

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Überblick.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Historischer Überblick.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Genetik.....	2
1.1.4	Klinik.....	6
1.1.5	Humangenetische Betreuung.....	8
<b>1.2</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
1.2.1	Stand bis zum Beginn der eigenen Arbeit.....	13
1.2.2	Ziel der Arbeit.....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientendaten und Probenmaterial.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden der DNA-Analyse.....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Extraktion der DNA.....	17
2.2.2	Southern Blotting.....	17
2.2.3	PCR-Methode.....	18
2.2.4	Heteroduplexmethode.....	21
2.2.5	Automatische Sequenzierung.....	22
<b>2.3</b>	<b>Mathematische und statistische Verfahren.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Erfassung und Charakterisierung der zur genomischen Diagnostik anstehenden Familien.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Indirekte genomische Diagnostik.....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Allelfrequenzen/Heterozygotenrate.....	25
3.2.2	Haplotypfrequenzen/Kopplungsungleichgewicht.....	27

3.2.3	RFLP-Analyse und Konduktorinnendiagnostik .....	28
3.2.4	Einschränkungen der indirekten Diagnostik .....	31
<b>3.3</b>	<b>Direkte Diagnostik.....</b>	<b>35</b>
3.3.1	Southern Blotting .....	35
3.3.2	Sequenzanalyse .....	39
<b>3.4</b>	<b>Unabhängige Mutationen.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Neumutationen .....</b>	<b>46</b>
3.5.1	Nachweis von Neumutationen .....	46
3.5.2	Risiko für Mütter sporadischer Fälle.....	48
<b>3.6</b>	<b>HB-Konduktorinnen mit klinischer Symptomatologie.....</b>	<b>49</b>
<b>3.7</b>	<b>Mutationsnachweis bei obligaten/möglichen Konduktorinnen mit familiärer HB in deren Familien kein Patient untersucht werden konnte .....</b>	<b>50</b>
<b>3.8</b>	<b>Pränatale Diagnostik.....</b>	<b>51</b>
3.8.1	Angebot einer pränatalen Diagnostik .....	51
3.8.2	Durchgeführte pränatale Diagnosen.....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse der zur Untersuchung vorliegenden Familien.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Indirekte genomische Diagnostik.....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Informativität der untersuchten RFLP/Heterozygotenrate .....	54
4.2.2	Kopplungsungleichgewichte.....	56
4.2.3	Grenzen der indirekten Diagnostik.....	58
<b>4.3</b>	<b>Direkte genomische Diagnostik.....</b>	<b>60</b>
4.3.1	Mutationsnachweis durch Southern Blotting.....	60
4.3.2	Mutationsnachweis durch Sequenzanalyse.....	61
4.3.3	Mutationsscreening durch Heteroduplex.....	65
<b>4.4</b>	<b>Sporadische Fälle.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>Mutationsnachweis bei möglichen Konduktorinnen mit familiärer HB in deren Familien kein Patient untersucht werden konnte .....</b>	<b>68</b>
<b>4.6</b>	<b>Pränatale Diagnostik.....</b>	<b>70</b>
<b>4.7</b>	<b>Vergleich der direkten und der indirekten Diagnostik.....</b>	<b>71</b>

<b>5 Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>78</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>87</b>
<b>7.1 Abkürzungen .....</b>	<b>87</b>
<b>7.2 Tabellen .....</b>	<b>88</b>
<b>7.3 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7.4 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>98</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick

### 1.1.1 Historischer Überblick

Schon vor mehr als 1700 Jahren wurde der besondere Modus der Vererbung der Hämophilie erkannt. Im babylonischen Talmud finden sich Regeln, welche die Beschneidung von Jungen verbieten, wenn bereits zwei Söhne der Mutter durch Verblutung starben [Rosner 1969]. Dadurch dass Königin Victoria (1819-1901) als Stammutter und Konkubine die Erkrankung an viele europäische Höfe vererbte, wurde die so genannte Bluterkrankheit allgemein bekannt. Erstmals verwendet wurde der Begriff „Hämophilie“ 1828 durch Friedrich Hopff in seiner Dissertation „Über die Hämophilie oder die erbliche Neigung zu tödlichen Blutungen“ [Hopff 1828]. Dass dem gleichen klinischen Bild zwei verschiedene Ursachen zugrunde lagen, erkannten Biggs et al. 1952 und beschrieben den Faktor IX(FIX)-Mangel als „Christmas disease“, im Gegensatz zur „klassischen“, durch Faktor VIII-Mangel hervorgerufenen Hämophilie (A). Heute wird meist der Begriff Hämophilie B (HB) für den FIX-Mangel verwendet. [Oldenburg und Brackmann 1998, Kaufman 1999]

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der HB beträgt 1:25000 bis 1:30000 männliche Neugeborene, sie ist damit die zweithäufigste hereditäre Koagulopathie. Es finden sich keine geographischen oder ethnischen Unterschiede der Häufigkeit [Jones 1996]. Die HB ist ungefähr fünfmal seltener als die Hämophilie A. Man diskutiert als Ursache zum einen den Größenunterschied der Gene (Faktor VIII-Gen: 186kb, FIX-Gen 38kb) [Kaufman 1999] und zum anderen eine höhere Mutationsrate des Faktor VIII-Gens ( $2,7-4,2 \times 10^{-5}$ ) [Oldenburg und Brackmann 1998] als die des FIX-Gens ( $2,5 \times 10^{-6}$ ) [Knobloch und Ludwig 1998].

