionsansätze auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (6 %,

Diese Methode, deren Anwendung sich besonders durch ihre Verbindungsmöglichkeit mit der PCR empfiehlt, wurde 1977 erstmals von Sanger et al. beschrieben. Als Ausgangsmaterialien dienen ein Stück einzelsträngige DNA (*Template*) und ein kurzer, komplementärer Primer. Dabei liegt der Hybridisierungsbereich des Primers in unmittelbarer Nachbarschaft zu der zu analysierenden Sequenz. In Gegenwart von DNA-Polymerase und Nukleotiden erfolgt nun unter Verlängerung des Primers an dessen 3'-Ende die Synthese des komplementären DNA-Stranges.

Es werden vier parallele Reaktionsgemische angesetzt, die alle 4 Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) und zusätzlich jeweils eines der 4 Didesoxyribonukleotid-Triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) enthalten. Die Besonderheit der ddNTPs liegt darin, daß ihnen nicht nur die 2'-OH-Gruppe, sondern auch die 3'-OH-Gruppe fehlt. Diese 3'-OH-Gruppe ist jedoch essentiell für die Verknüpfung mit den 5'-

7 mol/l Harnstoff) aufgetragen werden. Um die einzelnen Elongationsprodukte später identifizieren zu können, erhalten sie während der eigentlichen Sequenzreaktion (siehe 2.2.4.3.) eine detektierbare Markierung mit $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$. Nach Exposition gegen einen Röntgenfilm werden die Elongationsprodukte sichtbar, die Nukleotidabfolge kann abgelesen werden (s. Abb. 3).

2.2.4.2. PCR mit biotinmarkierten Primern

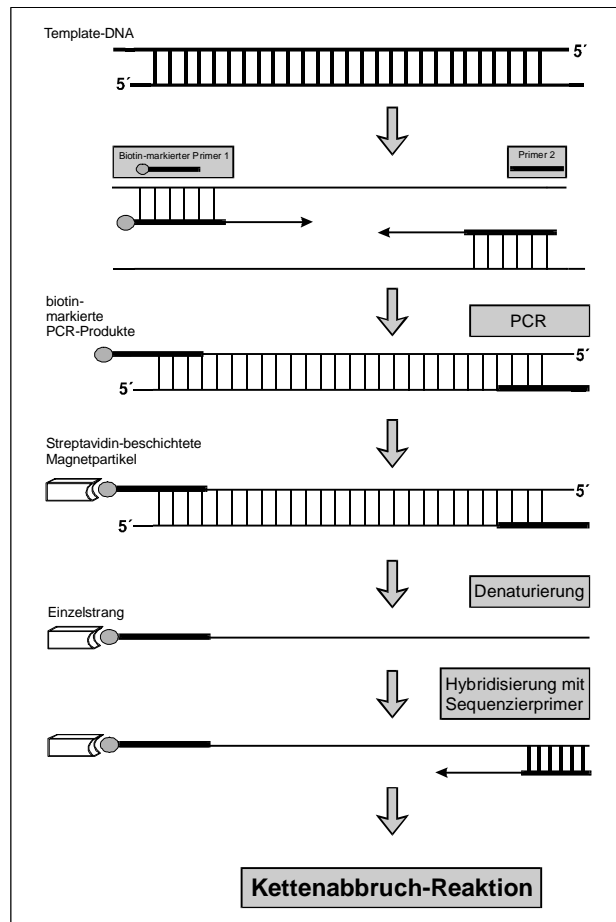


Abb. 4: PCR mit biotinmarkierten Primern, modifiziert nach Wink & Wehrle, 1994.

Zur Erlangung eines einzelsträngigen *Templates*, welches anschließend direkt sequenziert werden kann, wird die hohe Affinität zwischen Biotin und Streptavidin genutzt. Bei der initialen PCR-Reaktion werden ein Biotin-markierter und ein unmarkierter Primer eingesetzt. Alle Amplifikationsprodukte erhalten am 5'-Ende von einem der beiden DNA-Stränge ein Biotin-Molekül. Die doppelsträngigen PCR-Produkte werden über diese Biotin-Moleküle an Streptavidin-beschichtete Eisenkugeln (*beads*) gebunden und können dadurch an einem Magneten immobilisiert werden. Unter denaturierenden Bedingungen werden anschließend die freien Primer und Nukleotide der initialen PCR und der unmarkierte DNA-Gegenstrang durch Waschschriffe abgetrennt, so daß nur noch der zu sequenzierende Einzelstrang übrigbleibt (Abb. 4). Alle Vorgänge der Waschprozedur wurden streng nach Protokoll (Dynabeads M-280 Streptavidin) durchgeführt.

2.2.4.3. Sequenzierung einzelsträngiger DNA mit der T7-Polymerase

Nach der Präparation des Einzelstranges kann dieser unmittelbar in der Sequenzreaktion (Didesoxymethode nach Sanger) zum Einsatz kommen [Thein & Hinton, 1991].

Die verwendeten Lösungen wurden dem T^7 Sequencing $^{\text{TM}}$ Kit von Pharmacia entnommen.

1. Anlagerung des Primers (*Annealing*)

Zu 10 μl Template (*bead suspension*) wurde 1 μl Primer (3 pmol/ μl), 2 μl Annealing buffer und 1 μl Aqua bidest. gegeben und nach kurzer Zentrifugation für 10 min bei 60° im Wasserbad inkubiert (verwendete Primer s. Abb. 5). Anschließend blieb das Gemisch ca. 10 min bei Raumtemperatur stehen.

2. Markierungsreaktion (*Labelling*)

Zu dem Gemisch aus Template/Primer wurden 3 μl Labelling Mix A, 1 μl [α - ^{35}S]dATP (12,5 mCi) und 2 μl gelöste T7 DNA-Polymerase zu einem totalen Volumen von 20 μl pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation blieb der Ansatz nochmals 5 min bei Raumtemperatur stehen.

3. Kettenabbruch (*Termination*)

Zuletzt wurden jeweils 4,5 µl des unter 2. entstandenen Gemisches zu je 2,5 µl A-, C-, G- und T-Mix gegeben, welche die Nukleotide und das entsprechende Didesoxynukleotid-Triphosphat enthielten. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37° erfolgte die Zugabe von 5 µl Stopplösung.

Ein Aliquot von jeweils 3 µl der 4 Reaktionsansätze konnte nach Denaturierung bei 80° C auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel geladen werden, was die elektrophoretische Trennung der einzelnen Elongationsprodukte der Größe nach ermöglichte. Nach einer Laufzeit von ca. 2,5 h bei 40 Watt wurde das Gel getrocknet und gegen einen Röntgenfilm ca. 24 h exponiert.

Oligonukleotid-Bezeichnung	Sequenz
92 anti-sense	5' AACGGCAGACTTCTCCTCAG 3'
99 anti-sense	5' TGGTCTCCTTAAACCTGTCT 3'
101 anti-sense	5' CTTAGGGTTGCCATAACAG 3'
115 anti-sense	5' CCCCTCCTATGACATGAACTTAA 3'
121 anti-sense	5' GAGCTGTGGGAGGAAGATAA 3'
122 anti-sense	5' AATATCCCCCAGTTTAGTAG 3'
119 anti-sense	5' TCCAAGGTTTGAAGTAGCTCTTC 3'

Abb. 5: Sequenzierprimer.

2.2.5. Restriktionsanalyse

Bei diesem Verfahren wird die amplifizierte DNA mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen in definierte Fragmente gespalten. Jedes Restriktionsenzym schneidet die DNA exakt an einer Stelle, die seiner spezifischen Erkennungssequenz entspricht. Mittels Gelelektrophorese kann anschließend die Länge der Fragmente, im Vergleich gegen einen geeigneten Größenmarker, bestimmt werden [Nicholl, 1995].

Restriktionsanalysen können dem Nachweis von Punktmutationen dienen, wenn die Erkennungssequenz des Enzyms durch den Austausch oder den Verlust einer Base verändert wurde. Ein Beispiel für den Basenaustausch mit Verlust der spezifischen Schnittstelle ist die Sichelzellularmutation, bei der die Erkennungssequenz CTNAG für des Enzyms *DdeI* in CTNTG verwandelt ist. Die Folge ist der Verlust des charakteristischen Restriktionsmusters, weil das Enzym die normale Sequenz der Schnittstelle nicht erkennen kann (s. Abb. 16).

Als Beispiel für den Verlust einer Base fungiert die Mutation im Kodon 6, die das Leseraster für die nachfolgenden Nukleotide verschiebt (FS 6 -A). Die Erkennungssequenz CTNAG für das Enzym *DdeI* ist durch den Verlust des Adenins nicht mehr vorhanden. Dadurch ist diese Mutation schon sehr einfach anhand des veränderten Restriktionsmusters zu erkennen (s. Abb. 7). Eine Sequenzanalyse beweist die Diagnose, da hiermit der Basenverlust direkt nachgewiesen werden kann. Der Restriktionsverdau stellt eine einfache und schnelle Methode dar, die eine Untersuchung von Familien oder Bevölkerungsgruppen, bei denen die Sichelzellularmutation bzw. FS 6 -A häufig anzutreffen sind, zulässt.

3. Ergebnisse

3.1. Screening auf häufige β -Thalassämie-Mutationen der Endemiegebiete

3.1.1. Auswahlkriterien

Die Auswahl der Sonden erfolgte nach der Überlegung, den größten Teil der Allele mittels ASO charakterisieren zu können, um dadurch das Spektrum der Sequenzanalyse zur Identifikation seltener und neuer Mutationen einzugrenzen.

Mittels ASO läßt sich eine große Zahl von Proben mit relativ geringem technischen Aufwand analysieren. Im ersten Schritt wurden die Mutationen erfaßt, die bei in Deutschland lebenden homozygoten Patienten gefunden wurden [Vetter et al., 1997]. Zusätzlich wurde die Mutation -87 C \rightarrow T in das Screening aufgenommen, die erstmalig bei einem homozygoten Deutsch-Italiener und seiner deutschen Mutter gefunden wurde [Kulozik et al., 1991 a].

Tab. 7 dokumentiert alle 11 ausgewählten Mutationen und berücksichtigt gleichzeitig deren geographische Verteilung sowie die Häufigkeit des Allels in der jeweiligen Region [Kulozik, 1991 c; Öner et al., 1990; Rosatelli et al., 1992; Baysal & Carver, 1995].

3.1.2. ASO und Restriktionsverdau

Insgesamt wurden 214 Proben untersucht. Bei allen ergaben hypochrome, mikrozytäre Erythrozytenindices verbunden mit einem erhöhten HbA₂ die Diagnose einer heterozygoten β -Thalassämie.

Der erste Schritt bestand darin, genügend Ausgangsmaterial für die Durchführung der ASO bereitzustellen. Entsprechend wurden von allen Proben jeweils 2 Amplifikate wie unter 2.2.2.2. beschrieben, hergestellt (s. Abb. 6). Das erste Amplifikat umfaßte eine Sequenz von 863 bp (Primer 1/2), die den Promotor, die 5'-UTR, das 1. und 2. Exon, das 1. Intron sowie 72 Nukleotide des 2. Introns einschloß. In diesem Bereich sind folgende Mutationen lokalisiert: -87 C \rightarrow T, FS 6 -A, FS 8/9 +G, IVS1-1 G \rightarrow A, IVS1-5 G \rightarrow C, IVS1-5 G \rightarrow T, IVS1-6 T \rightarrow C, IVS1-110 G \rightarrow A, NS 39 C \rightarrow T und IVS2-1 G \rightarrow A. Der Bereich des zweiten Amplifikates mit 623 bp (Primer 3/4) beinhaltet dahingegen nur die Mutation IVS2-745 C \rightarrow G. In Abb. 8 sind eben genannte Mutationen zur Übersicht in die β -Globinsequenz eingezeichnet (die Introns sind durch kursive Schreibweise von den Exonen abgegrenzt).

Nach Bereitstellung der Amplifikate wurden je ein Wildtyp- und je ein Mutationsfilter pro Sonde angefertigt und wie unter 2.2.3. beschrieben bestückt, hybridisiert, gewaschen und detektiert. Eine Auswertung der Filter beinhaltete eine exakte Zuordnung der Proben-DNA zu einem Mutations- oder Wildtypsignal (s. Abb. 9 und 10). War eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, wurde die Analyse wiederholt. Zum Nachweis der FS 6 -A wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt, wie unter 2.2.5. beschrieben (s. Abb. 7).

Mutationen	geographische Verteilung	Häufigkeit des Allels in %
NS 39 C → T	Mittelmeerländer	
	Sardinien	95 %
	Spanien	64 %
	Portugal	53 %
	Italien	40 %
	Sizilien	35 %
IVS1-110 G → A	Bulgarien	22 %
	Mittelmeerländer	
	Zypern	70 %
	ehem. Jugoslawien	45 %
	Griechenland	42 %
	Türkei	39 %
IVS1-1 G → A	Italien	23 %
	Libanon	62 %
	Mittelmeerländer	
	Portugal	32 %
	Griechenland	13 %
IVS1-5 G → T	Zypern	12 %
	Italien	10 %
	Mittelmeerländer	
IVS1-5 G → C	Schwarzamerikaner	
	Indien	22 %
IVS2-745 C → G	China	
	Mittelmeerländer	
	Bulgarien	10 %
- 87 C → T	Italien	5 %
	Deutschland/Italien	
IVS1-6 T → C	Mittelmeerländer	
	Sizilien	29 %
	ehem. Jugoslawien	19 %
IVS2-1 G → A	Türkei	18 %
	Mittelmeerländer	
	Türkei	12 %
FS 8/9 +G	Tunesien	
	Schwarzamerikaner	
	Indien	20 %
FS 6 -A	Mittelmeerländer	
	Türkei	6,6 %
	Mittelmeerländer	
FS 6 -A	Italien	1,2 %
	Schwarzamerikaner	
	Mittelmeerländer	

Tab. 7: ASO-Screening deutscher Heterozygoter auf häufige β -Thalassämie-Mutationen der Endemiegebiete.

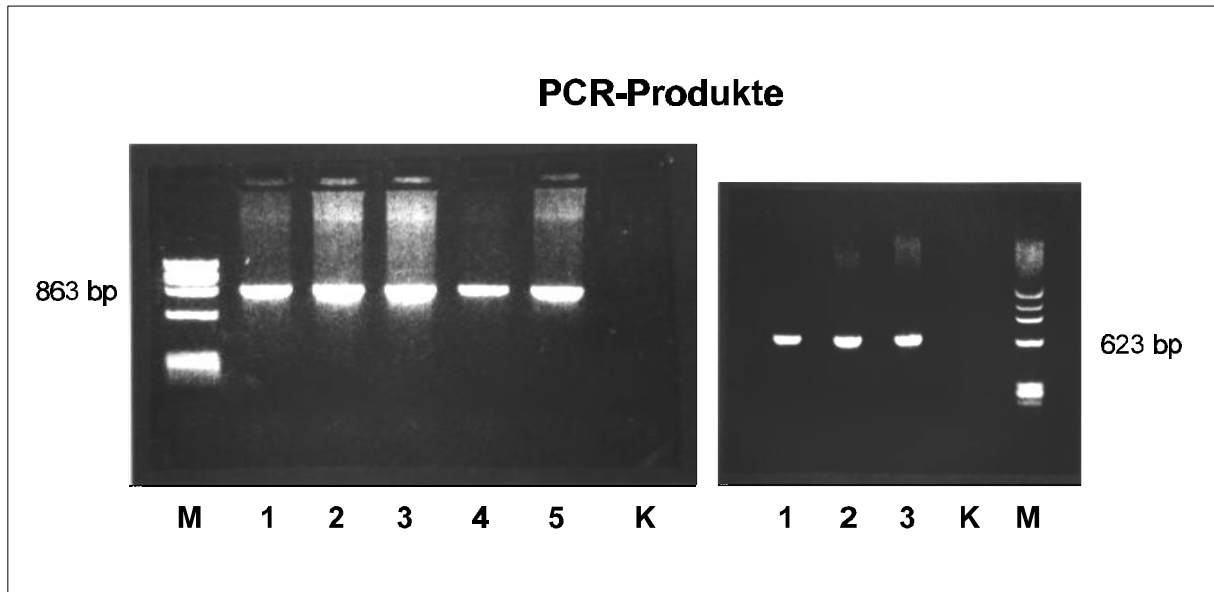


Abb. 6: Darstellung PCR-amplifizierter DNA auf einem Ethidiumbromid gefärbten 1,5 %igen Agarosegel. Links: Amplifikate mit einer Länge von 863 bp (1-5), Negativkontrolle (K), Marker ϕ X 174 *HAE* III (M). Rechts: Amplifikate mit einer Länge von 623 bp (1-3), Negativkontrolle (K), Marker ϕ X 174 *HAE* III (M).

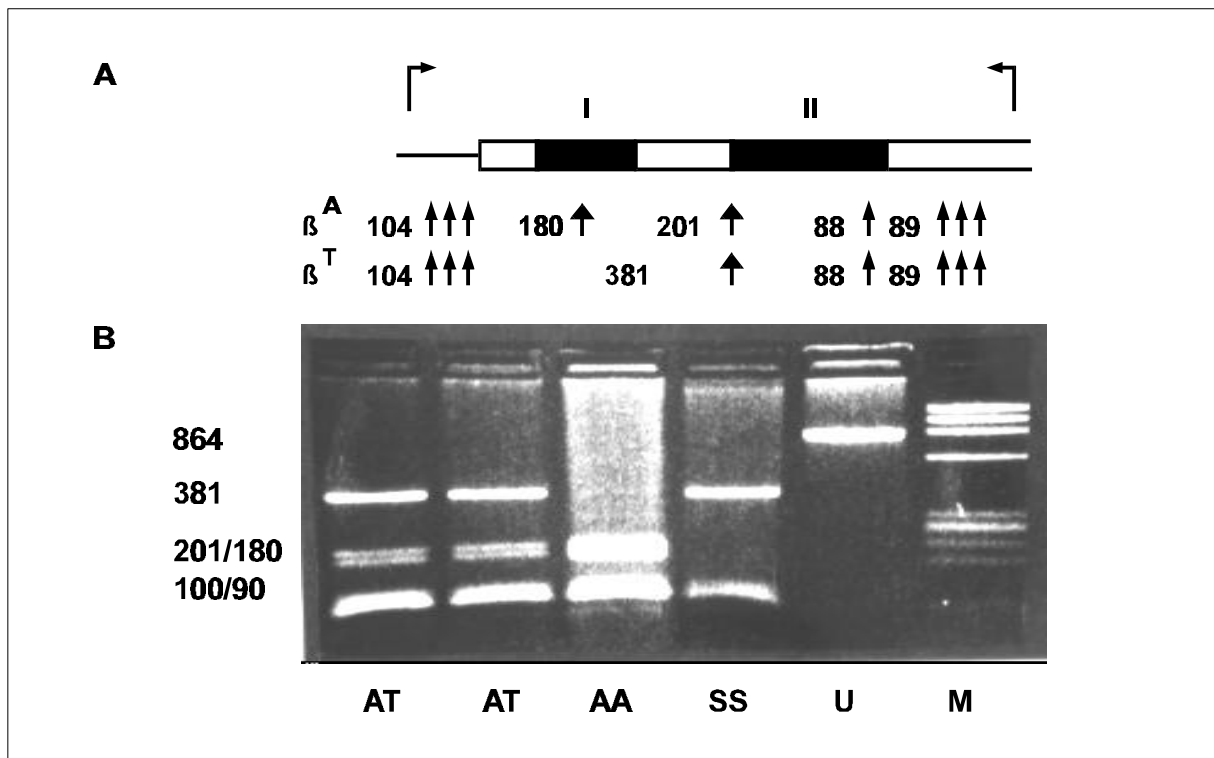


Abb. 7: *DdeI*-Verdau PCR-amplifizierter DNA zum Nachweis der FS 6 -A-Mutation. Durch den Basenverlust (-A) im Kodon 6 ist die Erkennungssequenz CTNAG für das Restriktionsenzym *DdeI* nicht mehr vorhanden. Entsprechend entsteht ein längeres Fragment von 381 bp wie bei der Sichelzellularanämie. Die Sichelzellularanämie befindet sich ebenfalls im Kodon 6 des β -Globingens, hat jedoch den Austausch des Adenins durch ein Thymin zur Folge.

A dokumentiert den relevanten Teil des β -Globingens mit den als Winkelpfeile dargestellten PCR-Primern und den Restriktionsstellen des Enzyms *DdeI* (\uparrow). Gleichzeitig werden die Veränderungen des Restriktionsmusters durch die FS 6- A-Mutation (β^T , \uparrow) markiert.

B zeigt ein Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit *DdeI* verdauten PCR-Fragmenten. Die Spuren enthalten von links nach rechts: zwei heterozygote Probanden für die FS 6 -A-Mutation (AT), die Kontroll-DNA eines Gesunden (AA), einen an Sichelzellanämie homozygot Erkrankten (SS), unverdaute DNA (U) und den Marker ϕ X 174 *HAE* III (M).

GCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTTAGTAG
 CAATTTGTACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTTGAAGT
 CCAACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAC
 -87 C → T
 CCTGTGGAGCCACACCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGG
 T
 GCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACGTGTT
 Initiationskodon FS 6 -A FS 8/9 +G
 CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGTCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTG
 IVS1-1, -5, -6
 CCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAG [GTTGGTATCAAG
 A CC
 GTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGG
 IVS1-110 G → A Exon 2
 GTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAG] GCTGCTGGTG
 NS 39 C → T A
 GTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTA
 T
 TGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGC
 TCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCAC
 IVS2-1 G → A
 GTGGATCCTGAGAACTTCAGG [GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTC
 A
 TATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAG
 ACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTATTTGCTGTTCATA
 ACAATTGTTTTCTTTGTTTAAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGAATTTTTACTATT
 ATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTT
 AAAAAAAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCT
 ATATTCATAAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATACATAT
 TTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGGC
 ATTTGTAATTTTAAAAATGCTTTCTTCTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATA
 CTTTCCCTAATCTCTTTCTTTAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATT
 CTAAAGAATAACAGTGATAAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTT
 IVS2-745 C → G
 CTGCATATAAATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTA
 G
 CCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTT
 Exon 3
 TTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAG] CTCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTG
 TGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGT
 3'UTR
 GGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTAA [GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTT
 CTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACACTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGCCTT
 Poly-A-Signal
 GAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGTATTTAAATTATT
 TCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCATTTAAAACATAAAGAAATGAAG

Abb 8: DNA-Sequenz des humanen β -Globingens einschließlich Lokalisation der 11 ausgewählten Mutationen für das ASO-Screening.

Auswertung der Filter

Die Wildtyp- und Mutationsfilter dienen als Kontrollen für die experimentellen Rahmenbedingungen. So muß die Wildtyp-Proben-DNA (Wt) auf dem Wildtypfilter ein positives Signal ergeben, da der Wildtypfilter mit dem Wildtyp-Oligonukleotid hybridisiert. Die Mutations-Proben-DNA (M) darf jedoch auf dem gleichen Filter kein Signal aufweisen. Im Gegensatz dazu muß die Mutations-Proben-DNA (M) auf dem Mutationsfilter ein positives Signal geben, da der Mutationsfilter mit dem Oligonukleotid hybridisiert, welches die jeweilige Mutation trägt. Die Wildtyp-Proben-DNA (Wt) darf entsprechend kein Signal hinterlassen. Eine korrekte Auswertung der Filter ist nur dann möglich, wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind (s. Abb. 9 A, B und Abb. 10).

DNA-Probe entspricht der Wildtypsequenz:

Wildtypfilter - positives Signal

Mutationsfilter - kein Signal nachweisbar

Trifft dieses Ergebnis auf eine zu untersuchende DNA-Probe zu, muß das Screening für die verbleibenden Mutationen fortgesetzt werden. Der Patient ist *nicht* Träger dieser Mutation. Gleichzeitig ist diese Konstellation typisch für eine Wildtyp-DNA, die als Positivkontrolle für den Wildtypfilter sowie als Negativkontrolle für den Mutationsfilter eingesetzt wird.

