

**NACHWEIS NEUTRALER UND QUANTITATIVER VARIANTEN
DES HÄMOGLOBINS MIT HILFE DER HYBRID-
ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Bettina Görges
aus Bad Salzufen

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie
und Humangenetik

Institut für Humangenetik

des Universitätsklinikums Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Gutachter: Prof. Dr. Pralle

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Katz

Tag der Disputation: 12.08.2003

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Bodensiek, B., Becher, P., Rossmann, U., Altland, K.:

Screening by hybrid isoelectric focusing for quantitative variation in the expression of human fetal globin genes.

In Radola, B. J. (Ed.): Electrophoresis forum '89: 350-355 (1989)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Mutationen	7
1.2 Human Monitoring	9
1.3 Techniken zum Nachweis von Punktmutationen.....	11
1.3.1 <i>Trennung nach Ladung: Hybrid-isoelektrische Fokussierung.....</i>	<i>12</i>
1.3.1.1 Triton X-100-Säure-Harnstoff-Elektrophorese-System	14
1.3.2 <i>Trennung nach Verteilungskoeffizienten: Umkehrphasen- Hochleistungs-Flüssigchromatographie.....</i>	<i>14</i>
1.3.3 <i>Trennung nach Konformation: Ferguson-Plot</i>	<i>16</i>
1.3.4 <i>Proteomics</i>	<i>17</i>
1.4 Humanes Genomprojekt.....	18
1.5 Hämoglobin.....	19
1.5.1 <i>Struktur des Hämoglobin</i>	<i>19</i>
1.5.2 <i>Hämoglobingene</i>	<i>22</i>
1.5.3 <i>Ontogenese der Hämoglobinbildung</i>	<i>25</i>
1.5.4 <i>Umschaltung von fetalem zu adultem Hämoglobin.....</i>	<i>26</i>
1.6 Thalassämie	27
1.6.1 <i>α-Thalassämie</i>	<i>28</i>
1.6.2 <i>β-Thalassämie.....</i>	<i>29</i>
1.6.3 <i>γ-Thalassämie</i>	<i>31</i>

1.6.4 Komplexe β -Thalassämie.....	31
1.6.5 Häufigkeit der Thalassämien	32
1.7 Hereditäre Persistenz von fetalem Hämoglobin	33
1.8 Aufgabenstellung	35
2. Material und Methoden	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Geräte.....	36
2.1.2 Chemikalien.....	38
2.1.3 Proben.....	38
2.2 Methoden	39
2.2.1 Probenvorbereitung.....	39
2.2.2 Horizontale Hybrid-isoelektrische Fokussierung	40
2.2.2.1 Herstellung der Gele mit immobilisierten pH-Gradienten.....	40
2.2.2.2 Durchführung der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung	43
2.2.3 Fixieren, Färben, Trocknen.....	46
2.2.4 Auswertung und Dokumentation des Hämoglobin-Screenings.....	46
3. Ergebnisse	48
3.1 Qualitative Auswertung.....	48
3.1.1. Definition qualitative Varianten	48
3.1.2. Zuordnung der potentiellen Varianten	49
3.1.3 Darstellung des A_{γ} -Polymorphismus.....	54
3.1.4. Bestimmung der Allelfrequenzen des A_{γ} -Polymorphismus	54

3.2 Quantitative Auswertung	55
3.2.1 Definition quantitativer Varianten.....	55
3.2.2 Darstellung quantitativer Varianten.....	56
3.2.3 Auswertung des G_{γ} - zu Gesamt- γ -Verhältnisses.....	59
3.2.4 Auswertung des $A_{\gamma}T$ - zu Gesamt- A_{γ} -Verhältnisses	63
3.2.5 Reproduzierbarkeit der densitometrischen Auswertung	66
4. Diskussion.....	67
4.1 Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur Identifizierung qualitativer und quantitativer Varianten	67
4.2 Vergleich elektrophoretischer Screeningmethoden für Hämoglobin	70
4.3 Bedeutung der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung für den Nachweis neutraler Aminosäure-Substitutionen in Hämoglobinen	73
4.4 Sensitivität der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung zum Nachweis quantitativer Veränderungen der γ -Globine.....	75
4.4.1 γ -Polymorphismus.....	75
4.4.2 A_{γ} -Polymorphismus	77
5. Zusammenfassung	79
6. Abkürzungen	82
7. Literaturverzeichnis.....	84
8. Danksagung.....	111
9. Lebenslauf.....	112

1. Einleitung

1.1 Mutationen

Nachdem die Struktur und die molekulare Zusammensetzung der DNA aufgeklärt (Watson und Crick 1953; Crick u. a. 1961), das "Gen" als Sequenz von Nucleotiden identifiziert und die Art der Replikation genetischen Materials nachgewiesen war, konnten schließlich auch Veränderungen auf der molekularen Ebene, Mutationen genannt, aufgezeigt werden.