Die beobachtete Prävalenz setzt sich aus der Inzidenz und der Mortalität zusammen. Seit etwa 30 Jahren steigt die Anzahl der Nachkommen von

Hämophilen. Dieses ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die optimierte Therapie zu einer längeren Lebenserwartung führt und einen verbesserten physischen Zustand mit besserer sozialer Integration der Patienten bedingt [Rosendaal und Briet 1990; Schramm und Schulte-Hillen 1997]. Die hohe Mortalität bei Hämophilie Patienten führte noch vor 25 Jahren zu einer durchschnittlichen Lebenserwartung von etwa 30 Jahren [Rosendaal und Briet 1990, Schiller et al. 1985]. Früher führten meist Blutungen, v.a. solche intrakranieller Lokalisation, zum Tode [Schiller et al. 1985]. Seit Anfang der 80er Jahre sind vermehrt Virusinfektionen für die Mortalität innerhalb der Hämophilie Population verantwortlich. Dieses ist bedingt durch die hohe Prävalenz von HIV-, Hepatitis B- und C Infektionen [Oldenburg und Brackmann 1998]. Die Einführung von virusinaktivierten Präparaten sowie die Optimierung der Therapie (s. 1.1.4, S. 6) führen bei einem heute in der westlichen Welt geborenen Hämophilen zu einer weitgehend normalen Lebenserwartung und -qualität [Bolton-Maggs und Pasi 2003; Oldenburg und Brackmann 1998].

### **1.1.3 Genetik**

#### **1.1.3.1 Erbgang**

Die Hämophilie B ist eine X-chromosomal-rezessive Erkrankung. Da Männer nur ein X-Chromosom haben, führt ein Defekt im FIX-Gen zur Ausprägung einer Hämophilie. Bei einer Frau kompensiert das zweite, intakte X-Chromosom den Defekt, so dass es meist zu keiner Ausprägung der Erkrankung kommt. Ein Patient mit HB gibt das defekte Gen an alle seine Töchter weiter und sein Y-Chromosom an seine Söhne (s. Abb. 1.1, S. 3). Somit können die Söhne die HB vom Vater nicht erben. Alle seine Töchter sind obligate Konduktorinnen. Da eine Konduktorin ein X-Chromosom mit einem intakten und eins mit einem mutierten FIX-Gen besitzt, gibt sie mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit das defekte Gen an ihre Nachkommen weiter. Folglich sind statistisch gesehen die Hälfte ihrer Söhne erkrankt und die Hälfte ihrer Töchter Konduktorinnen. Das Risiko, ein erkranktes Kind zu bekommen, beträgt bei jeder Schwangerschaft 25%.

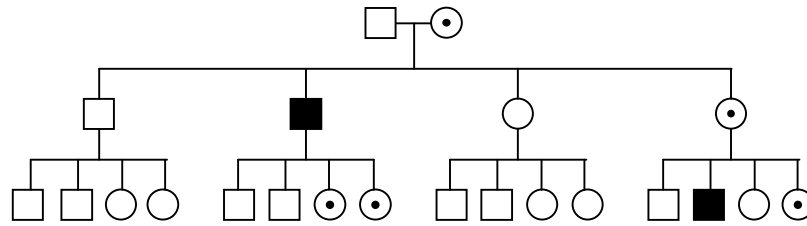


Abb. 1.1: X-chromosomaler Erbgang: Quadrate sind männliche Individuen; schwarz ausgefüllte Quadrate bezeichnen erkrankte Personen. Kreise sind weibliche Individuen; mit einem schwarzen Punkt versehene Kreise bezeichnen Konduktorinnen

Folgende Frauen sind genetisch sichere heterozygote Merkmalsträger und werden als obligate Konduktorinnen bezeichnet [Herrmann und Scharrer 1995]:

- Mütter von mehr als einem hämophilen Sohn, die verschiedene Väter haben. Sind keine weiteren männlichen Verwandten betroffen, so besteht die Möglichkeit eines mütterlichen Keimzellmosaiks (s.u.)
- Mütter von einem hämophilen Sohn und einer Tochter, die selbst einen erkrankten Sohn hat
- Mütter von einem hämophilen Sohn mit weiteren Patienten in der mütterlichen Linie.
- Töchter eines Patienten (eine sehr seltene Ausnahme bilden Töchter von Patienten, die ein somatisches Mosaik sind (s.u.))

Eine genetisch mögliche Konduktorin kann das defekte Gen geerbt haben. Zu dieser Gruppe gehören:

- Töchter von Konduktorinnen
- in der mütterlichen Linie mit einer Konduktorin oder einem Patienten verwandte Frauen
- Mütter von sporadischen Patienten, d.h. die Hämophilie ist bei diesem Patienten in der Familie erstmals aufgetreten
- Mütter von zwei erkrankten Söhnen ohne weitere männliche Hämophile in der Familie

Die Hämophilie kann in der Familie bereits bekannt sein, oder sie tritt bei dem Patienten erstmals in der Familie auf.