DNA-Probe ist **homozygot** für die zu untersuchende Mutation:

Wildtypfilter - kein Signal nachweisbar

Mutationsfilter - positives Signal

Ein Ergebnis dieser Art wurde für keinen deutschen Patienten gefunden und auch nicht erwartet, da hier klinisch und hämatologisch definierte heterozygote Probanden untersucht wurden. Eine DNA-Probe mit dieser Signalgebung wurde jedoch als Positivkontrolle für den Mutationsfilter und gleichzeitig als Negativkontrolle für den Wildtypfilter verwendet.

DNA-Probe ist **heterozygot** für zu untersuchende Mutation:

Wildtypfilter - positives Signal

Mutationsfilter - positives Signal

Beim Vorliegen dieser Konstellation ist die Mutation der entsprechenden DNA-Probe gefunden und damit die Untersuchung erfolgreich abgeschlossen. Der Patient trägt auf dem einen Allel die Mutation, das andere Allel hingegen ist gesund.

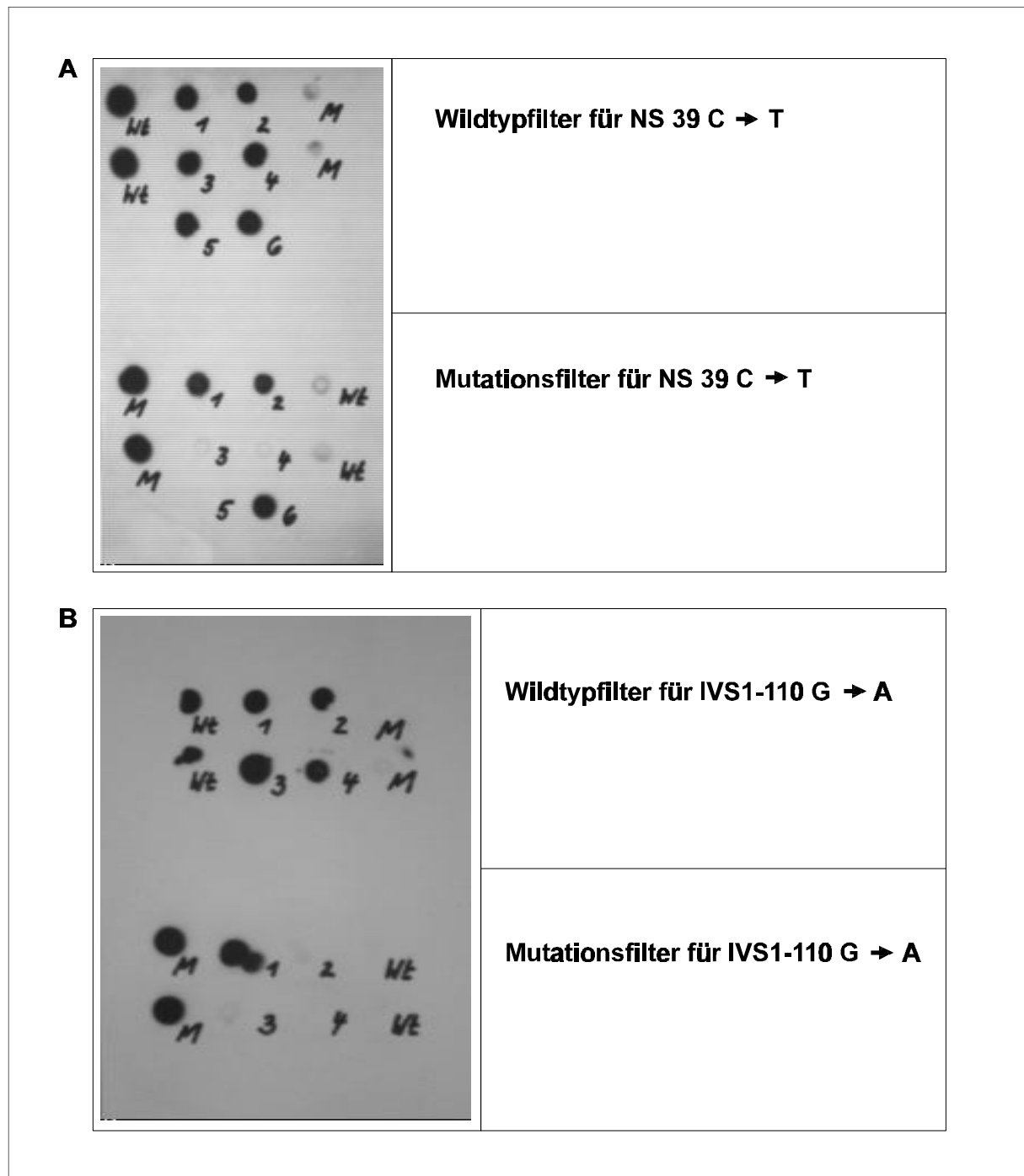


Abb. 9: Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung zum Nachweis der Mutationen im β -Globingen. PCR-amplifizierte β -Globingen-Fragmente von deutschen Probanden mit einer heterozygoten β -Thalassämie wurden als Dot-Blot auf einer Nylonmembran fixiert. Der Wildtypfilter hybridisiert mit dem Wildtyp-Oligonukleotid; der Mutationsfilter mit dem Oligonukleotid, welches die Mutation trägt. Bei "Wt" und "M" handelt es sich um Kontrollproben mit den jeweiligen Wildtypsequenzen oder Mutationen.

A: Proben 1, 2 und 6 hinterlassen jeweils ein Signal auf dem Wildtyp- und dem Mutationsfilter. Per definitionem erfüllen sie damit das Kriterium, heterozygot für die Nonsense-Mutation im Kodon 39 C → T zu sein.

B: Probe 1 hinterläßt jeweils ein Signal auf dem Wildtyp- und dem Mutationsfilter und ist somit heterozygot für den G → A-Basenaustausch an Position 110 des ersten Introns.

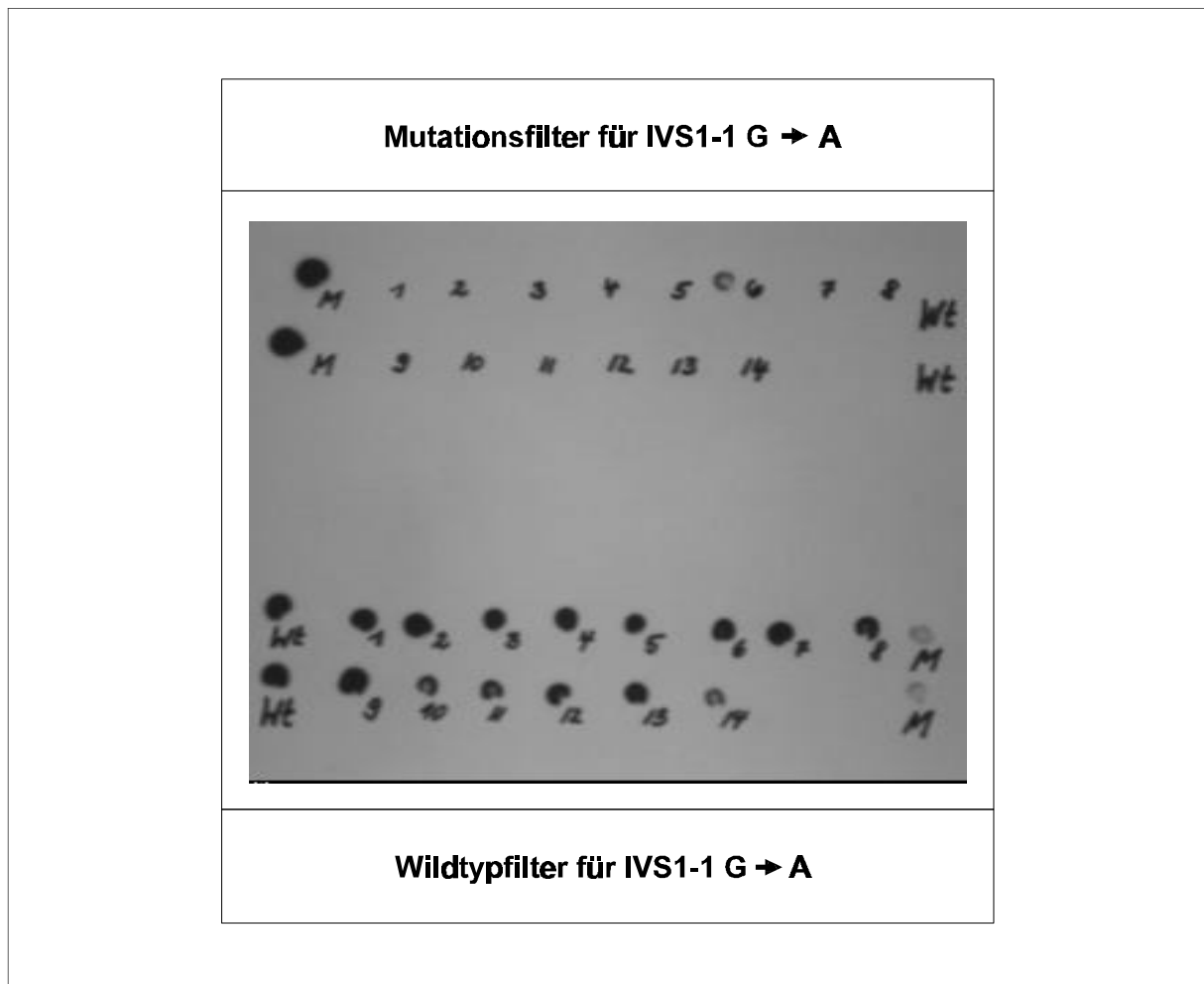


Abb. 10: Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung zum Nachweis der IVS1-1 G \rightarrow A-Mutation. PCR amplifizierte β -Globingen-Fragmente von deutschen Probanden mit einer heterozygoten β -Thalassämie wurden als Dot-Blot auf einer Nylonmembran fixiert. Der Wildtypfilter hybridisiert mit dem Wildtyp-Oligonukleotid; der Mutationsfilter mit dem Oligonukleotid, welches die Mutation trägt. Bei "Wt" und "M" handelt es sich um Kontrollproben mit den jeweiligen Wildtypsequenzen oder Mutationen.

Probe 6 hinterläßt jeweils ein Signal auf dem Wildtyp- und dem Mutationsfilter und ist heterozygot für den G \rightarrow A-Basenaustausch an Position 1 des ersten Introns.

3.1.3. Häufigkeiten der Mutationen bei Probanden deutscher Herkunft

Mit Hilfe des ASO-Screenings als schnelle, gut reproduzierbare und mit hoher diagnostischer Sicherheit einhergehende Methode konnten 75,7 % der β -Thalassämie-Gene bei autochthon Deutschen identifiziert werden. Einige Mutationen waren besonders häufig: NS 39 C \rightarrow T; IVS1-110 G \rightarrow A und IVS1-1 G \rightarrow A (s. Abb. 9 A, B und Abb. 10). Wie aus Tab. 7 hervorgeht, handelt es sich dabei um Mutationen, die sehr stark in den Mittelmeerländern vertreten sind und in der deutschen Bevölkerung einen Anteil von ca. 62,6 % ausmachen. Einige Mutationen kommen in ähnlichen Häufigkeiten wie in Italien vor (NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A, IVS1-1 G \rightarrow A; IVS2-745 C \rightarrow G, FS 6 -A) wohingegen andere mediterrane Mutationen selten sind (IVS1-6 T \rightarrow C, IVS2-1G \rightarrow A) [Cao et al., 1989; Rosatelli et al., 1992] (s. Tab. 8).

Die Ergebnisse der Allel-spezifischen Oligonukleotid-Hybridisierung sind in Tab. 8 zusammengefaßt und dokumentieren im direkten Vergleich die Häufigkeiten dieser β -Thalassämie-Mutationen in der einheimischen deutschen und in der italienischen Bevölkerung.

Mutation	Deutsche (n=214)		Italiener (n=914) ¹
	n	%	%
NS 39 C → T	67	31,3	40,0
IVS1-110 G → A	51	23,8	23,0
IVS1-1 G → A	16	7,5	10,0
IVS1-5 G → C und G → T	10	4,7	< 0,5
IVS2-745 C → G	7	3,3	5,0
- 87 C → T	4	1,8	< 0,5
IVS1-6 T → C	3	1,4	9,9
IVS2-1 G → A	2	0,9	3,9
FS 8/9 +G	1	0,5	o. A. ²
FS 6 -A	1	0,5	1,2
unbekannt	52	24,3	0,4

Tab. 8: Darstellung der ASO-Ergebnisse bei Probanden deutscher Abstammung im Vergleich zur Häufigkeit der β -Thalassämie-Mutationen in der italienischen Bevölkerung. (¹ [Rosatelli et al., 1992]; ² ohne Angabe)

3.2. Identifikation seltener β -Thalassämie Mutationen

3.2.1. Sequenzanalyse

Vorraussetzung für die Anwendung der Kettenabbruchmethode nach Sanger war die Amplifikation aller Proben mit biotinmarkierten Primern. Dafür wurden die Primer 1 und 3 biotinyliert und in Kombination mit Primer 2 bzw. 4 in die PCR-Reaktion eingesetzt (s. unter 2.2.2.2.). Nach erfolgreicher Amplifizierung konnten die Streptavidin-beschichteten Eisenkügelchen an das Biotin-Molekül angelagert und der *sense*-Strang der DNA-Doppelhelix über einen Magneten separiert und direkt in die Sequenzierreaktion entsprechend 2.2.4.3. eingesetzt werden. Die 7 Sequenzierprimer (s. Abb. 5) wurden so gewählt, daß die zu untersuchende Sequenz von 3' nach 5' im Abstand von 150-250 Nukleotiden so aufgearbeitet werden konnte, daß ohne Unterbrechung eine gute Lesbarkeit gewährleistet war.

3.2.2. Seltene Mutationen und ihre Häufigkeiten in der einheimischen deutschen Bevölkerung

Insgesamt wurden 52 DNA-Proben von deutschen Probanden mit einer heterozygoten β -Thalassämie sequenziert. Mit Hilfe der Sequenzanalyse konnten 38 Proben 13 seltenen Mutationen zugeordnet werden. Tab. 9 zeigt dieses Ergebnis, wobei alle Mutationsarten und ihre Häufigkeiten in der deutschen Bevölkerung aufgelistet werden. Zusätzlich gibt sie Aufschluß über das Auftreten dieser Mutationen in den verschiedenen ethnischen Gruppen sowie deren Erstbeschreiber.

Durch die Übersicht werden zwei Mutationen akzentuiert: die Promotormutation an Position -87 C \rightarrow G und die *Frameshift*-Mutation im Kodon 82/83 -G. Beide Mutationen ragen durch ihr deutlich häufigeres Auftreten in der einheimischen deutschen Bevölkerung heraus.

Die Basensubstitution an Position -87, verändert das CACCC-Promotorelement und wurde erstmals 1982 von Orkin et al. [b] publiziert. Dieses Promotorelement beeinflusst die Effizienz der Transkription, so daß dessen Modifikation den Phänotyp der β^{++} -Thalassämie bewirkt, ein Charakteristikum aller bekannten Promotormutationen (s. Abb. 11).

Die *Frameshift*-Mutation im Kodon 82/83 (s. Abb. 14) wurde erstmals in der aserbaidischen Bevölkerung nachgewiesen, die Region der ehemaligen Sowjetunion, in der die β -Thalassämie hauptsächlich anzutreffen ist. Die Deletion resultiert in einem Stop-Kodon, welches 13 Nukleotide 3' liegt und verursacht eine β^0 -Thalassämie [Schwartz et al., 1989]. Später wurde diese Mutation auch in der tschechoslowakischen Bevölkerung gefunden; Indrak et al. identifizierten diese Mutation 1992 bei 7 Probanden, Mitglieder zweier unabhängiger Familien.

Ebenfalls bemerkenswert ist der Phänotyp der 2 Probanden mit der NS 121 G \rightarrow T-Mutation, die bei Nord-West-Europäern mit dem Phänotyp einer dominanten β -Thalassämie beschrieben wurde (s. Abb. 13) [Thein et al., 1990; Kazazian et al., 1992]. Die beiden hier beschriebenen Probanden zeigen typische hämatologische Befunde einer Thalassaemia minor (Hb 10,8 und 11,4 g/dl; MCH 21 und 22 pg; HbA₂ 4,9 und 6,0 %). Klinisch

wurde bei einem dieser beiden Personen jedoch eine leichte Hepatosplenomegalie diagnostiziert.

Mutationstyp	ethnische Gruppe(n)	Publikation	Häufigkeiten bei autochthon Deutschen (n)
A. Transkription			
- 87 C → G	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Orkin et al., 1982 [b]	7
B. RNA-Verarbeitung			
IVS1-1 G → T	Inder, Chinesen	Kazazian et al., 1984	1
IVS1-2 T → C	Schwarzamerikaner	Gonzales-Redondo et al., 1989	4
IVS1-2 T → G	Tunesier	Chibani et al., 1988	1
IVS2-705 T → G	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Dobkin et al., 1983	1
C. RNA-Translation			
<i>Nonsense-Mutationen</i>			
NS 15 TGG → TAG	Inder	Kazazian et al., 1984	1
NS 121 G → T	Polen, Frankreich/Schweiz, Japaner, Engländer	Kazazian et al., 1986 Fei et al., 1989 Yamamoto et al., 1992 Thein et al., 1990	2
<i>Frameshift-Mutationen</i>			
FS 44 -C	Kurden	Kinniburgh et al., 1982	1
FS 51 -C	Ungarn	Ringelmann et al., 1993	1
FS 82/83 -G	Aserbaidshaner, Tschechen	Schwartz et al., 1989 Indrak et al., 1992	12
D. Initiations-Kodon			
ATG → ACG	Jugoslawen	Jankovic et al., 1990	3
ATG → GTG	Japaner	Hattori et al., 1991	2
ATG → ATA	Italiener, Schweden	Saba et al., 1992 Landin et al., 1995	2

Tab. 9: Mittels Sequenzanalyse identifizierte Mutationen.

Die nachfolgenden Abbildungen der Sequenzgele zeigen einen Vertreter pro betroffene Ebene der Genexpression der in Tab. 9 aufgeführten Mutationen.

Abbildung 11 präzisiert den Basenaustausch an Position -87 des β -Globingens. Er steht als Prototyp einer Promotormutation, die unmittelbar das proximale CACCC-Promotorelement (nt 86-90 stromaufwärts des CAPs) betrifft [Orkin et al., 1982 b]. Eine Mutation in dieser Region bewirkt eine Verminderung der Transkriptionseffizienz auf 20-30 % des normalen β -Globingens und resultiert beim Homozygoten in einer Thalassaemia intermedia [Orkin et al., 1984].

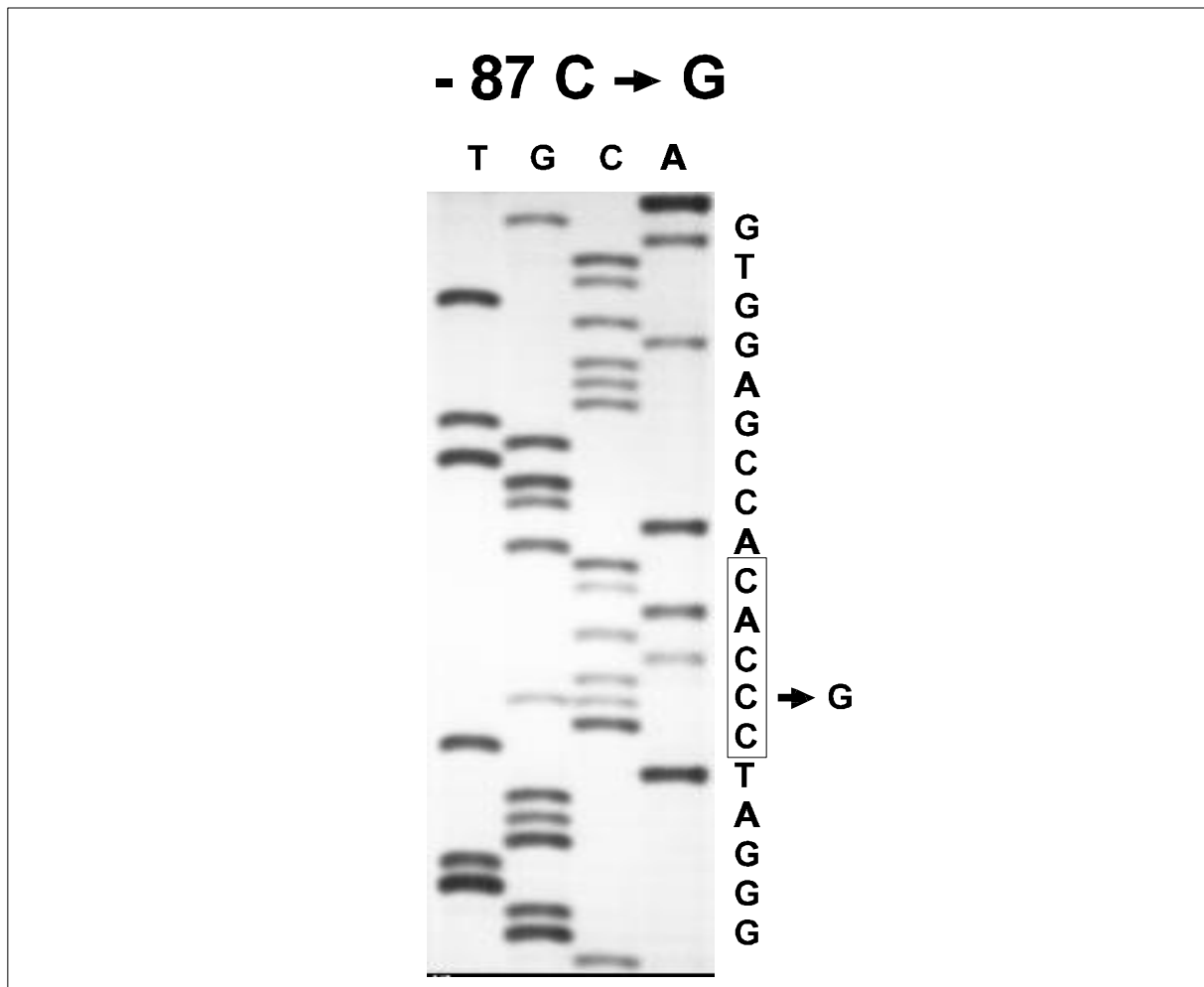


Abb. 11: Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA zur direkten Diagnose einer β -Thalassämie. An Position -87 wird das Cytosin durch ein Guanin ersetzt. Der Basenaustausch betrifft das proximale CACCC -Promotorelement. Die Sequenzierung zeigt hier sowohl das normale C als auch die Mutation (Pfeil), die sich nur auf einem Allel befindet. Das andere Allel ist gesund. Der Proband ist heterozygot für die Mutation an Position -87.

In Abbildung 12 wird der Basenaustausch an Position 705 des 2. Introns dokumentiert, der die Ebene der RNA-Verarbeitung betrifft. Der T zu G-Austausch kreiert eine Sequenz, die exakt einer 5' Spleißstelle entspricht: GAGGTAAGA. Dobkin et al. zeigten 1983 anhand einer RNA-Analyse, daß diese Sequenzveränderung die Möglichkeit gibt, den Vorgang des Spleißens in zwei verschiedene Richtungen ablaufen zu lassen. Erstens kann die mutierte Position 705 als 5' Spleißstelle in Kombination mit der normalen 3' Spleißstelle genutzt werden. Zweitens ist auch die Verwendung eines kryptischen 3' Spleißkonsensus an Position 580 in Kombination mit der normalen 5' Spleißstelle möglich. Welcher Spleißmechanismus im Einzelfall bevorzugt wird, bestimmt die Konkurrenz zwischen der normalen 5' und der neu entstandenen Spleißstelle an Position

705 des 2. Introns. Die RNA-Analysen von Dobkin et al. [1983] konnten nachweisen, daß beide Spleißmechanismen auch gleichberechtigt nebeneinander genutzt werden. Diese Experimente zeigen, daß eine Mutation innerhalb des Introns zur Nutzung einer kryptischen Spleißstelle führen kann, obwohl sowohl der normale Spleißkonsensus als auch die kryptische Spleißstelle selbst nicht mutiert sind. Zum Erhalt einer Genfunktion ist demzufolge auch die Konservierung von Intronsequenzen notwendig [Dobkin et al., 1983].