Die genetische Information der DNA wird durch eine spezifische Basenfolge codiert. Dieser Code liefert alle Informationen für die Übersetzung einer Basenfolge in artspezifische Proteine. Je drei Nucleotide ("Triplett") codieren eine Aminosäure.

Nach traditionellem Schema unterscheidet man Genom- und Chromosomen-Mutationen von sogenannten intragenetischen Gen- oder Punktmutationen:

- Unter *Genom-Mutation* versteht man eine Veränderung der Chromosomenzahl entweder eines ganzen Satzes (Polyploidie) oder eines Paares (Aneuploidie).
- *Chromosomen-Mutationen* sind Veränderungen der Form und Struktur von Chromosomen bei konstanter Chromosomenzahl. Man unterscheidet in Translokation, Deletion, Insertion und Inversion, dazu gehören auch die Punktmutationen.

Der Begriff Punktmutation wird ausschließlich im streng definierten Sinne, dem Austausch einer DNA-Base (Substitution) verwendet, die jedoch unterschiedliche Konsequenzen hat. Zu den Punktmutationen gehören Missense-, Nonsense-, Spleißstellen- und Frameshift-Mutationen.

Die Deletion eines Basentriplets oder die Substitution einer Base in einem Triplet und damit der kodierte Aminosäure können das Molekulargewicht, die Ladung oder den isoelektrischen Punkt des exprimierten Proteins verändern.

Die Substitution einer anders geladenen Aminosäure führt zu einer Ladungsänderung des resultierenden Polypeptids, die resultierenden Proteine werden als "Ladungsvarianten" bezeichnet und von elektrisch neutralen oder "stillen" Varianten unterschieden.

Bei der elektrisch neutralen Aminosäure-Substitution kommt es zu keiner Ladungsveränderung, da eine Veränderung in der Basenabfolge zu einem Aminosäureaustausch innerhalb der gleichen Ladungsgruppe führt. Es resultieren Austausche unter den basischen Aminosäureresten Lysin, Arginin und Histidin oder unter den sauren Resten wie Glutamin- und Asparaginsäure.

Der elektrophoretische Nachweis der "stillen" Varianten infolge eines neutralen Aminosäureaustausches erwies sich in der Vergangenheit als schwierig. Bisher wurden diese in nativen Proteinen infolge einhergehender Veränderungen der Konformation und damit der elektrophoretischen Beweglichkeit nur selten entdeckt. Heute stellt dies, auf Grund der seit den 70er Jahren fortschreitenden Entwicklung der Untersuchungstechniken bis zur DNA-Sequenzierung, kein Problem mehr da.

1.2 Human Monitoring

Neben ihrem spontanen Auftreten können Mutationen auch induziert werden. H. J. Muller wies 1927 auf den mutagenen Einfluß ionisierender Strahlen hin. Inzwischen wurde die Mutagenität von radioaktiven Strahlen und vielen chemischen Substanzen bei Bakterien oder in Tierversuchen demonstriert, ebenso der kausale Zusammenhang zwischen Mutagenität und Kanzerogenität (Vogel u. Motulsky 1986).

Angesichts der Exposition gegenüber medizinisch, industriell und militärisch zusehends intensiver genutzter energiereicher Strahlen sowie der Verbreitung einer stetig ansteigenden Zahl möglicherweise mutagener chemischer Substanzen, besteht ein erhebliches Interesse der Öffentlichkeit an dem genetischen und damit gesundheitlichen Risiko.