Der Ursprung der Mutation ist bei sporadisch auftretender Hämophilie nicht aus dem Stammbaum ersichtlich. Es bestehen vier Möglichkeiten der Entstehung einer Neumutation (s. Tabelle 1.1) [Wilcox und Connor 1997]:

*Tabelle 1.1: Mutationsursprung bei Patienten mit sporadischer Hämophilie und impliziertes Risiko für Verwandte des Patienten, ebenfalls Merkmalsträger zu sein (nach Wilcox und Connor 1997)*

Mutationsursprung	Risiko für Verwandte des Patienten mit sporadischer HB Merkmalsträger zu sein			
	Großmutter <sup>a</sup>	Schwestern	Töchter	Brüder
Mutter Konduktorin	bis zu 100% <sup>b</sup>	50%	100%	50%
Mutter Mosaik	0%	bis zu 50% <sup>c</sup>	100%	bis zu 50% <sup>c</sup>
Patient Neumutation	0%	0%	100%	0%
Patient Mosaik	0%	0%	bis zu 100% <sup>c</sup>	0%

<sup>a</sup> mütterlicherseits

<sup>b</sup> wenn Neumutation in großväterlichen Keimzellen ausgeschlossen werden kann

<sup>c</sup> abhängig vom Anteil der Keimzellen, die das mutierte X-Chromosom tragen

1. Neumutationen bei der HB treten bei ca. 80% der Fälle in der männlichen Keimbahn auf [Peake et al. 1993]. Dies bedeutet, dass in den meisten Fällen die Mutter eines Patienten bereits Konduktorin ist - zur Neumutation ist es in der Keimbahn des Großvaters mütterlicherseits gekommen. Durch die heutzutage in der westlichen Welt übliche kleine Nachkommenzahl kann die Mutation bei sporadischen Patienten aber auch seit mehreren Generationen „stumm“ über weibliche Vorfahren vererbt worden sein.
2. Die Mutation fand nach der Konzeption, während der embryonalen Entwicklung der Mutter statt, so dass sich zwei genetisch unterschiedliche Zelllinien aus einer Zygote entwickelten; die Mutter ist ein Mosaik. Das Risiko für weitere Kinder der Mutter ebenfalls Merkmalsträger zu sein, ist abhängig von dem Anteil der Keimzellen der Mutter, die das mutierte Gen tragen. Kam es in einem sehr frühen embryonalen Entwicklungsstand zur Mutation, dann ist der Großteil der somatischen und der Keimzellen betroffen. Das Wiederholungsrisiko kann dann dem bei einer wahren heterozygoten Mutter entsprechen.
3. Die Mutation ereignete sich in der Eizelle der Mutter, die zur Konzeption gelangte (im FIX-Gen des Patienten findet sich eine wahre de novo Mutation).

4. Die Mutation ereignete sich in einem frühen Embryonalstadium, so dass der Patient ein somatisches Mosaik ist. Hierbei beeinflusst der Anteil der nicht betroffenen Hepatozyten die Restmenge an gebildetem FIX, und der Anteil der betroffenen Keimzellen entscheidet über das Risiko für Töchter des Patienten, die Mutation zu erben.

Weibliche Hämophilie-Patienten sind relativ selten. Wollina [1996] berichtet in einer umfassenden Zusammenstellung von 19 Fällen, die durch unterschiedliche Mechanismen entstanden sind; häufig sind chromosomale Aberrationen zu beobachten, die ein X-Chromosom betreffen.

Bei einigen der bisher publizierten Fälle weiblicher HB konnte keine größere Chromosomen- oder Strukturgenaberration als Ursache festgestellt werden. Hier lässt sich die Merkmalsausprägung mit der Theorie der „ungleichen Lyonisierung“ erklären: Während der frühen Embryogenese kommt es zur Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen der Frau. Statistisch gesehen ist in jeweils der Hälfte der Zellen das mütterliche bzw. väterliche X-Chromosom aktiv. Erfolgt diese Inaktivierung nicht zufällig, und kommt es dadurch zu einer vornehmlichen Aktivität des X-Chromosoms, das ein defektes FIX-Gen trägt, so resultiert bei der Frau der hämophile Phänotyp. [Schröder et al. 1997; Lyon 1971].

### **1.1.3.2 Molekulargenetik**

Das FIX-Gen (HUGO Gen-Symbol:F9, OMIM-Nummer 306900) konnte im Jahre 1982 erstmals geklont und charakterisiert werden [Choo et al. 1982; Kurachi und Davie 1982]. Das Gen befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms in Bande Xq27. Es umfasst ca. 35 kb DNA und besteht aus 8 Exons und 7 Introns. Die 8 Exons kodieren eine 2,8 kb mRNA, die in ein Protein von 415 Aminosäuren translatiert wird. Der Aufbau des Proteins und die Nukleotidsequenz des Gens wurde 1984 und 1985 durch Anson et al. und Yoshitake et al. publiziert.

Weltweit wurden bei über 2511 Patienten Mutationen publiziert, von denen 896 unterschiedliche Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche betreffen [Green et al. 2003; <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>]. Diese große Heterogenität bedingt die variablen klinischen Erscheinungsbilder der Erkrankung (s. 1.1.4; S. 6).



### 1.1.3.3 Molekularbiologie

Das Vitamin-K-abhängige Glykoprotein FIX wird als inaktives Zymogen in den Hepatozyten gebildet. Das zirkulierende Proenzym wird im intrinsischen System der plasmatischen Blutgerinnung durch FXIa oder VIIa/TF (Gewebethromboplastin) zur Serinprotease FIXa aktiviert. Diese ist zusammen mit FVIIIa, Kalziumionen und Phospholipiden an der Proteolyse von FX zu FXa beteiligt, der u.a. die Thrombinbildung katalysiert, welches wiederum für die Fibrinbildung verantwortlich ist.