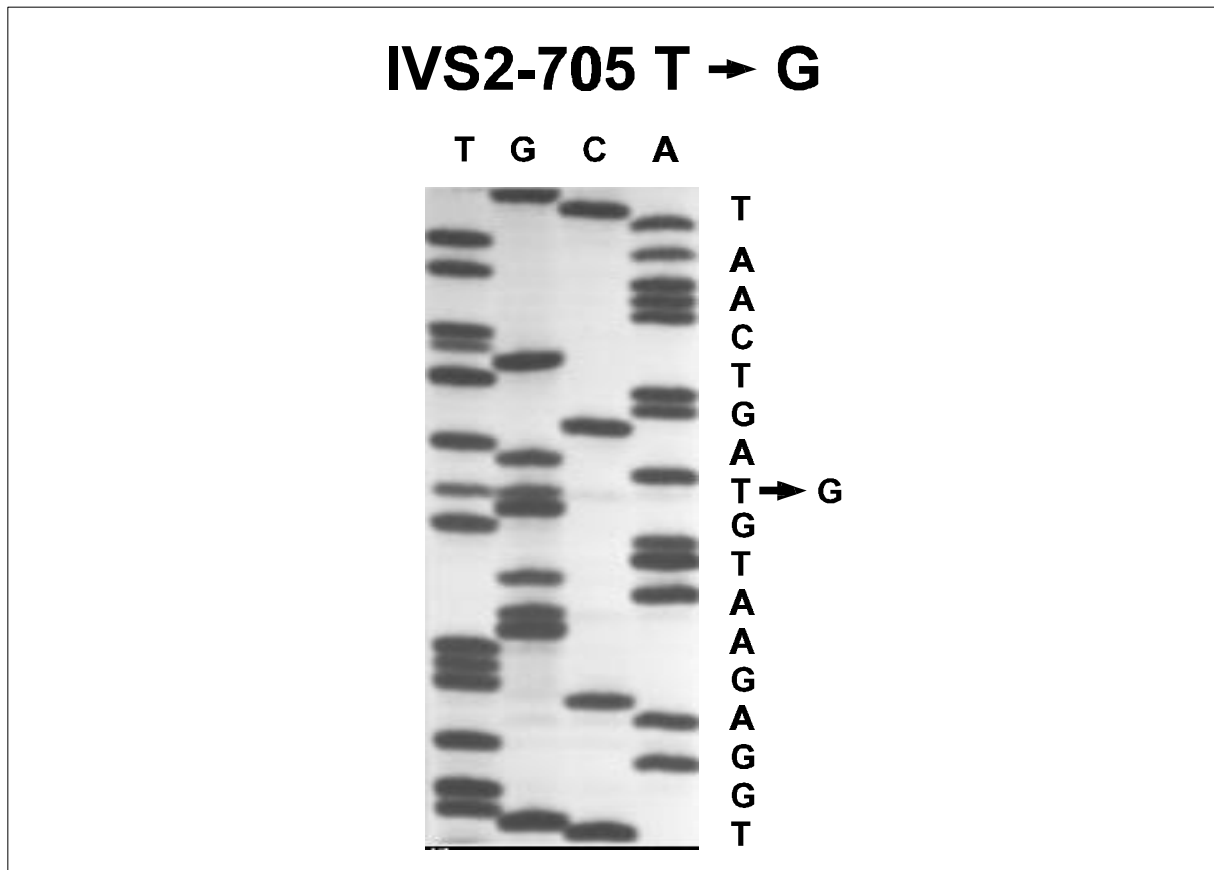


Abb. 12: Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA zur direkten Diagnose einer β -Thalassämie. An Position 705 des zweiten Introns wird das Thymin durch ein Guanin ersetzt, wodurch eine neue 5' Spleißsequenz entsteht. Die Sequenzierung zeigt hier sowohl das normale T als auch die Mutation (Pfeil), die sich nur auf einem Allel befindet. Das andere Allel ist gesund. Der Proband ist heterozygot für die IVS2-705 T→G-Mutation.

Abbildung 13 illustriert die *Nonsense* Mutation im Kodon 121. Dabei handelt es sich um eine dominant vererbare Form der β -Thalassämie, die gewöhnlich bei Nordeuropäern gefunden wird. Das Charakteristikum dieser Exon 3-Mutation besteht in der Existenz sogenannter Innenkörper, die man in peripheren Erythrozyten nachweisen kann. *Nonsense*-Mutationen, deren vorzeitige Termination Reste bis zu 72 Nukleotiden entstehen lassen (z. B. NS 15, NS 39, NS 71/72) führen normalerweise zum proteolytischen Abbau dieser verkürzten β -Ketten. Anders verhält es sich bei der NS 121, bei der ein längerer Rest von 120 nt entsteht. Diese zwar ebenfalls verkürzten Produkte sind im Gegensatz zu den oben beschriebenen *Nonsense*-Mutationen in der Lage, Häm zu binden und entgehen dadurch höchstwahrscheinlich dem proteolytischen Abbau. Allerdings neigen sie zur Aggregation und bilden möglicherweise gemeinsam mit dem Überschuss an α -Ketten die charakteristischen Innenkörper [Weatherall et al., 1973; Thein et al., 1992].

Bei dieser Exon 3-Mutation handelt es sich um eine seltene Form der β -Thalassämie, die in Anbetracht ihrer Schwere nicht dem positiven Selektionsdruck unterliegt, wie es für die rezessiven Formen typisch ist. Das erklärt auch die niedrigen Genfrequenzen in Populationen, in denen Malaria endemisch ist [Thein et al., 1990; Kazazian et al., 1989].

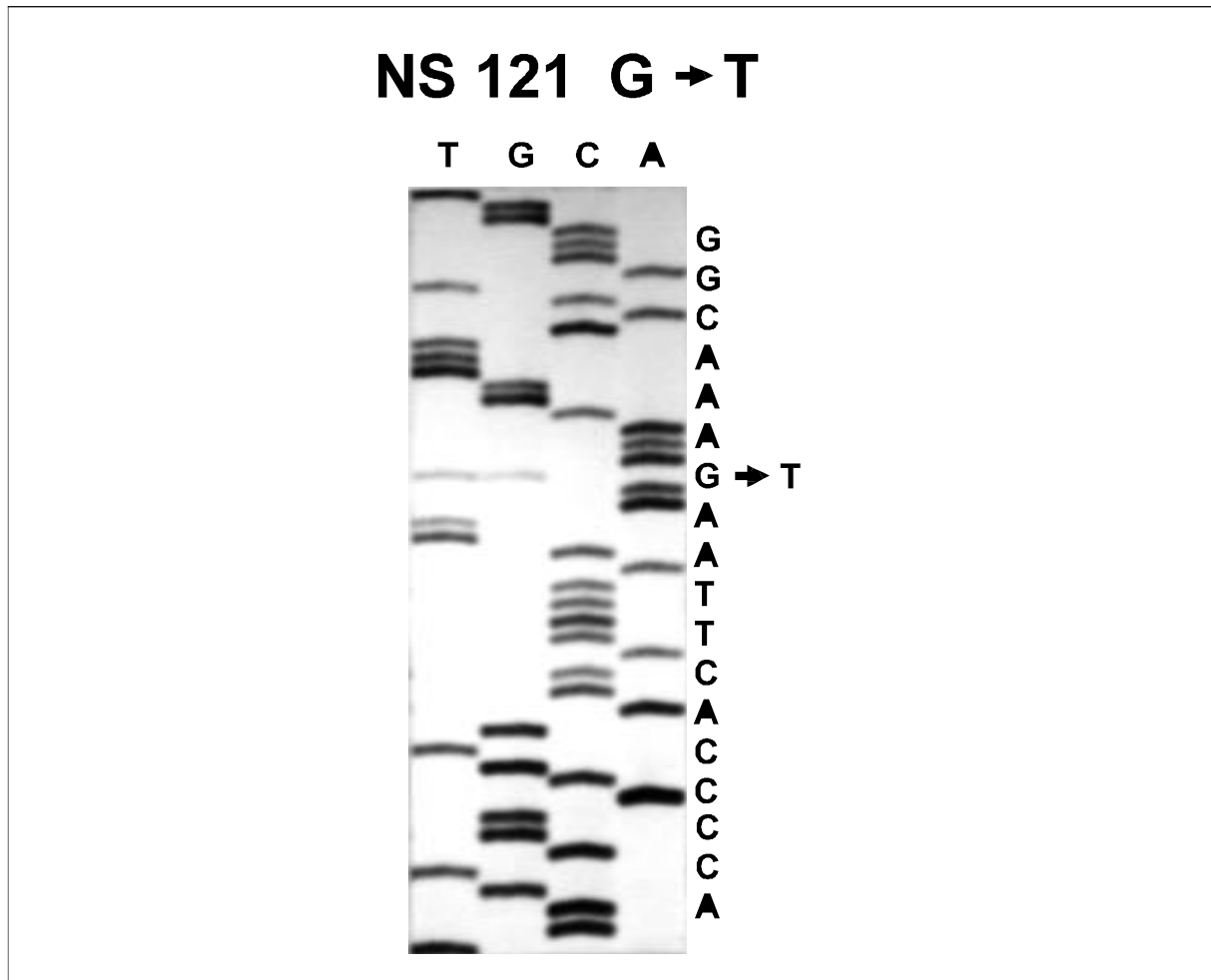


Abb. 13: Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA zur direkten Diagnose einer β -Thalassämie. Durch den G zu T-Basenaustausch im Kodon 121 des β -Globingens entsteht das Stopkodon TAA. Basensubstitutionen, die einen vorzeitigen Stop der Translation verursachen, bezeichnet man als *Nonsense*-Mutationen.

Die Sequenzierung zeigt hier sowohl das normale G als auch die Mutation (Pfeil), die sich nur auf einem Allel befindet. Das andere Allel ist nicht betroffen. Der Proband ist heterozygot für die *Nonsense*-Mutation im Kodon 121 (G → T).

Die *Frameshift*-Mutation am Übergang von Kodon 82/83 betrifft die Ebene der RNA-Translation. Der Verlust eines Guanins verschiebt das Leseraster für die nachfolgenden Nukleotide, was zum Einbau falscher Aminosäuren und zum vorzeitigen Abbruch der Translation an einem neu entstandenen Stopkodon 13 Nukleotide stromabwärts führt. Die in Abb. 14 gezeigte Deletion wurde von Schwartz et al. [1989] in der aserbaidischen Bevölkerung und Indrak et al. [1992] in der tschechoslowakischen Bevölkerung nachgewiesen.

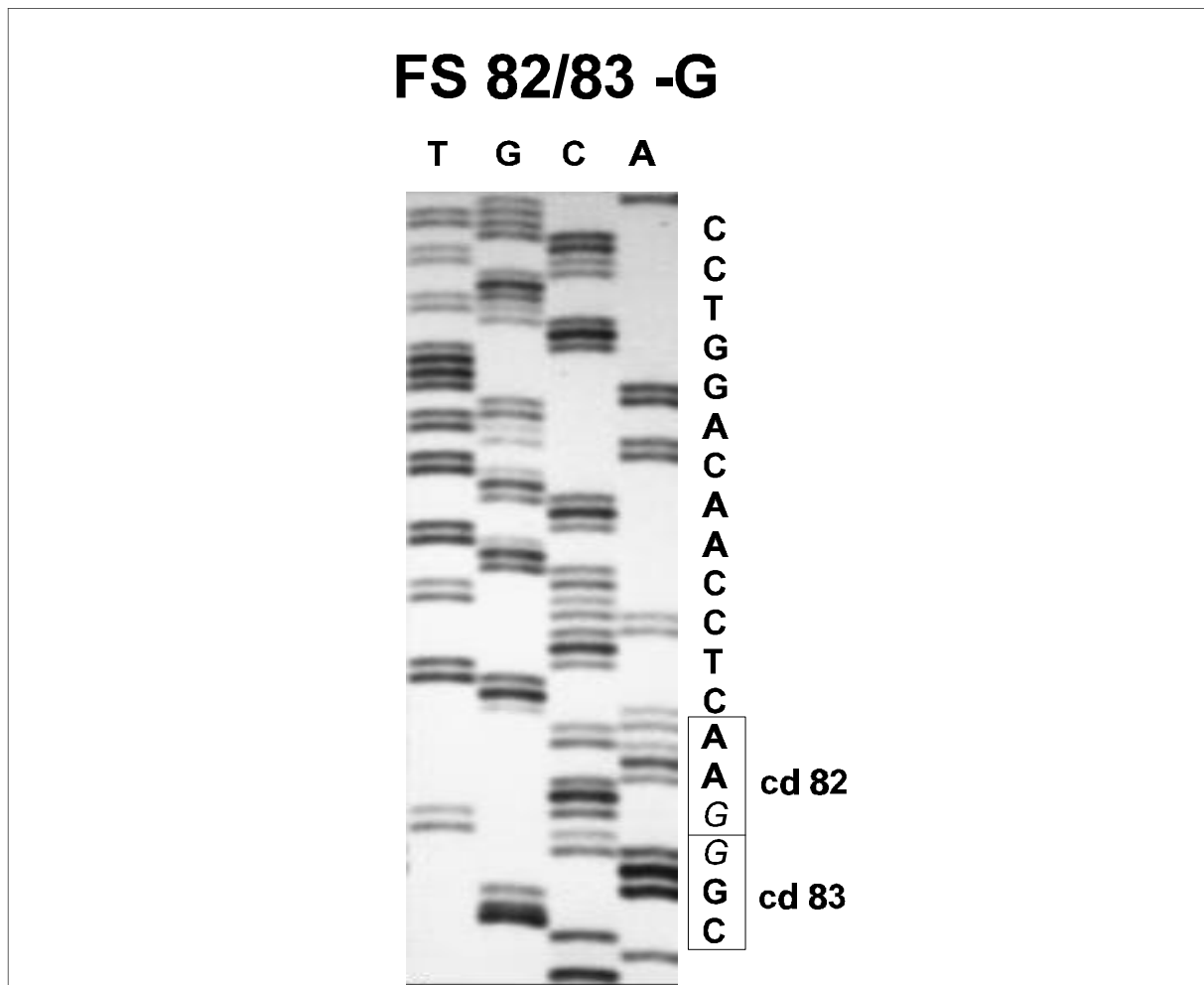


Abb. 14: Durch den Verlust eines Guanins am Übergang vom Kodon 82/83, entsteht eine *Frameshift*-Mutation. Hier ist das typische Nukleotidmuster eines heterozygot betroffenen Probanden festgehalten, dem nur auf einem Allel das Guanin fehlt. Dieser Umstand läßt die Nukleotidabfolge beider Allele gegeneinander verschieben, sodaß sich an manchen Positionen zwei Basen auf gleicher Höhe befinden.

Die Fotografie des Sequenzgels in Abbildung 15 zeigt den A zu G-Basenaustausch im Initiationskodon des β -Globingens. Bei der Analyse der DNA-Proben deutscher Probanden wurden zusätzlich die T zu C- und G zu A-Substitution des gleichen Kodons registriert. Jede Mutation des Initiationskodons resultiert in eine β^0 -Thalassämie, da sie die Initiation der Translation verhindert. Dadurch wird deutlich, daß es keine funktionelle Alternative für das Triplet ATG gibt. Würde das nächstgelegene ATG außerhalb des Leserahmens im Kodon 21/22 benutzt, entstünde daraus ein *Frameshift*, dessen Terminationskodon 118 Nukleotide

stromabwärts läge. Das mutmaßliche Peptid dieser *Frameshift*-Mutation wurde niemals gefunden.

Bei Initiationskodon-Mutationen im α -Globingen sank der mRNA-Anteil um das Drei- bis Vierfache. Diese Auswirkung wird für gleichartige Mutationen im β -Globingen erwartet [Hattori et al., 1991].

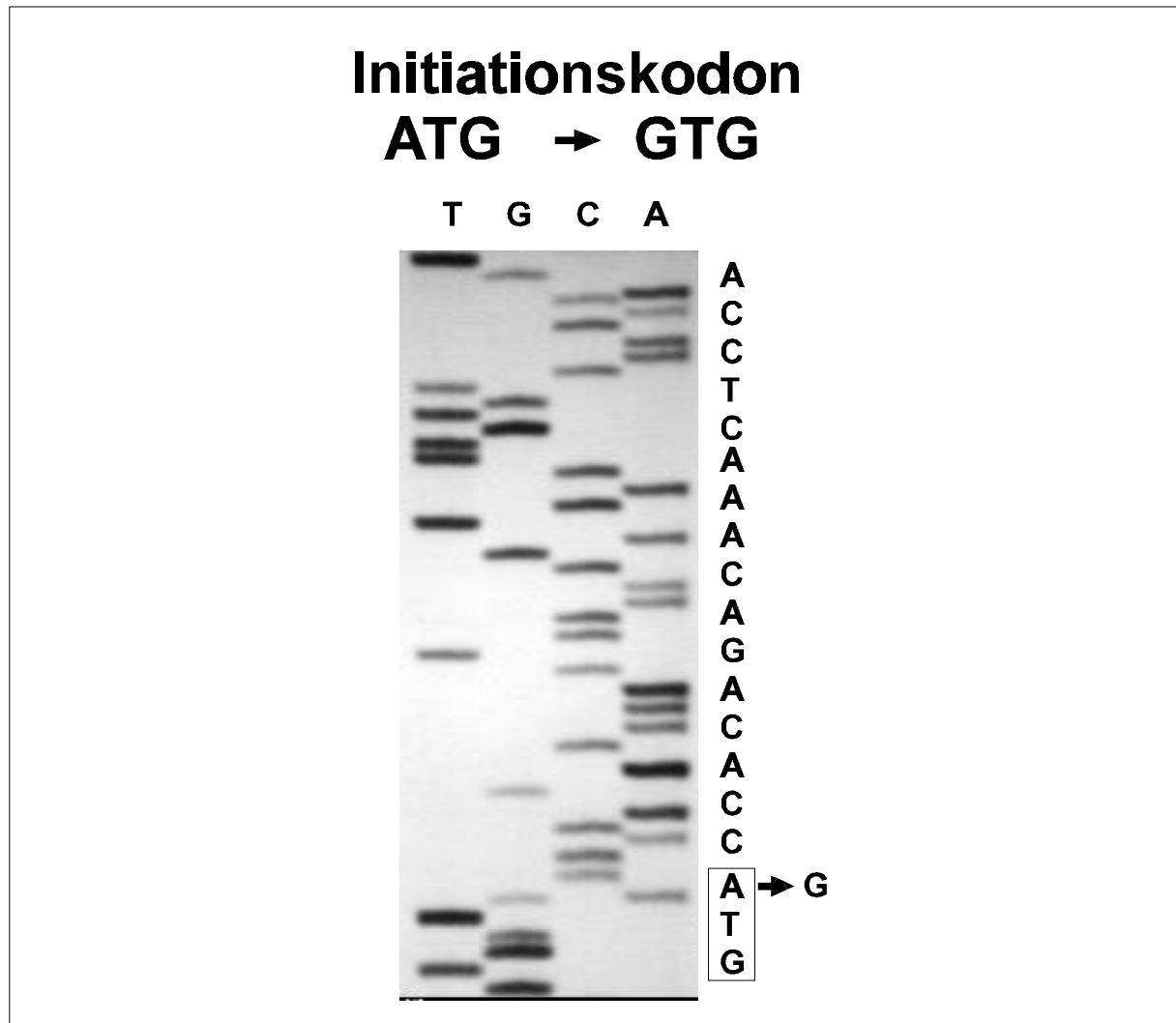


Abb. 15: Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA zur direkten Diagnose einer β -Thalassämie. Der Ersatz eines Adenins durch ein Guanin verändert die normale Sequenz des Initiationskodons ATG. Die Initiation der Translation wird verhindert.

Die Sequenzierung zeigt hier sowohl das normale A als auch die Mutation (Pfeil), die sich nur auf einem Allel befindet. Das andere Allel ist nicht mutiert. Der Proband ist heterozygot für diese genetische Veränderung.

3.3. Identifizierung einer seltenen und einer neuen Mutation

3.3.1. Restriktionsanalyse

Es wurde bereits unter 2.2.5. darauf hingewiesen, daß die Restriktionsanalyse hervorragend für das Screening der Sichelzellmutation geeignet ist. Die Sichelzellmutation zerstört die Restriktionsstelle des *DdeI*-Enzyms im Kodon 6 des normalen β -Globingens. In Abbildung 16 A ist das β -Globingen mit den Schnittstellen des Restriktionsenzym *DdeI* (Pfeile) für das normale β -Globingen (β^A) und für die Sichelzellmutation (β^S) schematisch dargestellt. Bei einem Probanden ohne Sichelzellmutation sind β^A -spezifische Fragmente mit einer Länge von 201, 180, 104, 89 und 88 Basenpaaren zu unterscheiden. Dahingegen läßt ein Träger der Mutation das Fragment mit einer Länge von 201 Basenpaaren vermissen, so daß zwangsläufig ein größeres Fragment mit 381 Basenpaaren entsteht. Dieses abnorm große Fragment und der gleichzeitige Nachweis von HbS durch die Hb-Elektrophorese läßt die Identifikation eines Patienten mit Sichelzellanämie zu. Das typische Bild eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels zeigt Abbildung 16 B.

3.3.2. Darstellung eines ungewöhnlichen Restriktionsmusters nach *DdeI*-

Verdau

Für die deutschen Probanden mit einer heterozygoten β -Thalassämie ist ein Screening mittels *DdeI*-Restriktionsverdau ebenso sinnvoll, da dadurch die *Frameshift*-Mutation im Kodon 6 schnell entdeckt werden kann bzw. der mutierte Bereich des β -Globingens auf wenige Basenpaare eingegrenzt wird. Dieser eingegrenzte Bereich entspricht exakt der Erkennungssequenz des *DdeI*-Restriktionsenzym — CTNAG. Das Bild eines Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels mit der *Frameshift*-Mutation im Kodon 6 unterscheidet sich allerdings nicht von der Darstellung des Restriktionsverdaus einer Sichelzellmutation (Vgl. Abb. 7 und 16). Daher gelingt der endgültige Nachweis der FS 6 -A erst mittels Sequenzanalyse.

Abweichendes von eben beschriebenen Restriktionsmustern für die Sichelzellmutation bzw. die FS 6 -A ist auf der Abbildung 16 B sichtbar. Neben den Spuren, die den Lauf von DNA-Proben homozygoter (SS) und heterozygoter (AS) Träger der Sichelzellmutation zeigen, beinhalten die Spuren 1-4 ein untypisches Restriktionsmuster. Den DNA-Proben dieser Spuren fehlt das Fragment mit der Länge von 381 bp, statt dessen tritt ein Fragment mit einer Länge von 289 bp in Erscheinung. Das Bild der Agarosegelelektrophorese ist wie folgt zu interpretieren: Das Restriktionsenzym erkennt die Schnittstelle am Übergang von Intron 1 zum Exon 2 nicht und läßt dadurch ein Bruchstück mit 289 bp Länge entstehen (s. Abb. 16 A: $\beta^T, \uparrow = DdeI$ -Schnittstellen für β -Thalassämie). Die Abbildung 17 veranschaulicht die Sequenz des β -Globingens am Übergang von Intron 1 zu Exon 2, hebt die Schnittstelle für das *DdeI*-Enzym deutlich hervor und markiert dadurch den Bereich der mutierten Sequenz. Welche der 5 Basen jedoch betroffen war, legte erst die Sequenzanalyse offen.