Tiermodelle, insbesondere das der Maus, waren wichtig, um das mögliche Risiko gegebener Einflüsse zu kalkulieren. Die Ergebnisse solcher Tierexperimente sind jedoch nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Es wurden Lösungen dafür gesucht, Mutationen beim Menschen direkt zu erfassen. Dieser Forschungsansatz wurde mit dem Terminus "Human Mutation Monitoring" beschrieben (Crow 1968, 1971; Neel u. a. 1973, 1974).

Anfangs wurden Mutationsraten beim Menschen anhand von Syndromen infolge dominanter Mutationen (Vogel u. Motulsky 1986) studiert, beispielsweise die Achondroplasie und die Aniridie (Vogel 1975). Solche dominanten Mutationen treten zu selten auf, um statistisch verwertbare Daten zu liefern.

Bei bekannter Aminosäuresequenz eines Proteins läßt sich die Zahl der Basenpaar- und Aminosäuresubstitutionen, die mit einem Ladungswechsel verbunden sind, berechnen. Danach sollte in den Genen des Hämoglobins und vieler anderer komplexer Proteine ein Drittel aller Basenpaaraustausche durch elektrophoretische Analyse des jeweiligen Genproduktes nachweisbar sein (Neel u. a. 1973). Problematisch war der elektrophoretische Nachweis der häufiger zu erwartenden "stillen" Varianten infolge eines elektrisch neutralen Aminosäureaustausches.

Eine elektrophoretisch nachweisbare Neumutation ist ein sehr seltenes Ereignis. Folgende Zahlen aus eindimensional-elektrophoretischen Mutationsscreenings verdeutlichen diese Tatsache, so fanden Harris und Mitarbeiter (1974) in 43 untersuchten Enzym-Loci bei 133.478 Tests keine Neumutation. Neel u. a. (1980) fanden unter 200.445 Locus-Tests ebenfalls keine Neumutation. Altland und Mitarbeiter (1982) entdeckten unter 135.000 auswertbaren Tests der α - und β -Ketten des Hämoglobins eine einzige Neumutation.

Mit der zweidimensionalen Elektrophorese (Klose 1975; O'Farrell 1975) kann eine Vielzahl von Loci pro Individuum getestet werden. Gegenüber der herkömmlichen eindimensionalen Technik (Neel u. a. 1983, 1984) konnte die Zahl der notwendigen Experimente auf diese Weise eingeschränkt und die Effizienz deutlich erhöht werden.

In den letzten Jahren wurden verschiedenste Methoden, wie z.B. die Denaturing-Gradient-Gel-Elektrophorese (DGGE), die Heteroduplex (HD)-Analyse und die Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse, zum Nachweis von Punktmutationen entwickelt. Einige haben zur Entwicklung eines Mutationsscreeningprotokolls geführt, das auf einer Kombination von SSCP- und HD-Analytik basiert und das Erfassen von mehr als 97% aller in den untersuchten Sequenzen eines Gens vorkommenden Punktmutationen, Mini-

deletionen und -insertionen unabhängig von Ort, Art oder Häufigkeit der Mutation ermöglicht (Liechti-Gallati u. a. 1999).

Als Ergebnis zahlreicher aktueller Mutations-Untersuchungen an Zellkulturen und bei Bakterien gilt, daß ohne Einwirkung von außen, ein gegebener Gen-Bereich einmal unter 10^9 - 10^{10} Zellen pro Generation durch eine Mutation verändert wird. Es hat sich gezeigt, daß die spontanen Mutationsraten bei Bakterien und Eukaryonten übereinstimmen.

1.3 Techniken zum Nachweis von Punktmutationen

Viele der obengenannten Mutationsscreening-Untersuchungen erfordern einen erheblichen materiellen und personellen Aufwand, da frische Serumproben organisiert und dokumentiert werden müssen. Es sind jedoch auch andere Methoden der Probenbeschaffung möglich, die ebenfalls eine problemlose Durchführung des Nachweises von Punktmutationen erlauben.

Das Ziel der Beschaffung einer großen Anzahl verfügbarer Proben bei gleichzeitiger Notwendigkeit, den finanziellen und technischen Aufwand der Probenbeschaffung zu begrenzen, legte die Entnahme von Trockenblutproben aus Guthrie-Testkarten nahe. Wie in den meisten Industrienationen wird jedem Neugeborenen in der Bundesrepublik Deutschland am fünften Lebenstag eine Blutprobe entnommen, die auf einer Testkarte getrocknet und in zentralen Landesuntersuchungsstellen auf die angeborenen Stoffwechselerkrankungen Phenylketonurie (PKU), Galaktosämie und Hypothyreose, erweitert durch Adrenogenitales-Syndrom (AGS) und Biotinidasemangel, untersucht wird (Guthrie u. Susie 1963).