Das FIX-Protein hat sechs Domänen: Signal- und Propeptid (zusammen als Pre-Pro-Leader bezeichnet); Gla( $\gamma$ -carboxy-glutamic-acid)-Domäne, EGF(epidermal growth factor)-1 und 2-Domänen, Aktivierungspeptid und die für die proteolytische Funktion verantwortliche katalytische Domäne. [Kaufman 1999; Hiller und Riess 1998; Knobloch und Ludwig 1998].

### 1.1.4 Klinik

Kommt es durch eine Mutation im Bereich des FIX-Gens zur Bildung eines Proteins mit verminderter Aktivität, bzw. zu einem absoluten Mangel an FIX, resultiert eine verzögerte und unzureichende Fibrinbildung, die zur entsprechenden Blutungssymptomatik führt. Hierbei korrelieren die Symptome mit der Höhe der Restaktivität an FIX:C. [Hiller und Riess 1998].

Bei einer schweren Verlaufsform finden sich bereits in der frühen Kindheit Krankheitszeichen [Jones 1996; Oldenburg und Brackmann 1998]. Behandlungsbedürftige Blutungen im 1. Lebensjahr betreffen zu 80% die Extremitätengelenke [Eyster et al. 1980]. Schwer betroffene Hämophile bluten ohne prophylaktische Dauertherapie etwa 35-mal im Jahr [Jones 1996]. Ohne rasche und adäquate Behandlung entwickelt sich eine hämophile Arthropathie mit den Folgen einer zunehmenden körperlichen Behinderung.

Leichte Formen werden oft erst im Erwachsenenalter durch eine pathologische partielle Thromboplastinzeit diagnostiziert oder fallen durch eine verstärkte Blutungsneigung bei Operationen, Zahnextraktionen oder nach schwerem Trauma auf.

Die Diagnose erfolgt durch die Einzelfaktorbestimmung [Hiller und Riess 1998].

Bei Konduktorinnen kommt es selbst bei schwerer familiärer Hämophilie durchschnittlich zu FIX:C-Werten von 50%. Bei 1/3 der Konduktorinnen finden sich jedoch Werte unterhalb der normalen Schwankungsbreite [Jones 1996]. Eine Aktivität <40% kann zur klinischen Symptomatik führen [Peake et al. 1993]. Es findet sich eine gesteigerte Blutungsneigung bei zahnärztlichen und chirurgischen Eingriffen, bei Entbindungen und eine verstärkte Hämatombildung. Bei Werten <50% sollen mit der Hämostase interferierende Medikamente vermieden werden, und bei Werten <30% muss bei Operationen und Traumata eine Substitution erwogen werden. [Mauser-Bunschoten et al. 1988]

Die FIX:C-(„factor IX coagulant activity“) Restaktivität wird zur Klassifizierung der Erkrankung herangezogen [White et al. 2001].

- Schwere Hämophilie: <0,01 IU/ml (<1% des Normalwertes)
- Moderate Hämophilie: 0,01-0,05 IU/ml (1%-5% des Normalwertes)
- Leichte Hämophilie: >0,05-<0,4 IU/ml (>5%-40% des Normalwertes)

Hierbei hat eine gesunde Kontrollperson eine FIX:C-Aktivität von 1,0 IU/ml = 100% (normalisierender Effekt des Testplasmas auf die partielle Thromboplastinzeit eines Mangelplasmas, das <1% FIX:C aufweist) [Oldenburg und Brackmann 1998].

Bei dem Großteil der Patienten findet sich eine lebenslange Konstanz des Schweregrads, die intrafamiliär und interfamiliär bei gleicher Mutation nicht variiert. Bei bestimmten Mutationen der Promotorregion zeigt sich eine signifikante phänotypische Variabilität; hier finden sich im Kindesalter sehr geringe FIX:C-Werte, die mit Beginn der Pubertät sukzessive bis auf 50% der Norm steigen. Dieser Typ wird als HB „Leyden“ bezeichnet.

Ohne eine Therapie führen häufige Blutungsereignisse zu chronischen Behinderungen (meist durch Gelenkblutungen) und zu einer insgesamt verkürzten Lebenserwartung.

Die heute verwendeten Präparate sind humane und rekombinante FIX-Konzentrate sowie Prothrombinkomplex-Konzentrate; (diese enthalten außer FIX noch die Faktoren II, VII und X). Es werden zwei Behandlungsformen unterschieden: die prophylaktische Dauersubstitution und die

ereignisorientierte Bedarfsbehandlung [Bolton-Maggs und Pasi 2003; Oldenburg und Brackmann 1998].

Die Entwicklung von Hemmkörpern als Immunreaktion auf das zugeführte Fremdprotein stellt eine Komplikation der Therapie dar. Bei ca. 3% aller mit FIX-therapierten HB-Patienten treten spezifische Alloantikörper auf, die sich gegen FIX richten und dessen Bioaktivität bzw. seine Plasmahalbwertszeit vermindern [Bolton-Maggs und Pasi 2003, Grossmann und Mansouri-Teleghani 1999]. Als klinische Konsequenz der Hemmkörper führt die übliche Gabe von Blutgerinnungs-Konzentrat zu keinem relevanten FIX Anstieg. In vielen Fällen ist jedoch heute eine Therapie mit FVII möglich.