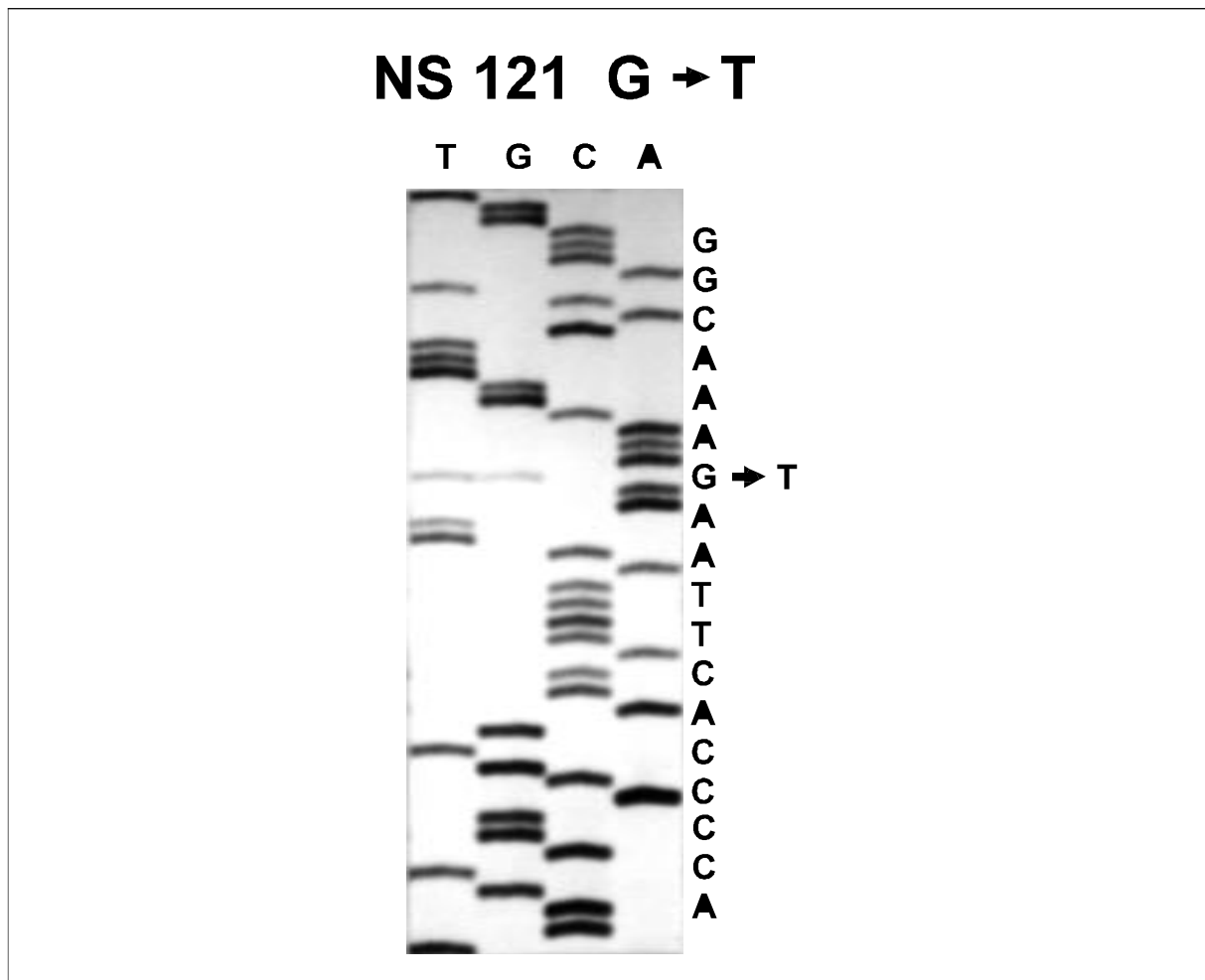


Abb. 16: Restriktionsanalyse PCR-amplifizierter DNA am Beispiel der Sichelzellmutation sowie zweier β -Thalassämie Mutation am Übergang von Intron 1 zu Exon 2.

A dokumentiert den relevanten Teil des β -Globingens mit den als Winkelpfeile dargestellten PCR-Primern und Restriktionsstellen des Enzyms *DdeI* (\uparrow). Gleichzeitig werden die Veränderungen des Restriktionsmusters durch die Sichelzell-Krankheit (β^S, \uparrow) und der IVS1-130 G \rightarrow C bzw. IVS1-129 G \rightarrow A (β^T, \uparrow) markiert.

B zeigt ein Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit *DdeI*-verdauten PCR-Fragmenten. Die Spuren beinhalten von links nach rechts: Marker ϕ X 174 *HAE* III (M), unverdautes PCR-Fragment (U), Kontroll-DNA eines Gesunden (AA), einen homozygoten (SS) und einen heterozygoten (AS) Träger einer Sichelzellmutation, einen heterozygoten Träger der IVS1-129 A \rightarrow G (1), einen Homozygoten (2) und zwei Heterozygote (3, 4) für die IVS1-130 G \rightarrow C-Mutation.

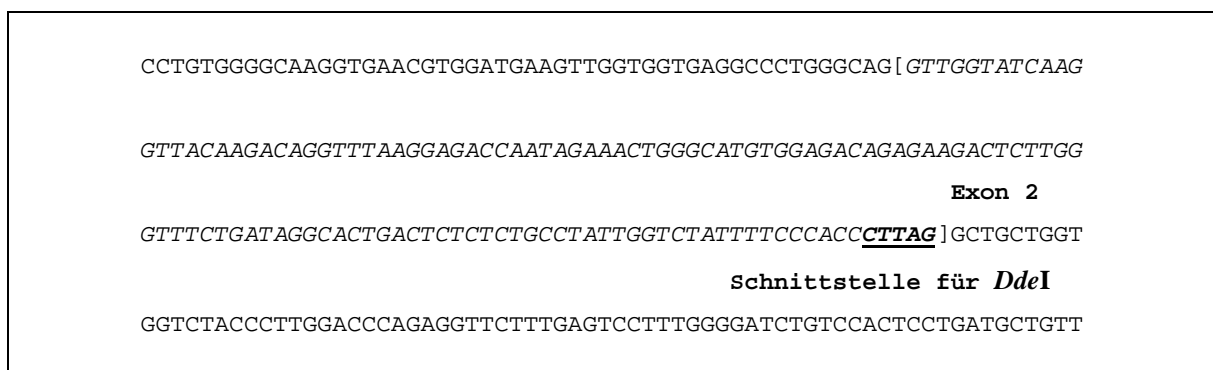


Abb. 17: Ausschnitt des β -Globingens mit *DdeI*-Schnittstelle am Übergang von Intron 1 zu Exon 2 (Position IVS1-126-130).

3.3.3. Nachweis der Mutationen mittels Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse demonstrierte im oben genannten Fall zwei verschiedene Mutationen. Erstere verursacht einen G → C-Basenaustausch an Position 130 des 1. Introns (s. Abb. 18), eine Mutation, die Öner et al. 1990 bei Türken und Yamamoto et al. 1992 bei Japanern identifizierten. Dabei handelt es sich um eine Mutation, die den kritischen Konsensus (AG) des Spleißakzeptors betrifft. Dessen Veränderung inhibiert vermutlich die RNA-Verarbeitung, da insbesondere diese Konsensussequenz für das effektive Spleißen der RNA eine essentielle Rolle spielt. So besteht die Möglichkeit, daß im Falle dieser Mutation eine kryptische Spleißstelle benutzt wird, die Intron 1, Exon 2 und Intron 2 herausschneidet und dadurch Exon 1 und Exon 3 unmittelbar miteinander verknüpft. Bei homozygot betroffenen Patienten resultiert dieser abnorme Spleißvorgang in einen β°-Phänotyp [Yamamoto et al., 1992].

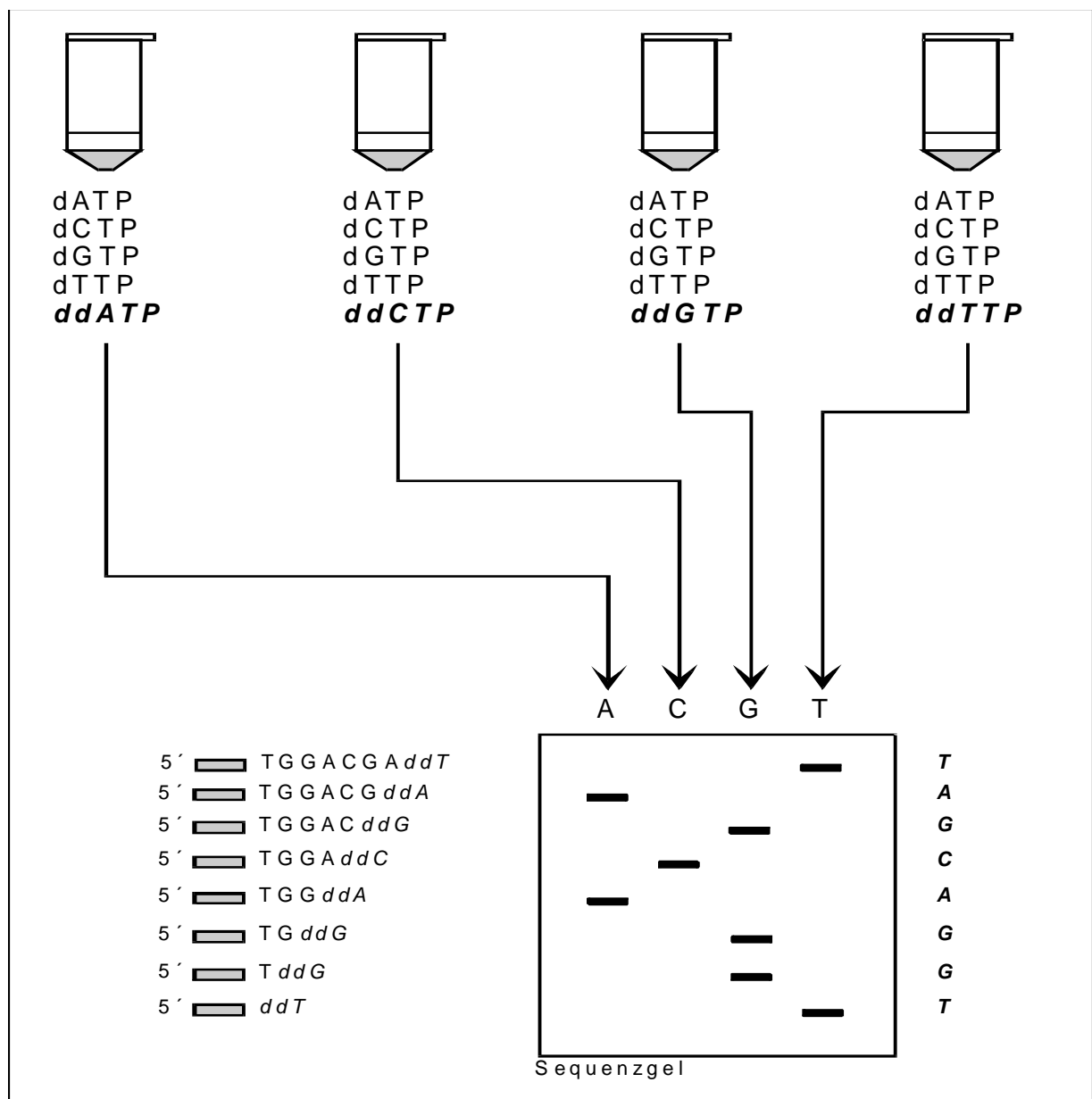


Abb. 18: Gegenüberstellung der G → C-Mutation an Position 130 und der A → G-Mutation an Position 129 des ersten Introns. Diese Mutationen beeinträchtigen über die Veränderung des AG-Spleißakzeptors die Effektivität des Spleißvorganges.

Beide Probanden tragen die dargestellten Sequenzänderungen im β -Globingen auf einem Allel und sind somit heterozygot für die entsprechende β -Thalassämie-Mutation.

Die zweite identifizierte Mutation verfälscht ebenfalls den Konsensus des Spleißakzeptors. Betroffen ist in diesem Fall die Position 129 des 1. Introns:

3.3.4. IVS1-129 A \rightarrow G: Eine *neue* Mutation.

Eine Basensubstitution an dieser kritischen Position im β -Globingen am Übergang vom ersten Intron zum zweiten Exon stellt weltweit ein Novum innerhalb der molekularbiologischen Aufarbeitung des β -Globingens bezüglich der Erforschung der β -Thalassämie dar. Vergleichbare Ergebnisse liegen von Antonarakis et al. [1984], Atweh et al. [1985] und Padanilam & Huisman [1986] vor, deren Veröffentlichungen Basensubstitutionen an Stelle 849 des β -Globingens (IVS2-849) beschreiben, die ebenfalls den Spleißakzeptor mutieren lassen, jedoch am Übergang von Intron 2 zum Exon 3.

Abbildung 19 dokumentiert die neue Mutation an Position 129 des ersten Introns anhand der Fotografie eines Sequenzgels und erläutert ihre Lage im β -Globingen durch eine graphische Darstellung.

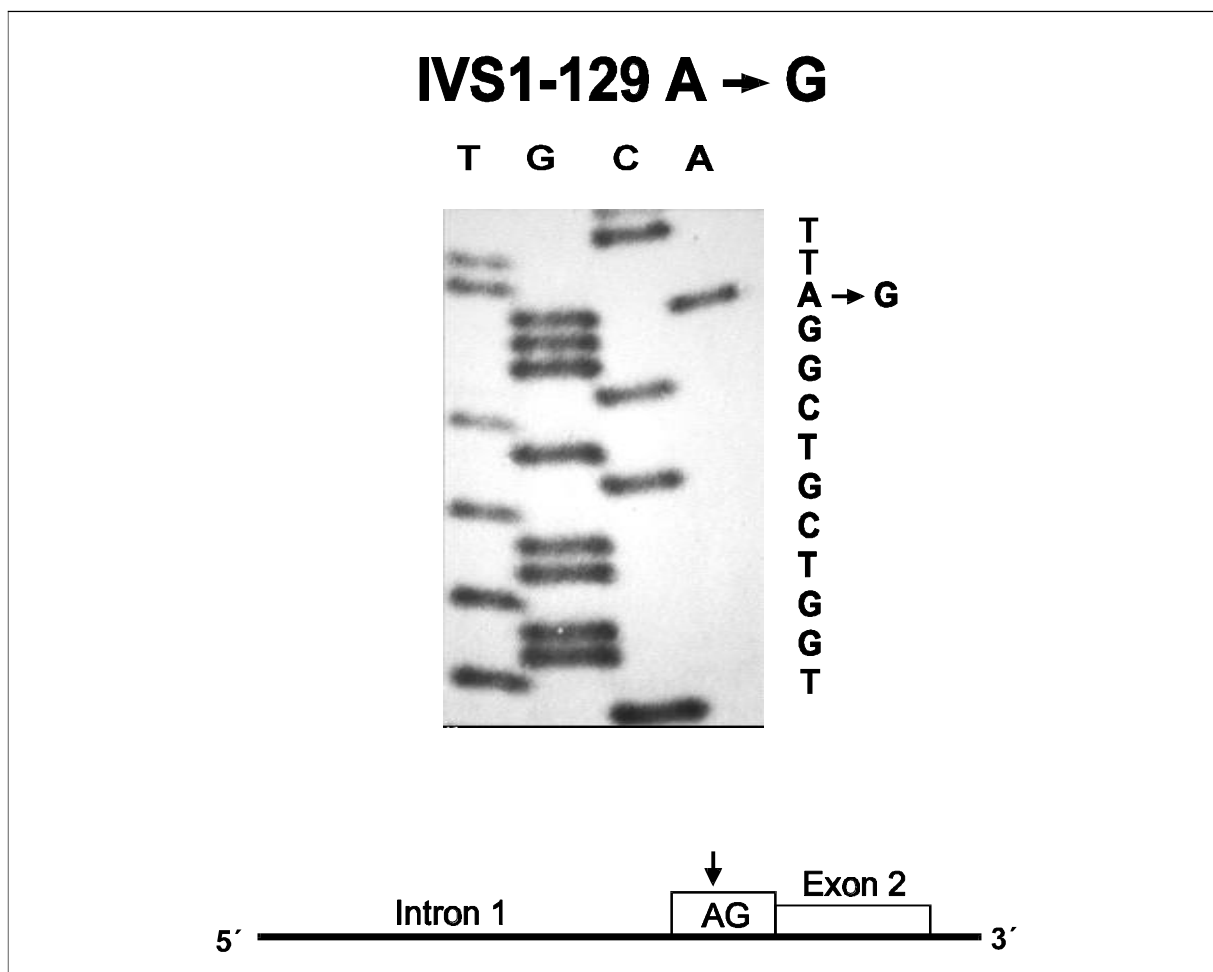


Abb. 19: Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA zur direkten Diagnose einer β -Thalassämie. Der A zu G-Basenaustausch an Position 129 des ersten Introns betrifft den AG-Spleißakzeptor am Übergang von Intron 1 zu Exon 2. Die Sequenzierung zeigt hier sowohl das normale A als auch die Mutation (Pfeil), die sich nur auf einem Allel befindet. Das andere Allel ist nicht mutiert. Der Proband ist heterozygot für diese genetische Veränderung.

3.4. Zusammenfassung aller identifizierten Mutationen

Zur molekularen Charakterisierung der Probanden deutscher Herkunft wurden drei verschiedene molekularbiologische Methoden angewandt: die Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung, die Sequenz- und die Restriktionsanalyse. Zusätzlich wurden die Ergebnisse einer Analyse durch die Anwendung einer zweiten unabhängigen Methode gesichert bzw. Wiederholungsuntersuchungen durchgeführt.

Insgesamt konnten 96,3 % (206/214) der Probanden genotypisch aufgearbeitet werden, wobei 75,7 % (162/214) der Ergebnisse auf dem Nachweis mittels ASO beruhen und 20,6 % (44/214) der Proben durch Sequenz- und Restriktionsanalyse charakterisiert wurden.

Bei den verbleibenden 8 Probanden (3,7 %) konnten auch nach Sequenzierung des β -Globingens keine, die vorhandene β -Thalassämie erklärenden Veränderungen gefunden werden. Darunter zählen auch zwei Probanden, die aufgrund unzureichender DNA-Menge nicht vollständig sequenziert werden konnten.

Nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengefaßt, geordnet nach Mutationsarten, deren Auftreten in den verschiedenen ethnischen Gruppen sowie ihre Häufigkeiten in der deutschen Bevölkerung (n).

Mutationsart	Typ	ethnische Gruppe(n)	Publikation	n	(%)
A. Transkription					
- 87 C \rightarrow G	β^+	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Orkin et al., 1982 [b]	7	3,3
- 87 C \rightarrow T	β^+	Deutschland/Italien	Kulozik et al., 1991 [a]	4	1,8
B. RNA- Verarbeitung					
<i>junction site</i>					
IVS1-1 G \rightarrow A	β°	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Orkin et al., 1982 [b]	16	7,5
IVS1-1 G \rightarrow T	β°	Inder Chinesen	Kazazian et al., 1984	1	0,5
IVS1-2 T \rightarrow C	β°	Schwarzamerikaner	Gonzales-Redondo et al., 1989	4	1,8
IVS1-2 T \rightarrow G	β°	Tunesier	Chibani et al., 1988	1	0,5
IVS1-130 G \rightarrow C	β°	Türken	Öner et al., 1990	5	2,3
IVS1-129 A \rightarrow G	?	Japaner	Yamamoto et al., 1992		
		Deutsche	Schwarz et al., 1997	1	0,5
IVS2-1 G \rightarrow A	β°	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Treismann et al., 1982	2	0,9
		Tunesier	Chibani et al., 1988		
		Schwarzamerikaner	Wong et al., 1986		

Consensus site					
IVS1-5 G → C	β ⁺	Inder Chinesen Melanesen	Treismann et al., 1983 Kazazian et al., 1984	3	1,4
IVS1-5 G → T	β ⁺	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Cheng et al., 1984 Atweh et al., 1987	7	3,3
IVS1-6 T → C	β ⁺	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Orkin et al., 1982 [b]	3	1,4
Intron-Substitutionen					
IVS1-110 G → A	β ⁺	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Spritz et al., 1981; Westaway & Williamson, 1981	51	23,8
IVS2-705 T → G	β ⁺	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Dobkin et al., 1983	1	0,5
IVS2-745 C → G	β ⁺	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Orkin et al., 1982 [b]	7	3,3
C. RNA-Translation					
Nonsense-Mutationen					
NS 39 C → T	β ^o	Bevölkerung des Mittelmeerraumes	Trecartin et al., 1981	67	31,3
NS 15 G → A	β ^o	Inder	Kazazian et al., 1984	1	0,5
NS 121 G → T	β ^o	Polen Frankreich/Schweiz Japaner Engländer	Kazazian et al., 1986 Fei et al., 1989 Yamamoto et al., 1992 Thein et al., 1990	2	0,9
Frameshift-Mutationen					
FS 6 -A	β ^o	Bevölkerung des Mittelmeerraumes Schwarzamerikaner	Kazazian et al., 1983 Gonzales-Redondo et al., 1988	1	0,5
FS 8/9 +G	β ^o	Inder	Kazazian et al., 1984	1	0,5
FS 44 -C	β ^o	Kurden	Kinniburgh et al., 1982	1	0,5
FS 51 -C	β ^o	Ungarn	Ringelmann et al., 1993	1	0,5
FS 82/83 -G	β ^o	Aserbaidshaner Tschechoslowaken	Schwartz et al., 1989 Indrak et al., 1992	12	5,6
D. Initiations-Kodon-Mutationen					
ATG → ACG	β ^o	Jugoslawen	Jankovic et al., 1990	3	1,4
ATG → GTG	β ^o	Japaner	Hattori et al., 1991	2	0,9
ATG → ATA	β ^o	Italiener Schweden	Saba et al., 1992 Landin et al., 1995	2	0,9

Tab.10: Gesamtübersicht aller identifizierten Mutationen.

4. Diskussion

4.1. Die β -Thalassämie in der einheimischen deutschen Bevölkerung

Die β -Thalassämie ist in der einheimischen Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland sowie in anderen Ländern Nord-West-Europas eine seltene Erkrankung. Bei der in dieser Arbeit molekular charakterisierten Gruppe von 214 Probanden deutscher Herkunft handelt es sich um ein einmalig großes Kollektiv einer nicht-endemischen Region. Es gelang die vollständige genotypische Aufarbeitung von 96,3 % der Probanden. Dabei entsprechen ca. 2/3 der identifizierten Mutationen bei autochthon Deutschen dem mediterranen Mutationsspektrum. Einige Mutationen kommen in ähnlichen Häufigkeiten wie in der italienischen Bevölkerung vor: NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A, IVS1-1 G \rightarrow A, IVS2-745 C \rightarrow G und FS 6 -A (s. Tab 8). Andere mediterrane Mutationen sind in der einheimischen deutschen Bevölkerung seltener: IVS1-6 T \rightarrow C und IVS2-1 G \rightarrow A [Cao et al., 1989; Rosatelli et al., 1992]. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen von Laig et al. [1990], bei dessen Untersuchung alle charakterisierten 26 Gene (26/40) deutscher Heterozygoter typisch mediterrane Mutationen zeigten. Die Vermutung, daß die β -Globin-Gen-Mutationen in der deutschen Bevölkerung ihren Ursprung im Mittelmeerraum haben, wird anhand der vorliegenden zahlenmäßig großen Untersuchung bekräftigt. Historisch gesehen gibt es drei größere Zeiträume, die die Ansiedlung von Thalassämie-Genen in der deutschen Bevölkerung denkbar machen. Dazu gehören die römische Besetzung Nordeuropas, die Ansiedlung von italienischen Gastarbeitern um 1900 in Deutschland [Meyers, 1904] und die umfangreichen Populationsbewegungen der 60iger Jahre, die bis heute fortbestehen. Dabei wird jedoch die sogenannte "römische Hypothese" abgelehnt, da das Überleben eines Gens über 60-70 Generationen ohne Selektionsdruck unwahrscheinlich ist. Ebenfalls nicht ursächlich für das Vorhandensein von Thalassämie-Genen erscheinen die Populationsbewegungen der letzten 35 Jahre, da alle Probanden nach Befragung verwandtschaftliche Beziehungen zu Bevölkerungen der Endemiegebiete verneinten. Bei den untersuchten Probanden handelt es sich in erster Linie um ältere Erwachsene, denen direkte Vorfahren aus dem Mittelmeerraum sicher bekannt sein müßten. Diese Überlegungen machen deutlich, daß die italienischen Gastarbeiter, die um die Jahrhundertwende in Deutschland lebten, am ehesten als "Importeure der mediterranen β -Thalassämie-Gene" [Laig et al., 1990] angesehen werden können.