Altland und Mitarbeiter (1982) stellten aus diesen getrockneten Blutproben die α - und β -Globinketten des Hämoglobins elektrophoretisch für ein Mutationsscreening dar. Die Durchführbarkeit notwendiger Kontrollen der Eltern eines Variantenträgers sind durch die im PKU-Screening erhobenen Daten gewährleistet. Ein Mutationsscreening mit Hilfe der Trockenblutproben des Neugeborenen-Screenings fügt sich in eine schon vorhandene Logistik ein und ermöglicht auf diese Weise eine kontinuierliche Analyse der aktuellen Mutationsrate (Vogel u. Altland 1982).

1.3.1 Trennung nach Ladung: Hybrid-isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) führt bei amphoteren Molekülen in einem pH-Gradienten schnell und mit hoher Auflösung zu einer Trennung der Moleküle nach ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI).

Der für diese Technik benötigte stabile und lineare pH-Gradient des Gels baut sich aus einem Gemisch puffernder Trägerampholyte in einem elektrischen Gleichstromfeld auf. Die Trägerampholyte, von Svenson (1961) theoretisch erarbeitet, wurden von Vesterberg (1969) synthetisiert.

IEF wurde von vielen Arbeitsgruppen für die Darstellung des Hämoglobins verwendet (Koepke u. a. 1975; Altland 1977; Righetti u. a. 1979; Altland u. Hackler 1979), aber auch für Screeningprogramme zur Suche von Hämoglobinvarianten eingesetzt (Jeppson u. Berglund 1972; Monte u. a. 1976; Basset u. a. 1978).

Der relativ einfachen Handhabung der IEF stehen Grenzen der Auflösung gegenüber. Je enger die pH-Bereiche gewählt werden, desto längere Fokussierungszeiten sind notwendig. Dieses führt zum Kathodendrift ("Plateau-Phänomene") (Finlayson u. Chrambach 1971; Righetti u. Drysdale 1971; Fawcett 1975; Rilbe 1977). Beim Kathodendrift handelt es sich um eine langsame, kontinuierliche Verschiebung und Verformung des pH-Gradienten, mit Verschlechterung der Auflösung und der Reproduzierbarkeit. Hohe Probenbeladungen und hohe Salzkonzentrationen verändern den pH-Gradienten und verzerren die Proteinzonen (Jonsson 1980).

Diese Problemstellung führte zu der Entwicklung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG: Bjellquist u. a. 1982), in dem die puffernden Gruppen bereits in die Gelmatrix einpolymerisiert sind. Das Ergebnis ist ein gegenüber Strom und Salzen sehr stabiler pH-Gradient, der erhebliche Abflachungen des pH-Gradienten erlaubt und damit die angestrebte Darstellung sehr kleiner Differenzen in der pI-Position von Proteinen ermöglicht. Zur Bildung dieser pH-Gradienten werden monomere Acrylderivate ("Immobiline") mit gebundenen schwachen Basen bzw. Säuren verwendet.

Durch Rehydratieren der immobilisierten pH-Gradienten mit Rehydratationslösung (Harnstoff, Triton, DTT ad aqua) unter Zusatz von Trägerampholyten lassen sich die Nachteile der Elektrofokussierung im immobilisierten pH-Gradienten, wie etwa lange Laufzeiten oder Verlust von Probenmaterial, überwinden. Diese aus der Verknüpfung der Vorteile beider IEF-Methoden entstandene Technik nennt sich "Hybrid-isoelektrische-Fokussierung" (HIEF) (Altland u. Rossmann 1985a; Fawcett u. Chrambach 1985; Rimpilainen u. Righetti 1985).

1.3.1.1 Triton X-100-Säure-Harnstoff-Elektrophorese-System

Die Trennung im Triton-Säure-Harnstoff-Gel-System basiert auf differenzierter Herabsetzung der elektrophoretischen Mobilität verschiedener Polypeptide, die sich aus der Bildung gemischter Mizellen zwischen Detergenz und hydrophoben Regionen der Proteinmoleküle ergibt (Franklin u. Zweidler 1977). Zugabe von β -Mercaptoethanol oder DTT schützt vor Oxydation, die wiederum die hydrophoben Eigenschaften beeinflusst und zu artefakten Mustern führt.