### **1.1.5 Humangenetische Betreuung**

Familien suchen humangenetischen Rat, wenn für sie die Sorge besteht, dass sie eine erbliche Krankheit an ihre Nachkommen vererben könnten. Die persönliche Bedeutung eines möglichen (HB-) Konduktorinnenstatus sind für eine Frau abhängig von vielen psychosozialen Faktoren, wie Ausmaß des Kontakts zu einem betroffenen Familienmitglied; Einfluss der Erkrankung auf das Leben anderer Familienmitglieder; Schweregrad der Hämophilie; Komplikationen wie körperliche Behinderung, Infektion oder Hemmkörper; vorhandene Behandlungsmöglichkeiten und der ethnisch/religiöse Hintergrund der Ratsuchenden [Kadir et al. 2000; Peake et al. 1993].

Das Ziel der humangenetischen Betreuung von Familien ist einerseits die nicht-direktive Vermittlung von Informationen, die den Betroffenen hilft, eine eigenverantwortliche Entscheidung bezüglich der Durchführung und Konsequenz einer Konduktorinnen- und pränatalen Diagnostik zu fällen. Andererseits soll den Ratsuchenden langfristig eine psychosoziale Unterstützung angeboten werden [Herrmann et al. 1997; Jones 1996, Miller 1999; Peake et al. 1993].

Die Konduktorinnendiagnostik soll möglichst vor einer Schwangerschaft erfolgen, so dass der betroffenen Frau und ihrem Partner genügend Zeit bleibt sich für bzw. gegen ein Kind zu entscheiden. Umfassende humangenetische Beratungen sollten jeweils vor einer Konzeption, vor einer pränatalen

Diagnostik und zur Übermittlung eines Resultats stattfinden [Herrmann et al.1994].

Die Familienplanung betreffende Entscheidungen sind abhängig von den erhaltenen Informationen bezüglich der Erkrankung, dem Konduktorinnenrisiko, den Methoden der Pränataldiagnostik, den Optionen nach Diagnose eines betroffenen Feten und von emotionellen Aspekten [Kadir et al. 2000, Miller 1999].

Die Voraussetzung für die humangenetische Beratung ist die Ermittlung des Konduktorinnenstatus von Frauen aus Risikofamilien.

Im folgenden Abschnitt soll der ungefähre Ablauf einer humangenetischen Beratung dargestellt werden, wie er in Vorbereitung einer molekulargenetischen Diagnostik ablaufen kann.

1. Zu Beginn einer humangenetischen Konsultation wird die in der Familie vorliegende Erkrankung verifiziert. Dann erfolgt eine Stammbaum-Analyse mit dem Ziel, einen Konduktorinnenstatus zu ermitteln. Außerdem werden die Vererbung der Hämophilie, die Klinik, Behandlung, Komplikationen und die Prognose in Übereinstimmung mit der in der jeweiligen Familie vorliegenden Ausprägung der Erkrankung erörtert.
2. Die Möglichkeiten der Konduktorinnendiagnostik werden dargestellt. Es wird auf die Untersuchungsmethoden, ihre Sicherheit und die Möglichkeit eines nicht-konklusiven Testergebnisses eingegangen. (s. 1.1.5.1)
3. Es erfolgt die Blutentnahme bei Ratsuchender, Patient und evtl. bei weiteren Familienmitgliedern.
4. Auf der Basis der genomischen Diagnostik wird ein humangenetisches Gutachten erstellt, welches die individuelle Entscheidungsfindung der Betroffenen unterstützen soll [Herrmann et al. 1997].

#### **1.1.5.1 Klinische und molekulargenetische Konduktorinnendiagnostik**

Bis zur Klonierung des FIX-Gens und der damit verbundenen Einführung der genomischen Diagnostik in den 80er Jahren, waren Stammbaum-Analyse und Blutgerinnungsdiagnostik die einzigen Möglichkeiten, das Konduktorinnenrisiko zu ermitteln.

Durch die alleinige Stammbaum-Analyse kann für mögliche Konduktorinnen ein Risiko zwischen 10 und 70% ermittelt werden [Lehesjoki et al 1990].

Da die Blutgerinnungsdiagnostik das Genprodukt misst und nicht das Gen selbst darstellt, beeinträchtigt jeder die Expression beeinflussende Faktor das Testresultat. Außerdem lässt sich der Genotyp bei Frauen oft nicht über den Phänotyp erfassen, da die HB eine X-chromosomale Erkrankung ist (s. 1.1.3, S. 2 und 1.1.4, S. 6). Die Hälfte der FIX:C-Werte bei Konduktorinnen überlappt nach Wilcox 1997 mit dem Normbereich. Aufgrund dieser geringen Aussagekraft mit relativ niedriger Sicherheit hat die Methode der klinischen Diagnostik in den Zeiten der genomischen Diagnostik kaum noch Bedeutung. Dort wo weder direkte noch indirekte Diagnostik zu einem Ergebnis führen oder in Fällen von sporadischer HB, in denen die indirekte Diagnostik nur eingeschränkte Aussagekraft hat, kann die klinische Konduktorinnendiagnostik allerdings hilfreich sein [Wilcox 1997].

Bei der indirekten genomischen Diagnostik wird die Weitergabe des mutierten Gens anhand von genetischen Markern analysiert. Solche Marker können z.B. RFLPs („restriction fragment length polymorphisms“) sein die sich innerhalb (intragen) oder eng an das FIX-Gen gekoppelt (intergen) befinden. Diese Polymorphismen sind v.a. im Intronbereich liegende Variationen der Nukleinsäuresequenz, die häufig keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins haben und sich deshalb im Laufe der Evolution in einer Population verbreiten konnten.