Das übrige Mutationsspektrum setzt sich aus sehr seltenen und einer neuen Mutation zusammen. Einen besonderen Stellenwert erreicht die Frameshift-82/83-Mutation, die mit einem Anteil von 5,6 % in der einheimischen deutschen Bevölkerung gefunden wurde und vorher nur in 2 tschechoslowakischen Familien [Indrak et al., 1992] und in einer Familie aus Aserbaidschan [Schwartz et al., 1989] beschrieben wurde. Der autochthone Ursprung dieser Mutation erscheint aus diesem Grunde glaubhaft. Dies gilt höchstwahrscheinlich auch für alle die Mutationen, die nur bei kleinen Probandenzahlen oder gar Einzelpersonen gefunden wurden (s. Tab. 10).

Bei der hier neu vorgestellten Mutation handelt es sich nach aller Wahrscheinlichkeit nach um eine β^0 -Mutation, die den AG-Spleißakzeptor am Übergang vom 1. Intron zum 2. Exon verändert. Da diese Basensubstitution bisher bei keiner anderen Population beschrieben wurde, kann ebenfalls ein autochthoner Ursprung angenommen werden.

Die restlichen 6 Fälle (nicht berücksichtigt werden die 2 Probanden, die nicht vollständig sequenziert werden konnten), bei denen keine β -Globingen-Mutation nachgewiesen werden konnte, sind von beträchtlichem theoretischen Interesse. Diese Probanden könnten β -Thalassämiedeterminanten tragen, die nicht mit dem β -Globingen-Komplex gekoppelt sind. Familienuntersuchungen wären hilfreich, um diese Hypothese zu erhärten.

In dieser Arbeit erhobenen Daten unterstreichen die Notwendigkeit für den Kliniker, die β -Thalassämie als eine Differentialdiagnose der mikrozytären, hypochromen Anämie in der einheimischen deutschen Bevölkerung zu berücksichtigen, auch dann, wenn eine Verwandtschaft mit der Bevölkerung des Mittelmeerraumes ausgeschlossen wird.

4.1.1. Vergleich zwischen dem Mutationsspektrum in der einheimischen deutschen Bevölkerung und anderen Populationen der Nicht-Endemiegebiete

In der Literatur gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen aus Nicht-Endemiegebieten, die anhand von Familienuntersuchungen das Auftreten der β -Thalassämie in der entsprechenden Population beschreiben und diskutieren. Mit Hilfe dieser Daten ist ein Vergleich des Mutationsspektrums in unserer einheimischen Bevölkerung mit dem Mutationsspektrum der β -Thalassämie in der Tschechoslowakei, Ungarn, England und Japan möglich.

Tschechoslowakei

Indrak et al. [1992] charakterisierten die β -Thalassämie-Gene von 93 Mitgliedern aus 34 Familien tschechischer und slowakischer Herkunft. Alle Probanden waren heterozygote Träger der β -Thalassämie mit einer milden Anämie und einem erhöhten HbA₂. Mittels ASO wurde auf das Vorhandensein von 30 häufigen Mutationen des Mittelmeerraumes, des Fernen Ostens, Indiens und Afrikas untersucht. Acht verschiedene Mutationen konnten bei 33 Familien identifiziert werden, bei einer Familie blieb die Mutation unbekannt. Über die Hälfte der untersuchten Fälle (18/34 Familien) zeigten die Mutation IVS1-1 G \rightarrow A, die typischerweise in den östlichen Mittelmeerländern zu finden ist [Huisman, 1990]. Die restlichen Probanden wiesen mit abnehmender Häufigkeit folgende Mutationen auf: IVS2-1 G \rightarrow A (4/34), NS 121 G \rightarrow T (3/34), IVS1-110 G \rightarrow A (2/34), IVS2-745 C \rightarrow G (2/34), FS 82/83 -G (2/34). Überraschend war das relativ häufige Auftreten der *Nonsense*-Mutation im Kodon 121, eine Mutation, die mit dem Phänotyp einer dominanten β -Thalassämie assoziiert ist und in erster Linie bei Nordeuropäern angetroffen wird. Die Blutanalyse der betreffenden Probanden ergab zwar das Bild einer Poikilozytose, Anisozytose und Mikrozytose, jedoch konnten die Innenkörper, die als Charakteristikum für heterozygote Träger dieser Mutation gelten [Stamatoyannopoulos et al., 1974; Fei et al., 1989; Thein et al., 1990], nicht nachgewiesen werden. Erstaunlich ist ebenfalls das

Vorkommen der FS 82/83 -G in 2 Familien. Eine Beziehung der beiden Familien zu Aserbaidshanern, bei denen diese Mutation ursprünglich beschrieben worden war [Schwartz et al., 1989], konnte nicht hergestellt werden.

Das Resultat der tschechoslowakischen β -Thalassämie-Studie deckt sich in vielen Punkten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So stammen ca. 80 % der tschechoslowakischen heterozygoten β -Thalassämie-Gene aus dem Mittelmeerraum, die während der türkischen Okkupation im 16./17. Jdh. in die Bevölkerung gelangt sein könnten. Als ursächlich für die Verbreitung der β -Thalassämie-Gene wird auch die Ansiedlung von Griechen in der Tschechoslowakei nach dem 2. Weltkrieg angenommen [Indrak et al. 1992].

Das Auftreten der NS 121 G \rightarrow T überrascht durch seine Häufigkeit, da es weltweit nur vereinzelte Fälle dieser dominanten Form der β -Thalassämie gibt. Beschrieben wurde diese Mutation bei einem Mädchen griechisch-polnischer Abstammung [Kazazian et al, 1986], in einer schweizerischen Familie [Fei et al., 1989], in 3 britischen Familien [Thein et al., 1990] und in 2 japanischen Familien [Yamamoto et al., 1992]. Diese wenigen Fälle werden jetzt durch die 2 tschechoslowakischen Familien [Indrak et al., 1992] und durch eine deutsche Familie [Schwarz et al., 1997] ergänzt. Nicht überraschend ist jedoch das regionale Auftreten dieser Mutation, da sie abgesehen von der japanischen Publikation vorzugsweise in Nord-West-Europa anzutreffen ist.

Die Koexistenz der FS 82/83 -G in der tschechoslowakischen und der deutschen Bevölkerung wird durch die enge Nachbarschaft beider Populationen plausibel. Eine Verbindung der tschechoslowakischen und deutschen Probanden zu Aserbaidshanern ist nicht bekannt und eher unwahrscheinlich.

Ungarn

Ringelmann et al. [1993] identifizierten 7 verschiedene β -Thalassämie Mutationen bei 32 Mitgliedern aus 17 Familien. Alle Untersuchten waren heterozygot für eine β -Thalassämie, mit Ausnahme zweier Waisenkinder, deren molekulare Charakterisierung eine Homozygotie für die IVS1-6 T \rightarrow C Mutation ergab. Alle Familien waren ungarischer Abstammung und ihre Vorfahren lebten seit mindestens einem oder mehreren Jahrhunderten in diesem Land.

Jeweils 5 Familien zeigten die IVS1-1 G \rightarrow A und NS 39 Mutation, gefolgt von 2 Familien mit der IVS2-1 G \rightarrow A Mutation und 1 Familie mit der IVS2-745 C \rightarrow G Mutation. Es handelt sich dabei um häufige Mutationen des Mittelmeerraumes, die in Ungarn 2/3 aller identifizierten β -Thalassämie-Gene ausmachen. Die Häufigkeit im Auftreten der mediterranen Mutationen entsprechen den Ergebnissen in der tschechoslowakischen und der hier vorliegenden Studie.

Die IVS1-1 G \rightarrow A-Mutation war die am häufigsten erfaßte Mutation in der tschechoslowakischen und der ungarischen Population. Migration innerhalb der Österreichisch-Ungarischen Monarchie sowie die Einwanderung von Völkerstämmen aus dem Osten und Süden könnten für die Verbreitung der Thalassämie-Gene in Ungarn verantwortlich sein.

Darüber hinaus beschrieben Ringelmann et al. [1993] eine neue *Frameshift*-Mutation im Kodon 51, die durch den Verlust eines Cytidins entsteht. Diese Mutation wurde in einem Probanden nachgewiesen, leider war eine

Familienuntersuchung nicht möglich. Auch in der vorliegenden Studie konnte dieser *Frameshift* an einem Probanden gezeigt werden, verwandtschaftliche Beziehungen des Probanden nach Ungarn sind nicht bekannt.

Anhand der erörterten Publikationen konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß 2/3 der β -Thalassämie-Gene durch Migration aus den Mittelmeerländern nach Mittel- bzw. Osteuropa gelangten. Gleichzeitig muß der engen regionalen Nachbarschaft der Bundesrepublik Deutschland, der Tschechoslowakei und Ungarn Rechnung getragen werden. Für seltene Mutationen, die nur an einzelnen Personen dokumentiert werden konnten ist eine lokale Entstehung am wahrscheinlichsten.

England

22 Angelsachsen der einheimischen britischen Bevölkerung mit der Diagnose einer β -Thalassämie sind im Zeitraum von 1984-1991 molekular aufgearbeitet worden [Hall et al., 1992]. Die Hälfte der Fälle war klinisch asymptomatisch und zeigte hämatologische Kriterien im Sinne einer heterozyoten β -Thalassämie. Nach molekularer Analyse konnten in 8 Fällen typisch mediterrane Mutationen (NS 39, IVS1-1 G \rightarrow A, IVS1-6 T \rightarrow C, IVS1-110 G \rightarrow A) nachgewiesen werden. Die molekulare Charakterisierung von 3 Thalassämie-Genen gelang nicht.

Die verbleibenden 11 Probanden zeigten klinisch eine Thalassaemia intermedia. Nach molekularer Charakterisierung wurden folgenden β/α -Genotypen identifiziert (Tab. 11):

β -Genotyp	α -Genotyp	n
$\beta^+ \text{IVS1-6 T} \rightarrow \text{C} / \beta^\circ \text{NS 39}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ \text{IVS1-1 G} \rightarrow \text{A} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ \text{NS 39} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ \text{FS 41/42 -CTTT} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ 121 \text{ G} \rightarrow \text{T} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ 121 \text{ G} \rightarrow \text{T} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	2
$\beta^\circ \text{cd 28 Leu-Arg} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ 127 \text{ C} \rightarrow \text{T} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	1
$\beta^\circ \text{FS 5 -CT} / \beta^{\text{A}}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	2

Tab. 11: Genotypenkonstellation der Thalassaemia intermedia in der einheimischen britischen Bevölkerung, modifiziert nach Hall et al., 1992.

Die Genotypenkonstellation erklärt in 9 Fällen die klinische Diagnose einer Thalassaemia intermedia: ein Proband ist gemischt heterozygot für eine milde (IVS1-6 T \rightarrow C) und eine schwere (NS 39) Form der β -Thalassämie, drei Probanden weisen neben einer rezessiven Form der β -Thalassämie triplizierte α -Gene auf und fünf Probanden sind an einer dominant vererbten Form der β -Thalassämie erkrankt [Thein et al., 1992]. Der schwere klinische Phänotyp der zwei Probanden mit der FS 5 -CT konnte jedoch nicht erklärt werden, da normalerweise Heterozygote mit dieser Mutation asymptomatisch sind [Kollia et al., 1989].

Hall et al. [1992] erklären das Auftreten der häufigen mediterranen und der asiatischen Mutation (FS 41/41 - CTT) durch die Einwanderung von Ausländern nach Großbritannien. Dagegen diskutieren sie die Mutation im Kodon 28 als *de novo* bzw. die NS 121 G → T und NS 127 C → T als unabhängig entstandene Mutationen.

Exon 3-Mutationen unterliegen in Anbetracht ihres schwereren klinischen Phänotyps im Sinne einer Thalassaemia intermedia keinem positiven Selektionsdruck gegenüber Malaria und sind deshalb kaum in den Endemiegebieten anzutreffen. Weit häufiger sind diese seltenen Allele in Familien ethnischer Gruppen anzutreffen, in denen Malaria nicht endemisch ist [Kazazian et al., 1992]. Bei Kenntnis dieser Hintergründe überrascht das Auftreten der NS 121 G → T in der britischen [Hall et al., 1992], tschechoslowakischen [Indrak et al., 1992], japanischen [Yamamoto et al., 1992; Wakamatsu et al., 1994] und deutschen [Schwarz et al., 1997] Bevölkerung weniger.

Japan

Die Prävalenz der β -Thalassämie liegt in Japan bei 0,1 % [Wakamatsu et al., 1994]. Molekulare Analysen von Japanern mit einer heterozygoten β -Thalassämie ergaben folgendes Mutationsspektrum:

- | | |
|---------------------|--------------------------------|
| (a) -31 A → G | (i) IVS2-654 C → T |
| (b) FS 54 +G | (j) IVS2-1 G → A |
| (c) cd 90 G → T | (k) NS 121 G → T |
| (d) cd 110 T → C | (l) NS 15 TGG → TAG |
| (e) FS 123 -A | (m) Initiationskodon ATG → GTG |
| (f) cd 127/128 -AGG | (n) cd 26 GAG → AAG |
| (g) IVS2-848 C → G | (o) IVS1-130 G → C |
| (h) FS 41/42 -TTCT | (p) cd 24 GGT → GGA |

Die Mutationen (a)-(g) sind bisher nur in der japanischen Population beschrieben worden und daher mit höchster Wahrscheinlichkeit autochthonen Ursprungs. Die folgenden Mutationen (h)-(i) werden typischerweise in der chinesischen Population gefunden. Ihr häufiges Vorkommen in Japan erklärt sich historisch aus dem früheren Einfluß Chinas auf Japan. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Haplotypenanalyse, die ein kongruentes Haplotypenmuster bei Chinesen und Japanern für die FS 41/42-Mutation zeigt.

Die IVS2-1 G → A wird sowohl in der mediterranen Bevölkerung als auch bei Schwarzamerikanern beschrieben. Eine Haplotypenanalyse bei Japanern mit dieser Mutation ergab ein differentes Bild zu den Haplotypen bei Erkrankten des Mittelmeerraumes und erkrankten Schwarzamerikanern. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese Mutation multiplen Ursprungs ist.

Ähnliches gilt für die *Nonsense*-Mutation im Kodon 15, die ein häufiges Auftreten bei Indern zeigt und deren Haplotypenmuster sich ebenfalls in beiden Populationen deutlich voneinander unterscheiden [Wakamatsu et al., 1994].

Hattori et al. publizierten 1991 eine neue β -Thalassämie-Mutation im Initiationskodon (ATG → GTG), die sie in zwei japanischen Familien identifizieren konnten. Diese Mutation konnte ebenfalls bei zwei Deutschen

innerhalb der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Einen Vergleich der Haplotypen gibt es nicht, so daß eine genaue Aussage zum Ursprung dieser sehr seltenen Mutation nicht getroffen werden kann.

Ein Vergleich der β -Thalassämie-Chromosomen für die IVS1-130 G \rightarrow C, die sowohl in der türkischen [Öner et al., 1990] als auch in der japanischen [Yamamoto et al., 1992] und deutschen [Schwarz et al., 1997] Bevölkerung beschrieben worden ist, ist ebenfalls durch das Fehlen der Haplotypenanalyse nicht möglich.

Der Vergleich der Mutationsspektren in verschiedenen Populationen der Nicht-Endemiegebiete dokumentiert das häufige Vorkommen typischer mediterraner β -Thalassämie-Mutationen in Nord-West-Europa (Tschechoslowakei, Ungarn, England, Deutschland). Somit unterscheiden sich die Mutationsspektren in diesen Ländern kaum voneinander und Differenzen entstehen nur durch die unterschiedlichen Häufigkeiten in der jeweiligen Population. Dahingegen unterscheidet sich das Spektrum in Nord-West-Europa deutlich von dem in der japanischen Bevölkerung. Die dort beschriebenen Mutationen scheinen sich vollkommen unabhängig in dieser Population entwickelt zu haben. Beachtenswert ist jedoch das Auftreten der *Nonsense*-Mutation im Exon 3 (NS 121) sowohl in den Ländern Nord-West-Europas als auch in Japan und ihre Abwesenheit in Populationen der Endemiegebiete. Das Fehlen eines positiven Selektionsdruckes, wie Malaria, könnte die Interpretation für das Vorhandensein eines kleinen, aber vielfältigen Genpools in Nicht-Endemiegebieten sein.

4.2. Seltene β -Thalassämie-Gene

4.2.1. Die *Frameshift*-Mutation am Übergang vom Kodon 82/83.

Der Anteil der FS 82/83-Mutation in der einheimischen deutschen Bevölkerung beträgt 5,6 %. Es handelt sich um ein seltenes β -Thalassämie-Allel, welches bisher nur in 2 tschechoslowakischen [Indrak et al., 1992] und einer Familie aus Aserbaidshan [Schwartz et al., 1989] beschrieben wurde. Nach aller Wahrscheinlichkeit ist diese Mutation völlig unabhängig auf dem heutigen Gebiet der Bundesrepublik Deutschland entstanden.

Diese Hypothese wird durch die Veröffentlichung von Kimberland et al. [1995] unterstützt, die ebenfalls die FS-Mutation bei einem Deutschen identifizierten. Die hämatologischen Befunde zeigten ein erniedrigtes MCV von 67 fl und einen HbA₂-Wert von 1,7 bis 3,7 %. Eine kritische Wertung dieser Angaben ist schwer möglich, da ein HbA₂-Wert erst ab 3,5 % als pathologisch erhöht gilt und die Diagnose einer heterozygoten β -Thalassämie zulässig macht. Eine verwandtschaftliche Beziehung des Deutschen mit der Bevölkerung des Mittleren Ostens konnte nicht aufgezeigt werden, so daß ein autochthoner Ursprung der Mutation als wahrscheinlich angenommen wird.

4.2.2. Die *Nonsense*-Mutation im Kodon 121.

Zu Beginn der 70iger Jahre wurde eine irische Familie mit einer ungewöhnlichen Thalassämie beschrieben. Der Erbgang erwies sich als autosomal dominant. Das Krankheitsbild war durch eine mittelschwere Anämie mit typischen morphologischen Veränderungen der roten Blutkörperchen, durch eine Splenomegalie und eine Knochenmarkhyperplasie gekennzeichnet. Auffallend waren große plumpe Innenkörper in den Normoblasten, deren Existenz zur Bezeichnung "*Inclusion body β -thalassemia trait*" führte [Weatherall et al., 1973; Stamatoyannopoulos et al., 1974].

Eine besondere Form der selten dominant vererbten β -Thalassämie ist die *Nonsense*-Mutationen im Exon 3. Interessanterweise führen *Nonsense*-Mutationen im ersten und zweiten Exon zum vorzeitigen Abbau der veränderten mRNA. Möglicherweise schützt dieser posttranskriptionale Mechanismus des intrazellulären Abbaus *nonsense*-mutierter mRNA heterozygote Träger einer β -Thalassämie vor schweren klinischen Manifestationen der Erkrankung. Es resultiert ein asymptomatischer Phänotyp [Kugler et al., 1995]. Im Gegensatz dazu werden bei *Nonsense*-Mutationen im terminalen Exon große Mengen nicht-funktionaler mRNA des mutierten Allels produziert, da die pathologische mRNA nicht im Zellkern abgebaut, sondern ins Zytoplasma transportiert wird. Die mutierten β - sowie die freien α -Globinketten überlasten das proteolytische System des Zytoplasmas und zerstören nach Präzipitation die Erythrozytenmembran. Dieser Prozeß zieht eine ineffektive Erythropoese mit Hämolyse und Splenomegalie nach sich und hat somit einen klinisch schwereren Phänotyp im Sinne einer Thalassaemia intermedia zur Folge (sog. dominant negativer Effekt nicht-funktionaler β -Globin-mRNA) [Beris et al., 1988; Hall & Thein, 1994; Kugler et al., 1995].

Die *Nonsense* 121 G \rightarrow T-Mutation gehört zu den Formen der β -Thalassämie im Exon 3 und erlangt durch ihr gehäuftes Auftreten in der Bevölkerung Nord-West-Europas an Interesse. Tab. 12 gibt eine Übersicht über die

bisher identifizierten β -Thalassämie-Gene mit einer Kodon 121 G \rightarrow T-Mutation und den jeweiligen resultierenden Phänotyp.

Publikation	Abstammung	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Innenkörper	Hepatosplenomegalie	Transfusionsbedürftigkeit
Kazazian et al. [1986]	griechisch/ polnisch	o. A. ¹	o. A. ¹	o. A. ¹	3,0	97,0	o. A. ¹	o. A. ¹	+
Fei et al. [1989]	schweizerisch/ französisch	9,8	61,0	20,2	4,9	3,1	+	o. A. ¹	o. A. ¹
Thein et al. [1990]	britisch	11,6	77,0	26,0	5,0	3,0	+	+ ²	o. A. ¹
	britisch	9,0	64,0	19,5	4,8	1,1	o. A. ¹	-	o. A. ¹
Yamamoto et al. [1992]	japanisch	10,0	62,0	18,9	5,7	6,6	o. A. ¹	o. A. ¹	o. A. ¹
	japanisch	10,8	70,0	21,7	4,8	3,8	o. A. ¹	o. A. ¹	o. A. ¹
Indrak et al. [1992]	tschecho- slowakisch ³	9,0- 12,5	57,0- 75,0	18,5- 22,6	4,1-5,1	1,0- 7,0	-	o. A. ¹	o. A. ¹
Hall et al. [1994]	angelsächsisch	12,3	77,0	26,0	5,0	5,0	o. A. ¹	+	+
	angelsächsisch	10,4	56,0	19,0	6,0	2,0	o. A. ¹	-	-
Schwarz et al. [1997]	deutsch	10,8	63,9	21,0	4,9	5,3	o. A. ¹	-	-
	deutsch	11,4	o. A. ¹	21,2	6,0	-	o. A. ¹	+	-

Tab. 12: Übersicht der bisher veröffentlichten NS 121 G \rightarrow T-Mutationen. (¹ ohne Angabe; ² nur Splenomegalie; ³ 11 Mitglieder aus 3 Familien)

Alle in Tab. 12 aufgeführten Probanden mit der Mutation im Kodon 121 zeigen einen uneinheitlichen Phänotyp. Zwei Fälle sind regelmäßig bzw. gelegentlich transfusionsbedürftig (s. Tab 12) [Kazazian et al., 1986; Hall & Thein, 1994]. Deutlich wird auch, daß der Nachweis von Innenkörpern nicht obligat ist. Aus diesem Grund sollte man in der Nomenklatur zwischen der *Innenkörper-b-Thalassämie* und der *dominanten b-Thalassämie* unterscheiden. Lassen sich in den Normoblasten große plumpe Innenkörper nachweisen, kann man auf den von Weatherall und Stamatoyannopoulos geprägten Begriff der Innenkörper- β -Thalassämie zurückgreifen. Ist das nicht der Fall, wird der Begriff dominante β -Thalassämie bevorzugt.