Righetti u. a. (1979) gelang mit dem Detergenz Nonidet-40 (NP-40), das mit Triton X-100 vergleichbar ist, γ -Globin in G_γ und A_γ aufzutrennen. Dieses wurde als "Nonidet-Effekt" beschrieben. Der stattgefundenene neutrale Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin allein verändert unter denaturierenden Bedingungen nicht den pI, so daß man eine Konformationsänderung als Ursache vermutete.

1.3.2 Trennung nach Verteilungskoeffizienten: Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Unter Chromatographie versteht man den Stofftransport durch ein für den Stoffaustausch selektives Zweiphasensystem, bewirkt durch Relativitätsbewegung der beiden Phasen. Eine Phase ist stets kompakt, die andere fließend. Für die Flüssigchromatographie ist Bedingung, daß sich die Probe in irgendeinem Lösungsmittel löst.

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)-Trennungstechniken unterteilen sich in mehrere Untergruppen. Hier soll nur auf die Chromatographie mit Phasenumkehr (Reversed-Phase) näher eingegangen werden, bei der die chromatographischen Vorgänge auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.

Im Gegensatz zum klassischen Prinzip der Adsorptionschromatographie, deren stationäre Phase ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche (z. B. Kieselgel, Aluminiumoxid) und deren mobile Phase relativ apolar (z.B. Penten bis hin zu Tetrahydrofuran) ist, gilt für die RHPLC das Umgekehrte: das Trägermaterial ist sehr apolar und die mobile Phase ist relativ polar. Die am häufigsten verwendete stationäre Phase ist chemisch gebundenes Octadecylsilan. Als mobile Phase verwendet man meist Gemische von Wasser oder wässrigen Pufferlösungen. Es wird vermutet, daß sich gegenwärtig allein durch RHPLC mehr als 2/3 aller wichtigen Trennungsprobleme der Flüssigkeitschromatographie bearbeiten lassen.

Von Griffoni u. a. (1975) wurde ein Polymorphismus des A_γ-Globins mit zwei Varianten unter Neugeborenen auf Sardinien beschrieben. Die Variante unterscheidet sich durch den Austausch von Isoleucin zu Threonin, einem neutralen Aminosäureaustausch an Position 75 (Griffoni u. a. 1975; Ricco u. a. 1976). Man bezeichnete diese Varianten als A_γI und A_γT.

Hämoglobinvarianten sind intensiv mit HPLC-Methoden untersucht worden. Huisman u. a. (1981a) modifizierten die RHPLC-Methode von Shelton u. a. (1979) und erreichten eine vollständige Trennung und Quantifizierung von A_γT, A_γI und G_γ.

1.3.3 Trennung nach Konformation: Ferguson-Plot

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine bei der Auftrennung ist einerseits von der Stärke des elektrischen Feldes und andererseits von der Porengröße des Trägermaterials abhängig. Die Porengröße läßt sich in einem Polyacrylamidgel in bestimmten Grenzen frei festlegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Partikels in einem Gel steigt bei sinkender Gelkonzentration exponentiell an. Ausgehend von diesem Modell entwickelte Ferguson (1964) einen anwendungsbezogenen Plot. Die Proben werden dazu unter identischen Puffer-, Zeit- und Temperaturbedingungen bei unterschiedlichen Gelkonzentrationen aufgetragen. Es ergeben sich in den verschiedenen Gelen unterschiedliche Laufstrecken, aus denen sich die relative Mobilität (R_f) errechnen läßt. Die errechneten R_f -Werte für ein Molekül werden in ein Koordinatensystem gegen die verwendete Gelkonzentration aufgetragen.

Eine von Ferguson (1964) durchgeführte Transformation in ein halblogarithmisches Raster erbrachte eine lineare Beziehung zwischen $\log R_f$ und der Gelkonzentration. Die Steigung der Geraden ist ein Maß für die Molekülgröße. Weiterführende mathematische und statistische Datenanalysen durch Rodbard u. Chrambach (1970, 1971, 1974) haben es ermöglicht, durch die Parameter des Ferguson-Plots detailliertere quantitative Informationen zu erhalten.