Bei informativen Markern lässt sich die Kopplung der Mutation mit einem der polymorphen Allele im Familienstammbaum verfolgen. Diese RFLP können durch Southern Blotting [Southern et al. 1975] und/oder durch die PCR-Methode [Saiki et al. 1988] dargestellt werden.

Um mit der indirekten molekulargenetischen Diagnostik zuverlässige Aussagen in Bezug auf den Konduktorinnenstatus oder eine pränatale Diagnostik (p.D.) machen zu können, müssen einige Voraussetzungen in den zu untersuchenden Familien erfüllt sein:

- Es muss sich um eine durch Blutgerinnungsdiagnostik klinisch gesicherte HB in der betreffenden Familie handeln.
- Je nach Familienkonstellation sollten zumindest Proben des Patienten und seiner Mutter analysiert werden; evtl. müssen weitere Familienmitglieder in die Untersuchung einbezogen werden.

- Die Paternität bei weiblichen Ratsuchenden muss gesichert sein.
- Die Marker müssen informativ sein, d.h. die mögliche Konduktorin sollte wenigstens für einen der untersuchten RFLP heterozygot sein, um Aussagen über die Kopplung des Markers mit der Mutation machen zu können.
- Der informative Marker sollte möglichst intragen gelegen sein, um eine hohe Aussagesicherheit erzielen zu können.

Bei sporadischen Fällen kann mit dieser Methode in der Konduktorinnen- und pränatalen Diagnostik nur eine sichere Aussage zum Ausschluss der HB gemacht werden.

Mit der direkten genomischen Diagnostik wird die zur HB führende Mutation auf molekularer Ebene nachgewiesen. Dieses ermöglicht sichere Aussagen in Bezug auf den Konduktorinnenstatus, eine Feststellung des Überträgerstatus auch in Familien mit sporadischen Fällen und die Herstellung eines Zusammenhangs zwischen Geno- und Phänotyp.

Möglichen Konduktorinnen, die sich gegen eine molekulargenetische Konduktorinnendiagnostik entscheiden, sollte eine FIX:C-Bestimmung angeraten werden, um bei klinisch niedrigen Werten potentiellen Blutungsereignissen vorbeugen zu können [Peake 1995] (s. 1.1.4, S. 6). Es wird empfohlen, bei Mädchen auf eine Konduktorinnendiagnostik zu verzichten, um diesen als Erwachsenen eine individuelle Entscheidung zu überlassen [Jones 1996].

### **1.1.5.2 Pränatale Diagnostik**

Die Ära der Pränataldiagnostik begann Anfang der 70er Jahre mit Einführung der fetalen Geschlechtsdiagnostik durch Amniozentese in der 15.-16. Schwangerschaftswoche. Bei dem Abbruch von Schwangerschaften mit männlichen Feten bei X-chromosomalen Erkrankungen kam es statistisch zum Verlust von 50% gesunden Jungen. Ende der 70er Jahre erlaubte die Einführung der fetalen Blutentnahme in der 18.-20. Schwangerschaftswoche die gerinnungsanalytische Diagnostik bei männlichen Feten (nach erfolgter Geschlechtsbestimmung durch Amniozentese). Die Sicherheit der Diagnose ist

---

mit ca. 99% hoch, allerdings kann die Methode erst spät in der Schwangerschaft an nur wenigen hochspezialisierten Zentren durchgeführt werden und ist mit einer relativ großen Gefährdung des Feten verbunden. Seit Mitte der 80er Jahre besteht die Möglichkeit, durch genomische Diagnostik nach Chorionzotten-Biopsie in der 10.-11. Woche oder nach Amniozentese um die 16. Woche, eine sichere Aussage in einem frühen Stadium der Schwangerschaft zu erhalten [Tedgard 1999b]. Das Risiko für spontane Aborte nach Amniozentese liegt zwischen 0,5-2% und nach transabdomineller Chorionzotten-Entnahme zwischen 2-6%. [Alfirevic et al. 2003, Endres 1994]. Der Vorteil der Diagnose im ersten Trimenon der Schwangerschaft ist eine geringere psychische Traumatisierung der Frau durch einen frühen Abbruch und dessen einfachere Durchführung.

## **1.2 Ziel der Arbeit**

### **1.2.1 Stand bis zum Beginn der eigenen Arbeit**

Im Jahr 1988 wurde die genomische Diagnostik für Risikofamilien mit HB am Institut für Humangenetik der Universität Greifswald (IHG) eingeführt. Zunächst konnte die indirekte Segregationsanalyse auf Southern Blotting-Basis mit einigen wenigen Markern angeboten werden. Mit dieser Methode war nur für einen Teil der Ratsuchenden eine Aussage zum Konduktorinnenstatus bzw. ein Angebot zur pränatalen Diagnostik möglich. Mit der Entdeckung weiterer Marker und der Einführung der Sequenzanalyse konnte im Laufe der Jahre mehr Frauen ein Angebot zur Konduktorinnendiagnostik und zu einer p.D. gemacht werden.

Größere Deletionen oder Insertionen können ab einer Länge von wenigstens 500bp in der DNA der Patienten durch Southern Blotting und Hybridisierung mit einer FIX-cDNA-Sonde nachgewiesen werden.

Die direkte Diagnostik durch Sequenzanalyse erfolgt nach Heteroduplexscreening gezielt in den entsprechenden Exons.