Der hämatologische Phänotyp der beiden Deutschen mit einer NS 121 G \rightarrow T-Mutation entspricht einer Thalassaemia minor (s. Tab. 12), wobei der klinische Befund der Hepatosplenomegalie bei dem einen Probanden ein Hinweis auf den vermuteten dominant negativen Effekt nicht-funktionaler mRNA sein könnte. Auf das Vorhandensein von Innenkörpern sind beide Probanden nicht untersucht worden.

4.3. Die *neue* IVS1-129 A → G-Mutation

In der Literatur gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen über Sequenzveränderungen im β -Globin, die die RNA-Verarbeitung empfindlich stören. Mutationen, die die hochkonservierten und invariablen Dinukleotide der 5'-Donor-Spleißstelle (GT) und der 3'-Akzeptor-Spleißstelle (AG) an der Exon/Intron bzw. Intron/Exon Grenze betreffen, nehmen darin einen großen Stellenwert ein. Untersuchungen zeigten, daß diese Konsensussequenzen absolut notwendig für einen effizienten und präzisen Spleißvorgang sind [Breathnach & Chambon, 1981; Mount et al., 1982; Shapiro & Senapathy, 1987].

So wurden bisher 6 verschiedene β -Thalassämie-Gene beschrieben, deren Mutation den **5'-GT-Spleißdonor** (G oder T in gleicher Weise) der IVS1 bzw. IVS2 komplett inaktivieren und damit eine normale RNA-Verarbeitung verhindern [Orkin et al., 1982 [b]; Treismann et al., 1982; Kazazian et al., 1984; Chibani et al., 1988; Gonzales-Redondo et al., 1989; Bouhass et al., 1990]. Untersuchungen ergaben, daß die Inaktivierung der hochkonservierten 5'-GT-Dinukleotide zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle an anderer Lokalisation im RNA-Transkript führen. Dieses alternative Spleißen ist im Vergleich zur Nutzung des natürlichen Spleißkonsensus ineffizienter, gemessen an einer ca. 10-20fach geringeren RNA-Ausbeute [Orkin et al., 1982 [b]; Treismann et al., 1983].

In demselben Maße gibt es zahlreiche Publikationen zu Mutationen des **3'-AG-Spleißakzeptors**. Dabei fällt auf, daß Mutationen dieses Spleißkonsensus am Übergang vom zweiten Intron zum dritten Exon (3'-IVS2) das Adenin [Antonarakis et al., 1984; Atweh et al., 1985; Padanilam & Huisman, 1986] bzw. Guanin [Jancovic et al., 1992; Rosatelli et al., 1992; Cürük et al., 1995] in gleicher Weise betreffen, in der 3'-IVS1 (Übergang erstes Intron/zweites Exon) jedoch nur Mutationen beschrieben worden sind, die das Guanin betreffen [Öner et al., 1990; Yamamoto et al., 1992; Deidda et al., 1990]. Aus diesem Grunde stellt der A → G-Basenaustausch an Position 129 des ersten Introns ein Novum dar (s. Tab. 13).

Orkin et al. dokumentierten 1983 als erste Arbeitsgruppe eine Mutation in der kritischen Sequenz des 3'-Spleißakzeptors im β -Globin. Sie identifizierten eine 25 bp-Deletion, die einen großen 3' gelegenen Abschnitt der IVS1 sowie das invariable AG-Dinukleotid und ein oder zwei Nukleotide des zweiten Exons einschloß. Mittels in-vitro-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß der Defekt die Anlagerung von U1 snRNP (*small nuclear ribonucleo protein particle*) an die 5' Spleißstelle verhindert. Dadurch wird die Abspaltung des Introns vom davorliegenden Exon und die typische Ausbildung der *lariat formation* blockiert [Reed & Maniatis, 1985] (s. Abb. 20). Das Spleißen am 3'-Spleißakzeptor ist unmöglich. Im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Thalassämie-Gene [Treismann et al., 1982 & 1983; Felber et al., 1982], fand hier kein alternativer Spleißvorgang statt. Das mutierte Gen produzierte Globin-RNA, die das gesamte Intron 1 enthielt. Interessanterweise konnten jedoch nur geringe Mengen dieser RNA nachgewiesen werden, was wohl am ehesten ihre Instabilität reflektiert oder ihren ineffizienten Transport vom Zellkern in das Zytoplasma widerspiegelt [Orkin et al., 1983].

Mutationen, die die Position 849 des 2. Introns und damit den AG-Spleißkonsensus am Übergang vom zweiten Intron zum dritten Exon betreffen, wurden von Antonarakis et al. [1984], Atweh et al. [1985] und Padanilam & Huisman [1986] ausschließlich bei Schwarzsamerikanern beschrieben (s. Tab. 13). Alle aufgezeigten

Mutationen blockierten die normale RNA-Verarbeitung, so daß eine alternative Spleißstelle an Position 579 (anstelle Position 849) des 2. Introns benutzt wurde. Infolgedessen entstand ein verlängertes Exon 3, da das 2. Intron nur teilweise entfernt werden konnte. Antonarakis et al. [1984] und Atweh et al. [1985] konnten die RNA anomaler Größe nachweisen, jedoch nur in einer 90 % geringeren Ausbeute im Vergleich zur Menge an normaler mRNA. Die minimale Ausbeute an anomal gespleißter mRNA ist ein Hinweis auf die deutlich geringere Effizienz des alternativen Spleißvorganges.

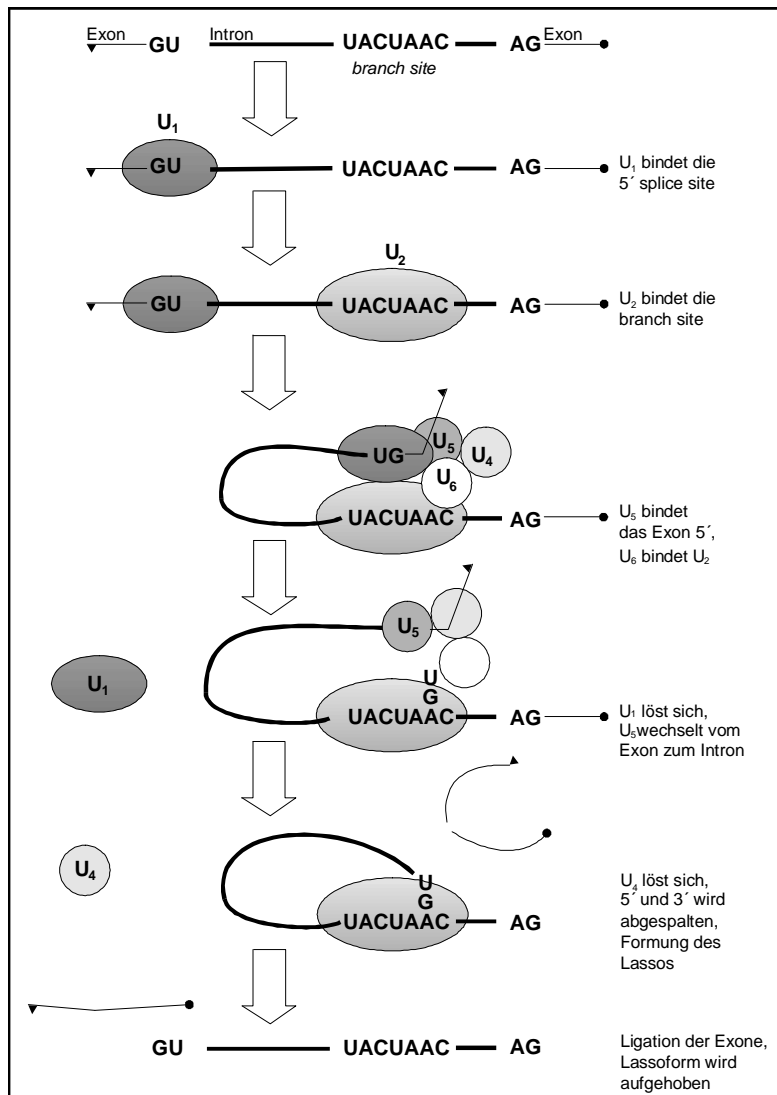


Abb. 20: Modell des Spleißvorgangs, modifiziert nach Lewis, 1994.

RNA-Analyse wurde in keinem der drei Fälle durchgeführt, so daß nur hypothetische Aussagen über den Effekt dieser Mutationen vorliegen. So nehmen Yamamoto et al. [1992] an, daß der G → C-Basenaustausch an Position 130 des ersten Introns eine direkte Ligation von Exon 1 und 3, unter Entfernung von IVS1, Exon 2 und IVS2 zur Folge hat. Grundvoraussetzung für diesen Vorgang wäre jedoch das Vorhandensein einer alternativen Spleißstelle.

Padanilam & Huisman [1986] gelang im Gegensatz dazu der Nachweis von mRNA anomaler Größe nicht. Ob dieses Ergebnis auf dem extrem schnellen Abbau der mutierten mRNA oder auf dem vollständigen Fehlen alternativ gespleißter mRNA beruht, bleibt offen.

Ebenso war es Jankovic et al. [1992] und Cürük et al. [1995] nicht möglich, die nicht-funktionale mRNA bei Basensubstitutionen an Position 850 des 2. Introns (s. Tab. 13) nachzuweisen. Bei den Probanden handelte es sich um heterozygote Träger einer β -Thalassämie (jugoslawischer sowie englisch-schottischer Abstammung).

Publikationen zu Veränderungen der kritischen Spleißkonsensussequenz AG am Übergang vom Intron 1 zum Exon 2 betreffen nur das Guanin und wurden von Öner et al. [1990], Yamamoto et al. [1992] und Deidda et al. [1990] veröffentlicht. Eine

Publikation	Mutationen des 3'AG-Spleißakzeptors
Orkin et al., 1983	IVS1, 25 bp-Deletion (3'-Ende)
Antonarakis et al., 1984 Atweh et al., 1985 Padanilam & Huisman, 1986	IVS2-849 A→G IVS2-849 A→G IVS2-849 A→C
Jankovic et al., 1992 Cürük et al., 1995 Rosatelli et al., 1992	IVS2-850 G→C IVS2-850 G→A IVS2-850 -G
Öner et al., 1990 Yamamoto et al., 1992 Deidda et al., 1990	IVS1-130 G→C IVS1-130 G→C IVS1-130 G→A
Schwarz et al., 1997	IVS1-129 A→G

Tab. 13: Übersicht der bisher identifizierten Mutationen des 3' AG-Spleißakzeptors.

Die neue IVS1-129 A → G-Mutation reiht sich in die eben ausführlich beschriebenen Mutationen ein, die den kritischen AG-Spleißakzeptor betreffen. Das AG-Dinukleotid ist ein hochkonserviertes Charakteristikum aller Akzeptor-Spleißstellen [Breathnach & Chambon, 1981; Mount et al., 1982]. Deletionen oder Substitutionen dieser konstanten Nukleotide resultieren in einer Störung der normalen RNA-Verarbeitung. Der Austausch einer einzigen Base innerhalb des AG-Dinukleotides verhindert die Abspaltung des 3'-Endes, wohingegen die Deletion des Polypyrimidin-Traktes und des AG-Dinukleotides die Abspaltung des 5'-Endes sowie die Ausbildung des Lassos unterbindet (s. Abb. 20) [Reed & Maniatis, 1985]. Es entsteht eine nicht-funktionale, äußerst instabile mRNA, deren klinische Auswirkungen im Falle eines homozygot Erkrankten dem Bild einer β^0 -Thalassämie entspräche.

4.4. β -Thalassämie ohne Mutation im β -Globingen

In 8 von 214 Fällen gelang die molekulare Charakterisierung der β -Thalassämie-Gene nicht. Alle Probanden erfüllten die hämatologischen Kriterien zur Diagnose einer heterozygoten β -Thalassämie. Ein normales β -Globingen nach vollständiger Sequenzierung zeigten 6 Probanden, die molekulare Aufarbeitung der restlichen 2 Probanden mußte aus Mangel an DNA abgebrochen werden. Die spätere Durchführung einer *Southern blot*-Analyse im molekularbiologischen Labor der Kinderklinik zum Nachweis von Deletionen im β -Globingen blieb ebenfalls ohne Ergebnis.

Die Vermutung liegt nahe, daß diese Probanden β -Thalassämiedeterminanten tragen, die nicht an den β -Globingen-Komplex gebunden sind. Diese Hypothese wird durch eine Reihe von Publikationen unterstützt.

Semenza et al. 1984 [a] informierten das erste Mal über eine neue Kategorie von β -Thalassämie-Erkrankungen am Beispiel einer albanischen Familie. In dieser Familie waren beide Kinder an einer β -Thalassämie erkrankt. Die Mutter trug auf einem Allel die IVS1-1 G \rightarrow A-Mutation, das andere Allel war nicht betroffen. Der erhöhte HbA₂-Wert sicherte auch hämatologisch die Diagnose einer heterozygoten β -Thalassämie bei der Mutter. Das β -Globingen des Vaters blieb unauffällig, keine Punktmutation oder Deletion konnte nachgewiesen werden. Die einzige Auffälligkeit bot die komplexe Neuordnung der Basen an Position -530, bestehend aus einer Insertion (+ATA) und einer Deletion (-T). Diese Sequenzänderung wurde von derselben Arbeitsgruppe als neuer DNA-Polymorphismus im β -Globingen-Komplex beschrieben [Semenza et al., 1984 b]. Unklar blieb der Phänotyp der Kinder dieser albanischen Familie, da die Analyse des β -Globingens des Vaters einer Erklärung entbehrte. (Leider fehlten die Angaben der hämatologischen Befunde der Familienmitglieder, so daß nicht sicher von einer Thalassaemia intermedia der Kinder ausgegangen werden kann.)

Murru et al. beschrieben 1990 und 1992 bei Mitgliedern zweier italienischer Familien den Phänotyp einer Thalassaemia intermedia, konnten jedoch nur auf einem Allel eine Mutation im β -Globingen nachweisen. Interessanterweise wurde auch in diesen Fällen zusätzlich die komplexe Sequenzänderung an Position -530 (+ATA -T) identifiziert. Die Rolle dieser Sequenzänderung wird kontrovers diskutiert. Ihr Vorkommen sowohl in normalen Individuen als auch in Trägern des HbS, des HbE oder einer β -Thalassämie spricht am ehesten für einen DNA-Polymorphismus [Wong et al., 1989; Thein et al., 1993]. Andererseits zeigen Untersuchungen von Berg et al. [1989; 1991], daß BP 1 (*Beta Protein 1*) über eine Bindung an die -530-Mutation entscheidenden Einfluß auf die β -Globin-Synthese nehmen kann. Berg et al. [1991] verglichen die Bindungseffizienz von BP 1 an die normale und die mutierte Sequenz (-530 +ATA -T) des β -Globingens. Das verblüffende Ergebnis: Das Protein band mit einer höheren Affinität an die mutierte Sequenz. Dieses Ergebnis veranlaßte die Arbeitsgruppe, BP 1 als ein Repressorprotein zu postulieren, welches durch hohe Bindungsaffinität an die Sequenzänderung an Position -530 eine verminderte β -Globin-Synthese bewirkt. Dieses Modell unterstützen Untersuchungen des indischen Haplotyps der Sichelzellanämie, der die gleiche Mutation an Position -530 aufweist. Homozygote Patienten zeigen einen milderen Phänotyp, möglicherweise erklärbar durch eine verminderte Produktion an β^S -Ketten [Elion et al., 1992]. Konträr dazu steht der Nachweis einer höheren

Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors Sp 1 an einen mutierten γ -Globinpromotor, der über eine vermehrte Produktion von γ -Globin die Ausbildung einer HPFH zur Folge hat [Ronchi et al., 1989].

Anhand der vorliegenden Daten kann keine endgültige Aussage über die Bedeutung der Mutation an Position -530 des β -Globingens getroffen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese komplexe Sequenzänderung nur im Zusammenhang mit einer zweiten Mutation für eine verminderte Bildung von β -Globin verantwortlich ist.

Trotz aller Spekulationen scheint die Interaktion von *cis*-regulatorischen Elementen und Transkriptionsfaktoren von maßgeblicher Bedeutung zu sein. Die *cis*-regulatorischen Elemente und die in *trans* agierenden Transkriptionsfaktoren haben bekanntermaßen einen entscheidenden Einfluß auf die Expression der einzelnen Gene des β -Globingen-Komplexes und spielen gleichzeitig eine wichtige Rolle im Globingen-Schaltmechanismus [De Boer et al., 1988; Orkin, 1990; Grosveld et al., 1993]. Veränderungen im Bindungsverhalten regulatorischer Proteine könnten die β -Thalassämiedeterminanten sein, die nicht an das β -Globingen gekoppelt sind, jedoch den Phänotyp einer β -Thalassämie verursachen [Murru et al., 1992; Thein et al., 1993].

Ein Beispiel für ein regulatorisch wirksames Protein ist der kürzlich entdeckte erythroid-spezifische Transkriptionsfaktor EKLF (*erythroid Krüppel like factor*). Studien demonstrierten, daß EKLF die CACCC-Box bindet und Mutationen dieses wichtigen Promotorelementes die EKLF-Bindung inhibieren [Miller & Bieker, 1993]. Weiterhin binden EKLF-Proteine mit 8fach erhöhter Effizienz an den β - im Vergleich zum γ -Globingenpromotor. Diese Daten unterstreichen die Fähigkeit des Proteins, die menschliche β -Globingen-Expression zu aktivieren und sprechen auch für die Einnahme einer wichtigen Funktion beim γ - β -Schaltmechanismus [Donze & Townes, 1995]. Eine Mutation im EKLF-Gen könnte eine Verminderung der β -Globin-Synthese zur Folge haben und dadurch den Phänotyp einer β -Thalassämie hervorrufen. Die Sequenzanalyse des β -Globingens des Betroffenen würde in diesem Falle unauffällig sein. Untersuchungen von Perkins et al. [1995] unterstützen diese Überlegungen. Die Arbeitsgruppe inaktivierte die EKLF-Gene von Mäusen durch *gene targeting* und wies nach, daß der EKLF-Genverlust selektiv die β -Globingen-Expression in hohem Maße verminderte. Die EKLF $-/-$ Embryos zeigten eine normale Entwicklung während der fetalen Erythropoese, starben jedoch am 16. Tag, wenn es zum Umschalten der fetalen zur adulten Hämoglobinsynthese kam. Lim et al. [1997] führten diese Untersuchungen fort, um die Rolle des EKLF in der adulten Erythropoese zu erforschen. Dazu benutzten sie murine embryonale Stammzellen, in denen beide EKLF-Allele inaktiviert waren (EKLF $-/-$) und konnten nachweisen, daß der Verlust von EKLF eine Verminderung der β -Globinketten-Synthese zur Folge hat. Die EKLF $-/-$ Erythrozyten leiden an einem Mangel an β -Globinketten, was in einen Überschuß an α -Ketten resultiert. Die Präzipitate konnten Lim et al. [1997] als Einschlußkörperchen in den EKLF $-/-$ Zellen nachweisen. Erythrozyten mit Innenkörpern werden schneller als normal von der Milz aus der Blutzirkulation entfernt. Aufgrund dieses bekannten Mechanismus erklärt sich die verkürzte Lebenszeit der EKLF $-/-$ Erythrozyten, die Lim et al. [1997] dokumentierten.

Der Transkriptionsfaktor EKLF wird ebenfalls von der italienischen Arbeitsgruppe um Gasperini [1998] als potentieller Kandidat favorisiert, bei einem heterozygoten Träger der β -Thalassämie den schwereren Phänotyp einer *Thalassaemia intermedia* auslösen zu können. Sie berichteten von 6 Mitgliedern zweier Familien aus

Sardinien, die typische Zeichen einer Thalassaemia intermedia aufwiesen (mittelschwere bis schwere Anämie, erhöhtes HbF, Hepatosplenomegalie) jedoch genotypisch nur auf einem Allel die NS 39-Mutation trugen. Umfangreiche Untersuchungen schlossen triplizierte α -Globingene, Mutationen der HS2 und 3 der LCR sowie Veränderungen des γ -Globinpromoters als denkbare Erklärungen für den schweren Phänotyp einer heterozygoten β -Thalassämie aus.

Den Funktionsverlust eines Globingens ohne Mutation in der Globinsequenz konnten auch Wilkie et al. [1990] anhand einiger Patienten mit einer α -Thalassämie in Kombination mit einer mentalen Retardierung (ATR X-Syndrom) zeigen. Die molekulare Analyse ergab einen intakten α -Globingen-Komplex und ein normales α -Globingen. Es handelt sich um ein X-chromosomal rezessives Leiden, das nicht an den α -Globingen-Komplex gekoppelt ist. Unklar bleibt, ob diese Erkrankung direkt durch die Interaktion eines in *trans* agierenden Faktors mit dem einen oder anderen Globingen hervorgerufen wird oder ob es sich um einen indirekten Effekt handelt, der jedoch spezifisch für nur eines der Globingene ist.

5. Zusammenfassung und Thesen

5.1. Zusammenfassung

Die β -Thalassämie gehört weltweit zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten. Die Erkrankung definiert sich als quantitative Störung der normalen β -Globinsynthese. Die klinische Variabilität wird durch das Ausmaß des nicht kompensierbaren Defizits an β -Globinketten und dem daraus folgenden Überschuß an α -Globinketten determiniert. Die Thalassämien treten endemisch in der Bevölkerung des Mittelmeerraumes, in Westafrika und in weiten Teilen Asiens auf. Sie schützen ihre heterozygoten Träger vor fatalen Verläufen der Malaria, was ihre hohe Genfrequenz in den Endemiegebieten des *Plasmodium falciparum* erklärt.

In der einheimischen Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland gehört die β -Thalassämie zu den seltenen Erkrankungen mit nur einzelnen Fallberichten homozygoter Patienten. Häufiger ist das Auftreten der heterozygoten β -Thalassämie, die als Differentialdiagnose der mikrozytären, hypochromen Anämie eine besondere Rolle spielt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die molekulare Charakterisierung der β -Thalassämie in einer bisher einmalig großen Gruppe heterozygoter Probanden in einem nicht-endemischen Gebiet.

Eine Gruppe von 214 Personen mit einer heterozygoten β -Thalassämie wurde im Hämoglobinlabor der Ulmer Universitätsklinik identifiziert, nachdem die Diagnostik durch niedergelassene Ärzte und Krankenhäuser verteilt über ganz Deutschland veranlaßt wurde. Alle Proben erfüllten die diagnostischen Kriterien durch mikrozytäre und hypochrome Erythrozyten mit einem erhöhten HbA₂. In den Familien der Probanden gibt es keine bekannten Vorfahren aus dem Ausland. Der Nachweis der Punktmutationen im β -Globin gelang im molekularbiologischen Labor der Kinderklinik der Charité Berlin mittels Allel-spezifischer Oligonukleotid-Hybridisierung, Restriktionsanalyse und direkter Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA.

Durch die Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung konnten 75,7 % der Mutationen der β -Thalassämie-Gene charakterisiert werden. Dabei wurde das Spektrum der 11 Mutationen erfaßt, die häufig bei in Deutschland lebenden homozygoten Patienten gefunden wurden. Die drei häufigsten Veränderungen (NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A, IVS1-1 G \rightarrow A) sind typische Mutationen des Mittelmeerraumes und erreichen in der deutschen Bevölkerung einen Anteil von 62,6 % (134/214). Einige Mutationen kommen in ähnlichen Häufigkeiten wie in Italien vor (NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A, IVS1-1 G \rightarrow A, IVS2-745 C \rightarrow G, FS 6), andere mediterrane Mutationen sind dahingegen seltener (IVS1-6 T \rightarrow C, IVS2-1 G \rightarrow A).

Mit Hilfe der DNA-Sequenzanalyse konnten weitere 13 seltene Mutationen in 38 Fällen gefunden werden. Unter den seltenen Mutationen ragen die FS 82/83 -G und die Promotormutation an Position -87 C \rightarrow G heraus, da sie mit einem prozentualen Anteil von 5,6 % (12/214) und 3,3 % (7/214) bei autochthon Deutschen relativ häufig vorkommen. Eine bisher unbekannte Mutation wurde an Position 129 des ersten Introns gefunden (IVS1-129 A \rightarrow G). Die A \rightarrow G-Basensubstitution verändert das in der Evolution hoch konservierte und für die Spleißeffizienz kritische AG-Dinukleotid und resultiert somit in einer β^0 -Mutation. Darüberhinaus

zerstört diese Mutation eine *DdeI*-Schnittstelle im β -Globingen und konnte deshalb durch Restriktionsverdau eines PCR-amplifizierten Fragmentes identifiziert werden.

Ebenfalls bemerkenswert ist der Phänotyp von 2 Probanden mit der *Nonsense*-Mutation im Kodon 121 (G \rightarrow T), die bei Nord-West-Europäern mit dem Phänotyp einer dominant vererbten β -Thalassämie beschrieben wurde. Die beiden hier vorgestellten Probanden zeigen typische hämatologische Veränderungen einer Thalassaemia minor (Hb 10,8 und 11,4 g/dl; MCH 21 und 22 pg; HbA₂ 4,9 und 6,0 %). Klinisch wurde jedoch bei einem dieser Probanden eine leichte Hepatosplenomegalie diagnostiziert.

Insgesamt konnten 96,3 % (206/214) der Proben molekular charakterisiert werden. Dabei beruhen die Ergebnisse zu 75,7 % (162/214) auf der Allel-spezifischen Oligonukleotid-Hybridisierung und zu 20,6 % (44/214) auf der Sequenz- und Restriktionsanalyse. In 3,7 % der Fälle (8/214) konnten die Ursachen der β -Thalassämie nicht gefunden werden. Darunter zählen auch 2 Probanden, die wegen unzureichenden Ausgangsmaterials nicht vollständig genotypisch aufgearbeitet werden konnten.

Die vorliegende Arbeit umfaßt ein bislang einmalig großes Kollektiv von 214 Probanden deutscher Herkunft mit einer heterozygoten β -Thalassämie. Mediterrane Mutationen sind häufig und stellen einen Anteil von etwa 2/3 aller identifizierten Mutationen. Die Vermutung eines mediterranen Ursprungs der Mehrzahl der β -Globingen-Mutationen wird anhand dieser Studie unterstützt. Als "Importeure der mediterranen β -Thalassämie-Gene" werden in erster Linie die 70.000 italienischen Gastarbeiter angesehen, die um die Jahrhundertwende in Deutschland lebten.

Das übrige Mutationsspektrum setzt sich aus sehr seltenen Mutationen (IVS1-1 G \rightarrow T, IVS1-2 T \rightarrow G, IVS1-2 T \rightarrow C, NS 15 G \rightarrow A, NS 121 G \rightarrow T, FS 8/9 +G, FS 44 -C, FS 51 -C, FS 82/83 -G und die Initiations-Kodon-Mutationen ATG \rightarrow ACG/ \rightarrow GTG/ \rightarrow ATA) sowie einer neuen Mutation (IVS1-129 A \rightarrow G) zusammen. Die FS 82/83-Mutation, nur in 2 tschechoslowakischen und einer Familie aus Aserbaidschan beschrieben, wurde jedoch bei Deutschen mit einer Häufigkeit von 5,6 % gefunden. Für diese und alle anderen Mutationen, die nur bei kleinen Probandenzahlen oder bei Einzelpersonen nachgewiesen wurden, kann ein autochthoner Ursprung angenommen werden.

Die 6 Fälle mit einer gesicherten Thalassaemia minor und ohne Mutation im β -Globingen nach vollständiger molekularer Analyse sind von erheblichem theoretischen Interesse. Es wäre möglich, daß diese Probanden β -Thalassämiedeterminanten tragen, die nicht an den β -Globingen-Komplex gekoppelt sind oder regulative Sequenzen außerhalb des β -Globingens darstellen.

5.2. Thesen

- Die molekulare Aufarbeitung des β -Globingens identifiziert 96,3 % der Mutationen bei deutschstämmigen Probanden mit einer heterozygoten β -Thalassämie.
- Die 3 am häufigsten gefundenen Veränderungen NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A und IVS1-1 G \rightarrow A sind typische mediterrane Mutationen.
- Die Mutationen NS 39, IVS1-110 G \rightarrow A, IVS1-1 G \rightarrow A, IVS2-745 C \rightarrow G und FS 6 kommen bei Deutschen genauso häufig vor wie in Italien, während die mediterranen Mutationen IVS1-6 T \rightarrow C und IVS2-1 G \rightarrow A seltener auftreten.
- Im Gegensatz dazu sind die FS 82/83 -G und die Promotormutation -87 C \rightarrow G in der deutschen Bevölkerung häufiger als in anderen ethnischen Gruppen anzutreffen.
- Eine neue Mutation konnte identifiziert werden: IVS1-129 A \rightarrow G. Der Basenaustausch an Position 129 des ersten Introns verändert die kritische Sequenz des Spleißakzeptors und resultiert somit in einen β^0 -Phänotyp.
- Der hämatologische Phänotyp der 2 Probanden mit der NS 121 G \rightarrow T-Mutation entspricht einer Thalassaemia minor. Die Hepatosplenomegalie des einen Probanden könnte jedoch Ausdruck des vermuteten dominant negativen Effektes nicht-funktionaler mRNA sein.
- Die 6 Fälle mit einer gesicherten Thalassaemia minor ohne Mutation im β -Globingens sind wahrscheinlich Träger von β -Thalassämiedeterminanten, die nicht an den β -Globingens-Komplex gekoppelt sind. Familienuntersuchungen sind notwendig, um die Hypothese zu erhärten.
- Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, daß 2/3 der β -Thalassämie-Gene bei Deutschen ihren Ursprung in der Population der Mittelmeerländer haben. Dahingegen hat sich das übrige Drittel unabhängig und lokal in der einheimischen deutschen Bevölkerung entwickelt.
- Italienische Gastarbeiter, deren Zahl um 1900 70.000 auf 56 Millionen Deutsche betrug, können als potentielle "Importeure der mediterranen β -Thalassämie-Gene" bezeichnet werden.
- Die Studie unterstreicht die Notwendigkeit, die β -Thalassämie als eine Differentialdiagnose der mikrozytären, hypochromen Anämie in der einheimischen deutschen Bevölkerung zu berücksichtigen, auch dann, wenn eine Verwandtschaft mit der Bevölkerung des Mittelmeerraumes ausgeschlossen wird.

6. Literaturverzeichnis

- Aldouri, M. J. A., Wonke, B., Hoffbrand, A. V., Flynn, D. M., Ward, S. E., Agnew, J. E., Hilsen, A. J. W. (1990) High incidence of cardiomyopathy in beta-thalassemia patients receiving regular transfusion and iron chelation: reversal by intensified chelation. *Acta Haematol.* **84**: 113-117.
- Angelucci, E., Baronciani, D., Giardini, C., Argioli, F., Becchelli, G., Borgna Pignatti, C., Campisi, S., Careddu, F., Conter, V., De Nunzio, A., Erbeia, M., Mancini, E., Mangiagli, N., Maroni, P., Martinelli, L., Mulas, G., Piga, A., Porta, E., Puggioni, G., Rovelli, A., Ruggiero, L., Lucarelli, G. (1993) Iron removal in ex-thalassemics after BMT: preliminary results from the phlebotomy program. *Bone marrow transplant.* **12**: 108-110.
- Antonarakis, S. E., Orkin, S. H., Cheng, T., Scott, A. F., Sexton, J. P., Trusko, S. P., Charache, S., Kazazian, H. H. (1984) β -thalassemia in American Blacks: novel mutations in the „TATA“ box and an acceptor splice site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1154-1158.
- Apperley, J. F. (1993) Bone Marrow transplant for the haemoglobinopathies: past, present and future. In: *Bailliere's Clinical Haematology. The Haemoglobinopathies.* **6**: 299-325.
- Atweh, G. F., Anagnou, N. P., Shearin, J. (1985) β -thalassemia resulting from a single nucleotide substitution in an acceptor splice site. *Nucleic Acid Research* **13**: 777-790.
- Atweh, G., Wong, C., Reed, R., Antonarakis, S. E., Zhu, Ding-er, Ghosh, P. K., Maniatis, T., Forget, B. G., Kazazian, H. H. (1987) A new mutation in IVS-1 of the human β -globin gene causing β -thalassemia due to abnormal splicing. *Blood* **70**: 147-151.
- Bartlett, A. N., Hoffbrand, A. V., Kontoghiorghes, G. J. (1990) Longterm trial with the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (L1). *Brit. J. Haematol.* **76**: 301-304.
- Bauer, C., Ludwig, I., Ludwig, M. (1968) Different effects of 2,3 diphosphoglycerate and adenosin triphosphate on the oxygen affinity of adult and foetal haemoglobin. *Life* **7**:1339.
- Baysal, E., Carver, M. F. H. (1995) The β - and δ -Thalassemia repository. *Hemoglobin* **19**: 213-236.
- Benesch, R., Benesch, R. E. (1969) Intracellular Organic Phosphates as Regulators of Oxygen Release by Haemoglobin. *Nature* **221**: 618-622.
- Berg, P. E., Williams, D. M., Qian, R.-L., Cohen, R. B., Cao, S.-X., Mittelman, M., Schechter, A. N. (1989) A common protein binds to two silencers 5' to β -globin gene. *Nucleic Acid Research* **17**: 8833-8852.
- Berg, P. E., Mittelman, M., Elion, J., Labie, D., Schechter, A. N. (1991) Increased protein binding to a -530 mutation of the human β -globin gene associated with decreased β -globin synthesis. *Am. J. Haematol.* **36**: 42-47.
- Beris, Ph., Miescher, P. A., Diaz-Chico, J. C., Han, I.-S., Kutlar, A., Hu, H., Wilson, J. B., Huisman, T. H. J. (1988) Inclusion body β -thalassemia trait in a Swiss family is caused by an abnormal hemoglobin (Geneva) with an altered an extended β chain carboxy-Terminus due to a Modification in Codon β 114. *Blood* **72**: 801-805.
- Betke, K., Kleihauer, E. (1962) Hämoglobinanomalien in der deutschen Bevölkerung. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **92**: 1316-1318.
- Bouhass, R., Aguercif, M., Trabuchet, G., Godet, J. (1990) A new mutation at IVS1 nt 2 (T-A), in β -thalassemia from Algeria. *Blood* **76**: 1054-1055.
- Breathnach, R., Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 349-383.
- Bunn, H. F., Forget, B. G. (1986) Hemoglobin. Molecular, genetic and clinical aspects. W. B. Saunders, Comp., Philadelphia London Toronto Mexiko City Rio de Janeiro Sydney Tokio Hong Kong.
- Cao, A., Gossens, M., Pirastu, M. (1989) β -thalassemia mutations in mediterranean population. *Br. J. Haematol.* **71**: 309-312.
- Cheng, T. C., Orkin, S. H., Antonarakis, S. E., Potter, M. J., Sexton, J. P., Markham, A. F., Giardina, P. J. V., Li, A., Kazazian, H. H. (1984) β -thalassemia in Chinese: Use in vivo RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2821-2825.
- Chibani, J., Vidaud, M., Duquesnoy, P., Bergé-Lefranc, J. L., Pirastu, M., Ellouze, F., Rosa, J., Gossens, M. (1988) The peculiar spectrum of β -thalassemia genes in Tunisia. *Hum. Genet.* **78**: 190-192.
- Collins, A. F., Pearson, H. A., Giardina, P., Mc Donagh, K. T., Brusilow, S. W., Dover, G. J. (1995) Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous β -thalassemia: a clinical trial. *Blood* **85**: 43-49.

- Costantini, F., Chada, K., Magram, J. (1986) Correction of murine beta-thalassemia by gene transfer into the germ line. *Science* **233**: 1192-1194.
- Curtin, P. T., Kan, Y. W. (1988) The inactive β -globin gene on a $\gamma\delta\beta$ -thalassemia chromosome has a normal structure and functions normally in vitro. *Blood* **71**: 766-770.
- Cürük, M. A., Howard, S. C., Kutlar, A., Huisman, T. H. J. (1995) A newly discovered β^0 -thalassemia (IVS2-850 G-A) mutation in a north european family. *Hemoglobin* **19**: 207-211.
- De Boer, E., Antoniou, M., Mignotte, V., Wall, L., Grosveld, F. (1988) The human β -globin promoter; nuclear protein factors and erythroid specific induction of transcription. *EMBO J.* **7**: 4203-4212.
- Deidda, G., Novelletto, A., Hafez, M., Al-Tonbary, Y., Felicetti, L., Terrenato, L., Colombo, B. (1990) A new β -thalassemia mutation produced by a single nucleotide substitution in the conserved dinucleotide sequence of the IVS1 consensus acceptor site (AG-AA). *Hemoglobin* **14**: 431-440.
- De Sanctis, V., Zurlo, M. G., Senesi, E., Boffa, C., Cavallo, L., die Gregorio, F. (1988) Insulin dependent diabetes in thalassemia. *Arch. Dis. Child.* **63**: 58-62.
- Dobkin, C., Pergolizi, R. G., Bahre, P., Bank, A. (1983) Abnormal splice in a mutant β -globin gene not at a site of a mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1184-1188.
- Donze, D., Townes, T. M. (1995) Role of erythroid Krüppel like factor in human γ - to β -globin gene switching. *J. Biol. Chem.* **270**: 1955-1959.
- Driscoll, M. C., Dobkin, C. S., Alter, B. P. (1989) $\gamma\delta\beta$ -thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' β -globin gene activation-region hypersensitives sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7470-7474.
- Dzierzak, E. A., Papayannopoulou, T., Mulligan, C. (1988) Lineage-specific expression of a human β -globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells. *Nature* **331**: 35-41.
- Ehlers, K. H., Giardina, P. J., Lesser, M. L., Engle, M. A., Hillgartner, M. W. (1991) Prolonged survival in patients with beta-thalassemia major treated with deferoxamine. *J. Pediatr.* **118**: 540-545.
- Eigel, A., Schnee, J., Oehme, R., Horst, J. (1989) Mutation analysis of β -thalassemia genes in a German family reveals a rare transversion in the first intron. *Hum. Genet.* **81**: 371-372.
- Elion, J., Berg, P. E., Lapoumeroulie, C., Trabuchet, G., Mittelman, M., Krishnamoorthy, R., Schechter, A. N., Labie, D. (1992) DNA sequence variation in a negative control region 5' to the β -globin gene correlates with the phenotypic expression of the β^S mutation. *Blood* **79**: 787-792.
- Engelhard, D., Cividalli, G., Rachmilewitz, E. A. (1975) Splenectomy in homozygous β -thalassemia: a retrospective study of 30 patients. *Br. J. Haematol.* **31**: 391-403.
- Fei, Y. J., Stoming, T. A., Kutlar, A., Huisman, T. H. J., Stamatoyannopoulos, G. (1989) One form of inclusion body β -thalassemia is due to a GAA \rightarrow TAA mutation at codon 121 of the β -chain. *Blood* **73**: 1075-1076.
- Felber, B. K., Orkin, S. H., Hamer, D. H. (1982) Abnormal RNA splicing causes one form of α -thalassemia. *Cell* **29**: 895-902.
- Flatz, G., Hauke, H., Kleihauer, E. (1964) Thalassaemia major in Deutschland. *Klin. Wochenschr.* **42**: 850-852.
- Flint, J., Harding, R. M., Boyse, A. J., Clegg, J. B. (1993) The population genetics of the haemoglobinopathies. In: *Bailliere's Clinical Haematology. The Haemoglobinopathies.* **6**: 215-262.
- Gabutti, V., Piga, A., Sacchetti, L., Sandri, A., Biginelli, M., Saracco, P., Ferri, M. (1989) Quality of life and life expectancy in thalassaemic patients with complications. *Progr. Clin. Biol. Res.* **309**: 35-41.
- Galanello, R., Melis, M. A., Ruggeri, R., Cao, A. (1981) Prospective study of red blood cell indices, hemoglobin A₂, and hemoglobin F in infants heterozygous for β -thalassemia. *J. Pediatr.* **99**: 105-108.
- Galanello, R., Ruggeri, R., Paglietti, P., Addis, M., Melis, M. A., Cao, A. (1983) A family with segregating triplicated alpha globin loci and beta-thalassemia. *Blood* **62**: 1035-1040.
- Gasperini, D., Perseu, L., Melis, M. A., Maccioni, L., Sollaino, M. C., Paglietti, E., Cao, A., Galanello, R. (1998) Heterozygous β -thalassemia with thalassemia intermedia phenotype. *Am. J. Haematol.* **57**: 43-47.
- Giardini, C., Galimberti, M., Lucarelli, G. (1995 a) Bone marrow transplantation in thalassemia. *Annu. Rev. Med.* **46**: 319-330.
- Giardini, C., Galimberti, M., Lucarelli, G., Polchi, P., Angelucci, E., Baronciani, D., Gaziev, D., Erer, B., La Nasa, G., Barbanti, I., Muretto, P. (1995 b) Desferrioxamine therapy accelerates clearance of iron deposits after bone marrow transplantation for thalassemia. *Br. J. Haematol.* **89**: 868-873.

- Gigliani, B., Casini, C., Mantovani, R., Merli, S., Comi, S., Ottolenghi, S., Saglio, D., Camaschella, C., Mazza, U. (1984) A molecular study of a family with Greek hereditary persistence of fetal hemoglobin and β -thalassemia. *EMBO J.* **3**: 2641-2645.
- Gonzales-Redondo, J. M., Stoming, T. A., Lanclos, K. D., Gu, Y. C., Kutlar, A., Nakatsuji, T., Deng, B., Han, I. S., McKie, V. C., Huisman, T. H. J. (1988) Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous β -thalassemia from the southeastern United States. *Blood* **72**: 1007-1014.
- Gonzales-Redondo, J. M., Stoming, T. A., Kutlar, F., Kutlar, A., McKie, V. C., McKie, K. M., Huisman, T. H. J. (1989) Severe β -thalassaemia with a T \rightarrow C substitution in the donor splice site of the first intron of the β -globin gene. *Br. J. Haematol.* **71**: 113-117.
- Graser, E. (1941) Erythroblastenanämie Typ Cooley bei einem deutschen Kinde. *Zeitschrift für Kinderheilkunde* **62**: 698-713.
- Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R., Kollias, B. (1987) Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* **51**: 975-985.
- Grosveld, F., Dillon, N., Higgs, D. (1993) The regulation of human globin gene expression. In: *Bailliere's Clinical Haematology. The Haemoglobinopathies*. **6**: 31-55.
- Hall, G. W., Barnetson, R. A., Thein, S. L. (1992) β -thalassemia in the indigenous British population. *Br. J. Haematol.* **82**: 584-588.
- Hall, G. W., Thein, S. L. (1994) Nonsense codon mutations in the terminal exon of the β -globin gene are not associated with a reduction in β -mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant β -thalassemia. *Blood* **83**: 2031-2037.
- Hattori, Y., Yamashiro, Y., Ohba, Y., Miyaji, T., Morishita, M., Yamamoto, K. U., Yamamoto, K. I., Narai, S., Kimura, A. (1991) A new β -thalassemia mutation (initiations codon ATG \rightarrow GTG) found in the Japanese population. *Hemoglobin* **15**: 317-325.
- Hoffbrand, A. V., Bartlett, A. N., Veys, P. A., O'Connor, N. T., Kontoghiorges, G. J. (1989) Agranulocytosis and thrombocytopenia in a patient with Diamond-Blackfan anemia during oral chelator trial. *Lancet* **2**: 457.
- Housman, D., Forget, B. D., Skoultchi, A., Benz, E. J. (1973) Quantitative deficiency of chain specific messenger ribonucleic acids in the thalassemia syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1809.
- Huisman, T. H. J. (1990) Frequencies of common β -thalassemia alleles among different populations: variability in clinical severity. *Br. J. Haematol.* **75**: 454-457.
- Huisman, T. H. J., Carver, M. F. H., Efremov, G. D. (1996) Human hemoglobin variants. The Sickle Cell Foundation, Augusta, GA, USA.
- Ikuta, T., Kan, Y. W. (1991) In vivo protein-DNA interactions at the β -globin gene locus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **88**: 10188-10192.
- Ikuta, T., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., Kan, Y. W. (1996) Globin Gene Switching. *J. Biol. Chem.* **271**: 14082-14091.
- Indrak, K., Brabec, V., Indrakova, J., Chrobak, L., Sakalova, A., Jarosova, M., Cermak, J., Fei, Y. J., Kutlar, F., Gu, Y. C., Baysal, E., Huisman, T. H. J. (1992) Molecular characterization of β -thalassemia in Czechoslovakia. *Hum. Genet.* **88**: 399-404.
- Jankovic, L., Efremov, G. D., Josifovska, O., Juricic, D., Stoming, T. A., Kutlar, A., Huisman, T. H. J. (1990) An initiations codon mutation as a cause of a β -thalassemia. *Hemoglobin* **14**: 169-176.
- Jankovic, L., Dimovski, A. J., Sukarova, E., Juricic, D., Efremov, G. D. (1992) A new mutation in the β -globin gene (IVS2-850 G-C) found in a Yugoslavian β -thalassemia heterozygote. *Haematologica* **77**: 119-121.
- Joishy, S. K., Shafer, J. A., Rowley, P. T. (1986) The contribution of red cell morphology to the diagnosis of β -thalassemia trait. *Blood Cells* **11**: 367-374.
- Kacian, D. L., Gambino, R., Dow, L. W., Grossbard, E., Natta, C., Ramirez, F., Spiegelmann, S., Marks, P. A., Bank, A. (1973) Decreased globin messenger RNA in thalassemia detected by molecular hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1886-1890.
- Kanavakis, E., Wainscoat, J. S., Wood, W. G., Weatherall, D. J., Cao, A., Furbetta, M., Galanello, R., Georgiou, D., Sophocleous, T. (1982) The interaction of α thalassaemia with heterozygous β thalassaemia. *Br. J. Haematol.* **52**: 465-473.
- Kazazian, H. H., Orkin, S. H., Boehm, C. D., Sexton, J. P., Antonarakis, S. E. (1983) β -thalassemia due to a deletion of the nucleotide which is substituted in the β^s -globin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **35**: 1028-1033.