In den 90er Jahren erfolgte die indirekte genomische Diagnostik am IHG routinemäßig mit den intragenen Markern TaqI, DdeI und XmnI sowie mit dem intergenen eng gekoppelten HhaI-Polymorphismus durch die PCR-Methode. Bei Bedarf wurden weitere intra- und intergene Marker untersucht (MnII, Alu-Taq, SacI, MspI, MseI) [Peake 1992]. Zusätzlich wurde seit 1992 bei Familienuntersuchungen meist die direkte Diagnostik angewendet. Die indirekte Diagnostik wurde im Laufe der letzten Jahre doch zunehmend zugunsten der Sequenzanalyse eingeschränkt. Heutzutage wird für die Familiendiagnostik der HB im Prinzip ausschließlich die direkte Diagnostik angewendet.



Zu Beginn der vorliegenden Arbeit im April 1995 waren die Daten von 35 Familien (darunter 59 mögliche Konduktorinnen), 49 Einzelpatienten und 8 möglichen Konduktorinnen, in deren Familie kein Patient für eine Untersuchung zur Verfügung stand, im humangenetischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald erfasst. Insgesamt handelte es sich hierbei um 245 Personen (s. Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Stand der molekulargenetischen Diagnostik zu Beginn der vorliegenden Arbeit (April 1995)

Anzahl	Bis April 1995 erfasst	Abgeschlossene Diagnostik	
		indirekt	direkt
Personen gesamt	245	43	95
Familien	35	9	25
Einzelpatienten	49	1	44
Einzelfrauen <sup>a</sup>	8	5	7
mögliche Konduktorinnen	59	23	25
Angebot einer p.D. <sup>b</sup>	53	16	22

<sup>a</sup> Mögliche Konduktorin, bei der in der Familie kein Patient für eine Untersuchung zur Verfügung stand

<sup>b</sup> Berücksichtigung von Konduktorinnen, die < 40 Jahre

43 Personen waren zu Beginn der Arbeit bereits mittels indirekter genomischer Diagnostik vollständig (d.h. RFLP aller vier Marker DdeI, XmnI, TaqI und HhaI) untersucht worden.

Eine direkte genomische Diagnostik (Heteroduplexanalyse und/oder Sequenzierung der Exons 1-8) war bei 95 Personen durchgeführt worden.

### 1.2.2 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war eine Auswertung der am IHG durchgeführten direkten und indirekten genomischen Diagnostik bei Hämophilie B im Untersuchungszeitraum von 1988 bis September 1999.

Die Ergebnisse und die Aussagesicherheit der direkten und indirekten genomischen Diagnostik in der Konduktorinnen- und pränatalen Diagnostik sollten verglichen sowie Vor- und Nachteile beider Methoden analysiert werden.

Es sollte herausgearbeitet werden, ob neben der seit 1992 etablierten Sequenzanalyse die indirekte genomische Diagnostik noch von Bedeutung ist.

Alle aus den vorhandenen Akten ausgewerteten Patienten- und Familiendaten, sowie die neu ermittelten Ergebnisse der direkten und indirekten genomischen Diagnostik, sollten in einer institutsinternen Datenbank erfasst werden.

Eine Voraussetzung für die Auswertung der Daten der indirekten und direkten genomischen Diagnostik war die Komplettierung der im Rahmen der Routinediagnostik bis September 1999 am IHG noch nicht charakterisierten intragenen Marker XmnI, DdeI, TaqI und des intergenen Markers HhaI für Personen aus HB-Risikofamilien. Der SacI-RFLP sollte nicht komplettiert werden, dort wo charakterisiert, aber in die Auswertung einbezogen werden. Außerdem sollte die bis September 1999 erfolgte direkte Diagnostik durch Heteroduplexanalyse und/oder Sequenzanalyse erfasst und für alle noch nicht untersuchten möglichen Konduktorinnen vervollständigt werden, in deren Familien eine Mutation bei dem Indexpatienten nachgewiesen worden war.

Auf Basis dieser Daten sollten dann folgende Punkte untersucht werden:

- Die Allelfrequenzen in der (v.a. nordost-) deutschen Population sollten erfasst und die Haplotypen sowie deren Frequenz ermittelt werden.
- Die Heterozygotenfrequenzen sollten ermittelt und mit Literaturdaten verglichen werden. Damit sollte die Informativität von einzelnen Markern und von Kombinationen verschiedener Marker in der indirekten Diagnostik dargestellt werden.
- Die Aussagesicherheit der indirekten genomischen Diagnostik sollte durch die Ermittlung von crossing over-Ereignissen sowie den Vergleich mit den Ergebnissen der direkten Diagnostik bestimmt werden.
- Für die direkte genomische Diagnostik war durch den Vergleich der Ergebnisse der Heteroduplexanalyse mit den Resultaten der Sequenzanalyse der Grad der Übereinstimmung zu ermitteln. Es sollte analysiert werden, ob bei bekannter Mutation die alleinige Charakterisierung eines Heteroduplex ausreichend für die Konduktorinnendiagnostik ist.