- Kazazian, H. H., Orkin, S. H., Antonarakis, S. E., Sexton, J. P., Boehm, C. D., Goff, S. C., Waber, P. G. (1984) Molecular characterization of seven β -thalassemia mutations in Asian Indians. *EMBO J.* **3**: 593-596.
- Kazazian, H. H., Orkin, S. H., Boehm, C. D., Goff, S. C., Wong, C., Dowling, C. E., Newburger, P. E., Knowlton, R. G., Brown, V., Donis-Keller, H. (1986) Characterization of a spontaneous mutation to a β -thalassemia allele. *Am. J. Hum. Genet.* **38**: 860-867.
- Kazazian, H. H., Boehm, C. D. (1988) Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood* **72**: 1107-1116.
- Kazazian, H. H., Dowling, C. E., Hurwitz, R. L., Coleman, M., Adams, J. G. (1989) Thalassemia mutations in exon 3 of the β -globin gene often cause a dominant form of thalassemia and show no predilection of malarial-endemic regions of the world. *Am J. Hum Genet.* **45**: Suppl. 0950.
- Kazazian, H. H., Dowling, C. E., Hurwitz, R. L., Coleman, M., Stopeck, A., Adams, J. G. (1992) Dominant thalassemia-like phenotypes associated with mutations in exon 3 of the β -globin gene. *Blood* **79**: 3014-3018.
- Kimberland, M. L., Boehm, C. D., Kazazian, H. H. (1995) Two novel β -thalassemia alleles: Poly A signal (AATAAA \rightarrow AAAA) and -92 C \rightarrow T. *Hum. Mut.* **5**: 275-276.
- Kinniburgh, A. J., Maquat, L. E., Schedl, T., Rachmilewitz, E., Ross, J. (1982) mRNA-deficient β -thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucleic Acid Research* **10**: 5421-5427.
- Kohne, E., Kleihauer, E. (1974) Häufigkeit und Formen von anomalen Hämoglobinen und Thalassämie-Syndromen in der deutschen Bevölkerung. *Klin. Wochenschr.* **52**: 1003-1010.
- Kollia, P., Gonzales-Redondo, J. M., Stoming, T. A., Loukopoulos, D., Politis, C. (1989) Frameshift codon 5 (FSC-5 (-CT)) thalassemia: a novel mutation in a Greek patient. *Hemoglobin* **13**: 597-604.
- Kugler, W., Enssle, J., Hentze, M. W., Kulozik, A. E. (1995) Nuclear degradation of nonsense mutated β -globin mRNA: a post-transcriptional mechanism to protect heterozygotes from severe clinical manifestations of β -thalassemia. *Nucleic Acids Research* **23**: 413-418.
- Kulozik, A. E., Thein, S. L., Wainscoat, J. S., Gale, R., Kay, L. A., Wood, J. K., Weatherall, D. J., Huehns, E. R. (1987) Thalassaemia intermedia: interaction of the triple α -globin gene arrangement and heterozygous β -thalassaemia. *Brit. J. Haematol.* **66**: 109-112.
- Kulozik, A. E., Kohne, E., Kleihauer, E. (1988) Die molekulare Grundlage der hereditären Persistenz fetalen Hämoglobins (HPFH) und des Hb-Schaltmechanismus. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **136**: 751-757.
- Kulozik, A. E., Bellan-Koch, A., Bail, S., Kohne, E., Kleihauer, E. (1991a) Thalassemia intermedia: Moderate Reduction of β Globin Gene Transcriptional Activity by a Novel Mutation of the Proximal CACCC Promoter Element. *Blood* **77**: 2054-2058.
- Kulozik, A. E., Bail, S., Bellan-Koch, A., Bartram, C. R., Kohne, E., Kleihauer, E. (1991 b) The proximal element of the β -globin locus control region is not functionally required in vivo. *J. Clin. Invest.* **87**: 2142-2146.
- Kulozik, A. E. (1991 c) β -Thalassämie: molekulare Pathogenese und klinische Variabilität. *Klinische Pädiatrie* **203**: 276-283.
- Kulozik, A. E. (1994 a) β -Thalassämie - Grundlagen, derzeitige Therapieempfehlungen und Perspektiven. *Pädiatr. Hämatologie*, Band **100**: 30-50.
- Kulozik, A. E. (1994 b) Die somatische Gentherapie: „Science“ oder „fiction“ ? *Pädiatr. Hämatologie*, Band **100**: 178-183.
- Kutlar, A., Kutlar, F., Gu, L-G., Mayson, S. M., Huisman, T. H. J. (1990) Fetal hemoglobin in normal adults and β -thalassemia heterozygotes. *Hum. Genet.* **85**: 106-110.
- Laig, M., Pape, M., Hundrieser, J., Flatz, G. (1990) Mediterranean types of β -thalassaemia in the German population. *Hum. Gen.* **85**: 135-137.
- Landin, B., Rudolphi, O., Ek, B. (1995) Initiation codon mutation (ATG-ATA) of the β -globin gene causing β -thalassemia in a swedish family. *Am. J. Haematol.* **48**: 158-162.
- Lapoumeroulie, C., Pagnier, J., Bank, A., Labie, D., Krishnamoorthy, R. (1986) β -thalassemia due to a novel mutation in IVS1 donor site consensus sequences creating a restriction site. *Biochem. Biophys. Res.* **139**: 709-713.
- Lawn, R. M., Efstratiadis, A., O'Connell, C., Maniatis, T. (1980) The Nucleotide Sequence of the Human β -Globin Gene. *Cell* **21**: 647-651.
- Lewis, B. (1994) The apparatus for nuclear splicing. In: *Genes V, Oxford University Press, Oxford*: pp. 921-923.
- Lim, S.-K., Bieker, J. J., Lin, C.-S., Costantini, F. (1997) A shortened life span of EKLF $^{-/-}$ adult erythrocytes, due to a deficiency of β -globin chains, is ameliorated by human γ -globin chains. *Blood* **90**: 1291-1299.

- Luzzi, G. A., Merry, A. H., Newbold, C. I., Marsh, K., Pasvol, G., Weatherall, D. J. (1991) Surface antigen expression on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes is modified in α - and β -thalassemia. *J. Exp. Med.* **173**: 785-791.
- Lucarelli, G., Galimberti, M., Polchi, P. (1992) Bone marrow transplantation in adult thalassemia. *Blood* **80**: 1603-1607.
- Lucarelli, G., Galimberti, M., Polchi, P., Angelucci, E., Baronciani, D., Giardini, C., Andreani, M., Agostinelli, F., Albertini, F., Clift, R. A. (1993) Marrow transplantation in patients with thalassemia responsive to iron chelation therapy. *N. Engl. J. Med.* **329**: 840-844.
- Metha, J., Singhal, S., Revankar, R., Walvalkar, A., Chablani, A., Metha, B. C. (1991) Fatal systemic erythematous in patients taking oral chelator L1. *Lancet* **337**: 298.
- Meyers Konversationslexikon (1904) Sechste Auflage, Band 4, Bibliographisches Institut, Leipzig und Wien, S. 768 ff.
- Miller, I., Bieker, J. J. (1993) A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biology* **13**: 2776-2786.
- Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic acid research* **10**: 459-472.
- Murru, S., Loudianos, G., Cao, A., Vaccargiu, S., Pirastu, M., Sciarratta, G. V., Agosti, S., Parodi, M. I. (1990) A β -thalassemia carrier with normal sequence within the β -globin gene. *Blood* **76**: 2164-2165.
- Murru, S., Loudianos, G., Porcu, S., Sciarratta, G. V., Agosti, S., Cao, A., Pirastu, M. (1992) A β -thalassemia phenotype not linked to the β -globin cluster in an Italian family. *Am J. Haematol.* **81**: 283-287.
- Myers, R. M., Tilly, K., Maniatis, T. (1986) Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter. *Science* **232**: 613-618.
- Nicholl, D. S. T. (1995) Gentechnische Methoden. Spektrum Verlag, Heidelberg: S. 37 ff.
- Orkin, S. H., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., Ostrer, H., Goff, H., Goff, S. C., Sexton, J. P. (1982 a) Abnormal RNA-processing due to the exon mutation of β^E -globin gene. *Nature* **300**: 768.
- Orkin, S. H., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., Goff, S. C., Boehm, C. D., Sexton, J. P., Waber, P. G., Giardina, P. J. V. (1982 b) Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphism with DNA polymorphism in human β -globin gene cluster. *Nature* **296**: 627-631.
- Orkin, S. H., Sexton, J. P., Goff, S. C., Kazazian, H. H. (1983) Inactivation of an acceptor RNA splice site by a short deletion in β -thalassemia. *J. Biol. Chem.* **258**: 7249-7251.
- Orkin, S. H., Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H. (1984) Base substitution at position -88 in a β -thalassemic globin gene. *J. Biol. Chem.* **259**: 8679-8681.
- Orkin, S. H., Cheng, T. C., Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H. (1985) Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human β -globin gene. *EMBO J.* **4**: 453-456.
- Orkin, S. H. (1990) Globin gene regulation and switching: Circa 1990. *Cell* **63**: 655-672.
- Orkin, S. H. (1995) Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem.* **231**: 271-281.
- Öner, R., Altay, C., Gurgey, A., Aksoy, M., Kilinc, Y., Stoming, T. A., Reese, A. L., Kutlar, F., Huisman, T. H. J. (1990) β -Thalassemia in Turkey. *Hemoglobin* **14**: 1-13.
- Padanilam, B. J., Huisman, T. H. J. (1986) The β^o -thalassemia in an American Black family is due to a single nucleotide substitution in the acceptor splice junction of the second intervening sequence. *Am. J. Hematol.* **22**: 259-263.
- Perkins, A. C., Sharpe, A. H., Orkin, S. H. (1995) Lethal β -thalassemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**: 318-322.
- Perrine, S. P., Dover, G. H., Daftari, P., Walsh, C. T., Jin, Y. X., Mays, A., Faller, D. V. (1994) Isobutyramide, an orally bioavailable butyrate analogue, stimulates fetal globin gene expression in vitro and in vivo. *Br. J. Haematol.* **88**: 555-561.
- Perutz, M. F. (1970) Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin. *Nature* **228**: 726-739.
- Piomelli, S. (1993) Management of Cooley's anaemia. In: *Bailliere's Clinical Haematology. The Haemoglobinopathies.* **6**: 287-298.
- Rapoport, S. (1968) The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. *Essays-Biochem.* **4**: 69-103.
- Ringelmann, B., Szelenyi, J. G., Horanyi, M., Svobodova, M., Divoky, V., Indrak, K., Hollán, S., Marosi, A., Laub, M., Huisman, T. H. J. (1993) Molecular characterization of β -thalassemia in Hungary. *Hum. Genet.* **92**: 385-387.
- Rebulla, P., Modell, B. (1991) Transfusion requirements and effects in patients with thalassemia major. *Lancet* **337**: 277-280.
- Reed, R., Maniatis, T. (1985) Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell* **41**: 95-105.

- Ronchi, A., Nicolis, S., Santoro, C., Ottolenghi, S. (1989) Increased Sp 1 binding mediates erythroid-specific overexpression of a mutated (HPFH) γ -globin promoter. *Nucleic Acid Research* **17**: 10231-10241.
- Rosatelli, M. C., Tuveri, T., Scalas, M. T., Leoni, G. B., Sardu, R., Faà, V., Meloni, A., Pischedda, M. A., Demurtas, M., Monni, G., Cao, A. (1992) Molecular screening and fetal diagnosis of β -thalassemia in the Italian population. *Hum. Genet.* **89**: 585-589.
- Rund, D., Rachmilewitz, E. (1995) Thalassemia major 1995: older patients, new therapies. *Blood Rev.* **9**: 25-32.
- Saba, L., Meloni, A., Sardu, R., Travi, M., Primignani, P., Rosatelli, M. C., Cao, A. (1992) A novel β -thalassemia mutation (G-A) at the initiation codon of the β -globin gene. *Hum. Mut.* **1**: 420-422.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1986) Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**: 163-166.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 1.
- Sampietro, M., Cazzola, M., Cappellini, M. D., Fiorelli, G. (1983) The triplicated alpha-gene locus and heterozygous beta-thalassaemia: a case of thalassaemia intermedia. *Br. J. Haematol.* **55**: 709-710.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Scheinert, P., Behrens, B., Kahle, D. (1995) Optimierung von DNA-Amplifikations-Protokollen. Spektrum-Verlag, Heidelberg: S. 53-56.
- Schwartz, E. I., Golt'sov, A. A., Kaboev, O. K., Alexeev, A. A., Solovyev, G. Ya., Surin, V. L., Lukianenko, A. V., Vinogradov, S. V., Berlin, Yu. A. (1989) A novel frameshift mutation causing β -thalassemia in Azerbaijan. *Nucleic Acid Research* **17**: 3997.
- Schwarz, C., Vetter, B., Kohne, E., Kulozik, A. E. (1997) β -Thalassämie in Deutschland: Molekulargenetik und klinischer Phänotyp in der zugewanderten und einheimischen Bevölkerung. *Klin. Pädiatr.* **209**: 172-177.
- Semenza, G. L., Delgrosso, K., Poncz, M., Malladi, P., Schwartz, E., Surrey, S. (1984 a) The silent carrier allele: β -thalassemia without a mutation in the β -globin gene or its immediate flanking regions. *Cell* **39**: 123-128.
- Semenza, G. L., Malladi, P., Surrey, S., Delgrosso, K., Poncz, M., Schwartz, E. (1984 b) Detection of a novel DNA polymorphism in the β -globin gene cluster. *J. Biol. Chem.* **259**: 6045-6048.
- Shapiro, M. B., Senapathy, P. (1987) RNA splice junction of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acid research* **15**: 7155-7174.
- Sher, G. D., Ginder, G. D., Little, J., Yang, S., Dover, D. J., Olivieri, N. F. (1995) Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with β -hemoglobinopathies. *N. Engl. J. Med.* **332**: 1606-1610.
- Spritz, R. A., Jagadeeswaran, P., Choudary, P. V., Biro, P. A., Elder, J. T., DeRiel, J. K., Manley, J. L., Gefter, M. L., Forget, B. G., Weissman, S. M. (1981) Base substitution in an intervening sequence of a β^+ -thalassemic human globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2455-2459.
- Stamatoyannopoulos, G., Woodson, R., Papayannopoulo, T., Heywood, D., Kurachi, S. (1974) Inclusion-body thalassemia trait: A form of β -thalassemia producing clinical manifestations in simple heterozygotes. *N. Engl. J. Med.* **290**: 939-943.
- Teichgräber, L., Kleihauer, E. (1969) Homozygote β -Thalassämie (Cooley-Anämie) in einer deutschen Familie. *Folia haemat.* **92**: 205-214.
- Thein, S. L., Al-Hakim, I., Hoffbrand, A. V. (1984) Thalassemia intermedia: a new molecular basis. *Br. J. Haematol.* **56**: 333-337.
- Thein, S. L., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I. J., Hutchingson, R. M., Old, J. M., Wood, W. G., Clegg, J. B., Wheaterall, D. J. (1990) Molecular basis for dominantly inherited inclusion body β -thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3924-3928.
- Thein, S. L., Hinton, J. (1991) A simple and rapid method of direct sequencing using dynabeads. *Br. J. Haematol.* **79**: 113-115.
- Thein, S. L. (1992) Dominant β -thalassemia: molecular basis and pathophysiology. *Br. J. Haematol.* **80**: 273-277.
- Thein, S. L., Wood, W. G., Wickramasinghe, S. N., Galvin, M. C. (1993) β -thalassemia unlinked to the β -globin gene in an english family. *Blood* **82**: 961-967.

- Touraine, J. L., Raudrant, D., Rebaud, A., Roncarolo, M. G., Laplace, S., Gebuhrer, L., Betuel, H., Frappaz, D., Freycon, S., Zabet, M. T., Touraine, F., Souillet, G., Philippe, N., Vullo, C. (1992) In utero transplantation of stem cells in humans: immunological aspects and clinical follow up. *Bone marrow transplant.* **9**: 21-126.
- Trecartin, R. F., Liebhaber, S. A., Chang, J. C., Lee, K. Y., Kan, Y. W., Furbetta, M., Angius, A., Cao, A. (1981) β^0 -thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J. Clin. Invest.* **68**: 1012-1017.
- Treisman, R., Proudfoot, N. J., Shander, M., Maniatis, T. (1982) A single base change at a splice site in a β^0 -thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell* **29**: 903-911.
- Treisman, R., Orkin, S. H., Maniatis, T. (1983) Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassemia genes. *Nature* **302**: 591-596.
- Vanin, E. F., Henthorn, P. S., Kioussis, D., Grosveld, F., Smithies, O. (1983) Unexpected relationship between four large deletions in the human β -globin gene cluster. *Cell* **35**: 701-709.
- Vetter, B., Schwarz, C., Kohne, E., Kulozik, A. E. (1997) β -Thalassemia in the immigrant and non immigrant German populations. *Br. J. Haematol.* **97**: 266-272.
- Vullo, C., De Sanctis, V., Katz, M., Wonke, B., Hoffbrand, V. A., Bagni, B., Torresani, T., Tolis, G., Masiero, M., Di Palma, A., Bogatti, L. (1990) Endocrine abnormalities in thalassemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **10**: 293-310.
- Wagner, J. E (1994) Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience. *Blood Cells* **20**: 227-233.
- Wainscoat, J. S., Old, J. M., Weatherall, D. J., Orkin, S. H. (1983 a) The molecular basis for the clinical diversity of β -thalassemia in Cypriots. *Lancet* **1**: 1235-1237.
- Wainscoat, J. S., Kanavakis, E., Wood, W. G., Letsky, E. A., Huehns, E. R., Marsh, G. W., Higgs, D. R., Clegg, J. B., Weatherall, D. J. (1983 b) Thalassemia intermedia in Cyprus: the interaction of α and β -thalassemia. *Br. J. Haematol.* **53**: 411-416.
- Wakamatsu, C., Ichinose, M., Manabe, J., Fucharoen, S., Sawadw, H., Ohga, S., Nishimura, J., Nukina, H., Harada, T., Shirahata, S., Moriwaki, Y., Uike, N., Kozuru, M., Ohi, N., Mineta, M., Nomiyama, M., Fukumaki, Y. (1994) Molecular basis of β -thalassemia in Japan: heterogeneity and origins of mutations. *Acta Haematol.* **91**: 136-143.
- Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Knox-Macaulay, H. H., Bunch, C., Hopkins, C. R., Temperley, I. G. (1973) A genetically determined disorder with features both of thalassemia and congenital dyserythropoietic anaemia. *Br. J. Haematol.* **24**: 679-702.
- Weatherall, D. J., Clegg, J. B. (1981) The Thalassemia syndromes. Blackwells, Oxford.
- Westaway, D., Williamson, R. (1981) An intron nucleotide sequence variant in a cloned β^+ -thalassemia globin gene. *Nucleic Acid Research* **9**: 1777-1788.
- Wilkie, A. O. M., Zeitlin, H. C., Lindenbaum, R. H., Buckle, V. J., Fischel-Ghodsian, N., Chui, D. H. K., Gardner-Medwin, D., MacGillivray, Weatherall, D. J., Higgs, D. R. (1990) Clinical features and molecular analysis of the α -thalassemia/mental retardation syndromes. II. Cases without detectable abnormality of the α -globin complex. *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 1127-1140.
- Wink, M., Wehrle, H. (1994) PCR im medizinischen und biologischem Labor-Handbuch für den Praktiker. GIT-Verlag, Darmstadt: S. 44 ff.
- Wong, C., Antonarakis, S. E., Goff, S. C., Orkin, S. H., Boehm, C. D., Kazazian, H. H. (1986) On the origin and spread of β -thalassemia: recurrent observation of four mutations in different ethnic groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6529-6532.
- Wong, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Erlich, H. A., Kazazian, H. H. (1987) Characterization of β -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* **330**: 384-386.
- Wong, S. C., Stoming, T. A., Efremov, G. D., Huisman, T. H. J. (1989) High frequencies of a rearrangement (+ATA -T) at position -530 to the β -globin gene in different populations indicate the absence of a correlation with a silent β -thalassemia determinant. *Hemoglobin* **13**: 1-5.
- Wood, W. G., Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Hambling, T. J., Edwards, J. H., Barlow, A. M. (1977) Heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin (heterocellular HPFH) and its interaction with β -thalassemia. *Brit. J. Haematol.* **36**: 461-473.
- Yamamoto, K. U., Yamamoto, K. I., Hattori, Y., Yamashiro, Y., Hoshitani, M., Morishita, M., Ohba, Y., Katahira, H., Karasawa, M., Omine, M., Narukiyo, T., Hirabayashi, K., Miyawaki, S. (1992) Two β -thalassemia mutations in Japan: Codon 121 (GAA→TAA) and IVS-I-130 (G→C). *Hemoglobin* **16**: 295-302.

Danksagung

Für die Übernahme des Themas, das Vertrauen und die umfassende, stets schnelle und unkomplizierte Unterstützung und Beratung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. E. Kulozik sehr herzlich bedanken. Ihm gilt mein besonderer Dank hinsichtlich seiner Ermutigungen, meine erhobenen Daten in mündlicher und schriftlicher Form zu präsentieren.

Daneben gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Barbara Vetter größter Dank für ihre unschätzbare Hilfe bei der Planung und Durchführung der Arbeiten und für die wertvollen Hinweise in Bezug auf alle methodischen und labortechnischen Aspekte des Themas.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors für Kinderheilkunde in der Ziegelstraße für die fachlich interessanten Diskussionen und das gute Arbeitsklima bedanken.

Danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. Anke Maaßen, deren Erfahrungen und Zeit mir stets zur Verfügung standen, um anspruchsvolle Poster und Grafiken zu erstellen.

Für die ungezählten Stunden bei der Korrektur der Arbeit und der Umsetzung meiner Layout-Vorstellungen am Computer danke ich meinem Mann Marcus allerherzlichst.

Meinen Freunden, Eltern und Schwiegereltern danke ich für die moralische Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.

Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre an Eides Statt, daß die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, März 1998

Claudia Schwarz-Muche

Curriculum vitae

Claudia Schwarz-Muche

Persönliche Daten

geboren 8. September 1970 in Erfurt
 Eltern Rosemarie und Volker Schwarz
 verheiratet mit Dr. J. Marcus Muche

Schulbildung

Sept. 1977 - Juli 1987 Polytechnische Oberschule Bad Sulza
 Sept. 1987 - Juli 1989 Erweiterte Oberschule Apolda
 Juli 1989 Abitur, Prädikat „Sehr gut“

Studium

Sept. 1989 - Sept. 1990 Vorpraktikum an der Kinderklinik Weimar
 Okt. 1990 Aufnahme des Medizinstudiums an der Medizinischen Akademie Dresden,
 Beginn der vorklinischen Ausbildung an der Charité Berlin
 März und Aug. 1992 Physikum
 Aug. 1992 - Juni 1993 Studium an der *Rijksuniversiteit te Leiden*, Niederlande
 Juli 1993 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Charité Berlin
 Juli - Sept. 1993 1. Staatsexamen
 März - Juni 1996 2. Staatsexamen
 Okt. 1996 - Febr. 1997 PJ an der Klinik für Kinderchirurgie, Virchow-Klinikum Berlin
 Febr. - Mai 1997 PJ an der Klinik für Innere Medizin: Hämatologie/Onkologie, Charité Berlin
 Juni - Juli 1997 PJ am *Institute of Child Health, University of Liverpool*
 Aug. - Sept. 1997 3. Staatsexamen, Note „Gut“
 Okt. 1997 - Jan. 1998 PJ im Fachbereich Gynäkologie der Parkklinik Weißensee, Berlin

Famulaturen

Aug. 1993 Kinderklinik der Spreewaldklinik Lübben
 Aug. - Sept. 1994 Gynäkologische Praxis Flöter/Fürstenhöfer, Cottbus
 Sept. 1994 Medizinische Klinik, Abt. Rheumatologie, Carl-Thiem-Klinikum Cottbus

Promotion

Okt. 1994 Beginn der Untersuchungen zum Thema „Molekulare Charakterisierung der
 β -Thalassämie bei Probanden deutscher Herkunft“ im Labor für pädiatrische
 Molekularbiologie an der Charité Berlin
 April 1995 - März 1996 Beurlaubung vom Studium, Arbeit am Teilprojekt der klinischen Forschergruppe
 der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde an der Charité: „Molekulare
 Mechanismen der klinischen Variabilität monogener Erbkrankheiten am
 Beispiel
 März 1996 der β -Thalassämien“ (Leiter: Prof. Dr. Kulozik)
 März 1998 Abschluß der experimentellen Arbeiten
 Abgabe der Promotionsschrift

Publikationen

Originalarbeiten

Vetter, B., Schwarz, C., Kohne, E., Kulozik, A. E. (1997) Beta-thalassaemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br. J. Haematol.* **97**: 266-272.

Schwarz, C., Vetter, B., Kohne, E., Kulozik, A. E. (1997) β -Thalassämie in Deutschland: Molekulargenetik und klinischer Phänotyp in der zugewanderten und in der heimischen Bevölkerung. *Klin. Pädiatr.* **209**: 172-177.

Vorträge/ Poster

Schwarz, C., Kohne, E., Kulozik, A. E. (1995) β -Thalassaemia: the molecular basis in subjects of German descent. *Eur. J. Pediatr.* **154**: 790. (abstract)

Schwarz, C., Kulozik, A. E. (1995) β -Thalassaemia: the molecular basis in subjects of German descent. (abstract); International Student's Conference Berlin.