- 
- In Familien mit sporadischen Fällen sollte der Versuch einer Ermittlung des Ursprungs der Mutation gemacht werden sowie bei mehrfach auftretenden Mutationen sollte die Haplotypenanalyse zum Nachweis unabhängiger Mutationen eingesetzt werden.
  - Die im Untersuchungszeitraum erfolgte direkte Diagnostik sollte dargestellt, in Zusammenhang mit den weltweit publizierten Mutationen im FIX-Gen gesetzt werden und auf Art und Ort der Mutationen hin untersucht werden, mit Ermittlung eventuell vorhandener Mutations- „hotspots“.
  - Der Einsatz der Sequenzanalyse zur Ermittlung des Konduktorinnenstatus bei Frauen mit Verdacht auf Überträgerstatus für HB ohne einen bekannten Patienten in der Familie sollte ausgewertet werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientendaten und Probenmaterial**

Die Überweisung der Patienten erfolgte durch Hämophilie-Zentren, humangenetische Beratungsstellen, Kliniken und niedergelassene Ärzte aus der gesamten Bundesrepublik. Zur genomischen Diagnostik wurden Blutproben, bereits extrahierte Lymphozyten- oder Fibroblasten-DNA, Fibroblasten, Amnionflüssigkeit oder Chorionzotten-Biopsien übersandt.

Alle Angaben zu klinischen Daten und Behandlung der Patienten stammen aus den Unterlagen des überweisenden Arztes.

Ausgewertet wurden die Daten von Patienten mit HB und, soweit vorhanden, ihrer Familienangehörigen. Zusätzlich wurden mögliche Konduktorinnen einbezogen, in deren Familien kein Patient untersucht werden konnte. Genealogische und gerinnungsphysiologische Daten und Angaben zu bereits erfolgter molekulargenetischer Diagnostik waren im IHG archiviert. War eine Komplettierung der molekulargenetischen Diagnostik nötig, wurden DNA-Proben, soweit im IHG vorhanden, zur Untersuchung herangezogen.

### **2.2 Methoden der DNA-Analyse**

#### **2.2.1 Extraktion der DNA**

Genomische DNA wurde gewonnen aus a) weißen Blutzellen in 5-10 ml Zitratblut oder EDTA-Blut durch die Aussalzmethode [Miller et al. 1988] oder b) für die pränatale Diagnostik aus  $2 \times 10^6$  kultivierten Amnionzellen bzw. 10-30 mg Chorionmaterial durch phenolische Extraktion [Wehnert et al. 1988a; Wehnert et al. 1988b].

#### **2.2.2 Southern Blotting**

Der RFLP-Nachweis durch Southern Blotting erfolgte nach Spaltung mit einem Restriktionsenzym und nachfolgender Hybridisierung mit der

entsprechenden Sonde [Maniatis et al. 1982]. Für die Untersuchung des extragenen SacI-Polymorphismus (Abb. 2.1, S. 19) [Mulligan et al. 1987] (Lokalisation: DXS99/Xq26.3-27.1) wurde die Sonde px58dIIIc verwendet. Die erwarteten Fragmente haben eine Länge von 8,8kb (Allel 1) bzw. 6,5kb (Allel 2).

Lag der Verdacht vor, dass in der DNA des Patienten eine Deletion vorlag, wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI, SacI und/oder TaqI (*Boehringer, Deutschland*) verdaut, auf einem 0,8%igen Agarose-Gel aufgetrennt, auf Hybond C-Nitrocellulosefilter (*Amersham, UK*) transferiert und mit einer FIX cDNA-Sonde hybridisiert. Die Sonden wurden durch ein Random Priming mit ( $\alpha^{32}\text{P}$ )d CTP (*Amersham, UK*) markiert.

Das Southern Blotting wurde im IHG durchgeführt und die Ergebnisse wurden übernommen.

### 2.2.3 PCR-Methode

Die Methodik der PCR zur indirekten Diagnostik bei HB, adaptiert von der Beschreibung durch [Kogan et al. 1987; Bowen et al. 1991], sah für alle untersuchten Polymorphismen folgendermaßen aus:

für 50 $\mu\text{l}$ PCR-Ansatz: 0,5 $\mu\text{g}$ genomische DNA 25 pmol je Primer 200 $\mu\text{M}$ je dNTP ( <i>GIBCO-BRL</i> ) 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ 1U Taq DNA Polymerase ( <i>GIBCO-BRL</i> ).
--

Abb. 2.1 veranschaulicht die Lokalisation der polymorphen Restriktionsorte im Bereich des FIX-Gens, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Bei DdeI, XmnI und TaqI handelt es sich um intragene Marker, bei HhaI und SacI um eng an das Gen gekoppelte Marker.

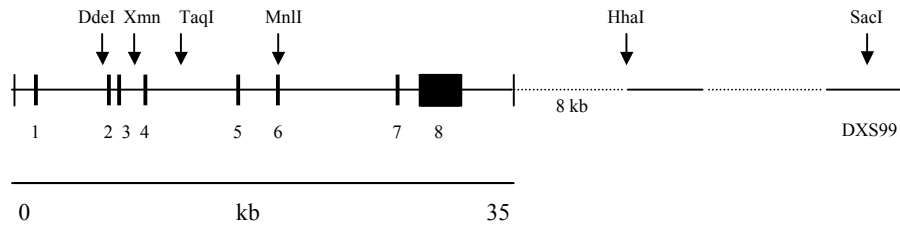


Abb. 2.1: Darstellung der Lokalisierung der RFLP. Das FIX-Gen ist als horizontale durchgehende Linie dargestellt, die gestrichelten Bereiche liegen außerhalb des Gens. Die Exons (vertikale Balken) sind mit arabischen Ziffern (1-8) dargestellt, die Lage der polymorphen Schnittstellen der Restriktionsenzyme ist durch Pfeile gekennzeichnet [Abbildung nach Peake et al. 1993]

Die Sequenz der Primer und die unterschiedliche Reaktionsbedingungen bei Verwendung des Thermocyclers *PTC 100* (MJ Research, Inc.) sind in Tabelle 2.1 dargestellt.