Hahn (1987) entwickelte die Methode zu einem standardisierten Verfahren zum Nachweis neuer, durch Mutagene induzierter Enzymvarianten mit *Drosophila melanogaster* als Testorganismus. Dieser Test erwies sich als geeignet und sensibel zum Nachweis von Punktmutationen. Aufgrund eines hohen Auswertungsaufwandes ist er eher für gezielte Untersuchungen als für die Routine zu empfehlen.

1.3.4. Proteomics

Während man früher von Protein-Analytik sprach, hat sich heute der Begriff Proteomics für die systematische Identifizierung und funktionelle Charakterisierung sämtlicher Proteine einer Zelle oder eines Organismus durchgesetzt (Wilkins u. a. 1996). Proteomics stellt eine Querschnittstechnologie dar, die unterschiedliche Disziplinen wie Molekularbiologie, Proteinchemie, Bildverarbeitung, Robotik, Informatik und Massenspektroskopie vereint. Analog zum Genom bezeichnet dabei der Begriff Proteom die Gesamtheit aller im Laufe des Lebens einer Zelle exprimierten und modifizierten Proteine (Wasinger u. a. 1995).

Experimentell besteht Proteomics aus zwei Schritten. Aufbauend auf der Schlüsseltechnologie zur Auftrennung komplexer Proteingemische, der zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese (Trennung nach Ladung) (Klose 1975; O'Farrell 1975) werden durch angeschlossene SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Trennung nach Molekulargewicht) die einzelnen Proteine identifiziert. Auf den besten 2D-Gelen können mehr als 10000 Proteine voneinander getrennt werden. Die Proteincharakterisierung erfolgt zunehmend mittels Massenspektrometrie (Henzel u. a. 1993). Durch die Kombination beider Techniken lassen sich mehrere tausend Proteine am Tag prozessieren und analysieren (Jensen u. a. 1997). Die Bewältigung der für die 2D-Gelelektrophoresetechnik notwendigen Muster- und Bilderkennung, die massenspektroskopische Analytik sowie Datenverwaltung ist nur durch Bioinformatik möglich.

Die Mehrzahl der Proteine werden nach der Translation noch verändert. Diese Veränderung kann aufgrund der Genstruktur nur bedingt vorausgesagt werden. Das zahlenmäßige Verhältnis von mRNA zu den exprimierten Proteinen ist nicht 1:1, sondern eher 1:3. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, zusätzlich zur Untersuchung des Genoms die Vielfalt der Proteine mittels Proteomics zu studieren, um die Verknüpfung genomischer Daten mit ihrer Funktion in der

Zelle herzustellen. Die Identifikation der in der Zelle vorhandenen Proteine wird neben grundlegenden Erkenntnissen über molekularbiologische Prozesse auch neue therapeutische Angriffspunkte an die Hand geben (Blum 2000a).

1.4 Humanes Genomprojekt

Ziel des 1990 gestarteten humanen Genomprojektes ist die Sequenzierung und Kartierung der kompletten Erbinformation des Menschen (Olson 1993). Das genetische Material eines Organismus wird als Genom bezeichnet. Der Begriff Genomics umfaßt die Erschließung der kompletten Erbinformation eines Individuums (Lander 1996; Blum 2000b). Die Genomics-Ära begann im Juli 1995 mit der Veröffentlichung der ersten kompletten DNA-Sequenz des Bakteriums *Haemophilus influenzae* (Fleischmann u. a. 1995).

Die komplette Sequenz des humanen Genoms wird für 2003 erwartet. Das Chromosom 21 wurde im Mai 2000 sequenziert und kodiert 225 Gene (Hattori u. a. 2000). Nach Schätzungen umfaßt das humane Genom unter 50.000 Gene. Im Internet ist unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/> der aktuelle Stand des Projektes zu finden. In großem Maßstab hat die Sequenzierung erst 1995 eingesetzt (Boguski 1999).

Um die Fülle von Sequenzinformationen wissenschaftlich und medizinisch nutzen zu können, sind Strategien und Ressourcen erforderlich, die eine rasche und zuverlässige Analyse individueller genomischer DNA-Sequenzen und zell- bzw. gewebsspezifische Genexpressionsmuster erlauben und als „functional genomics“ bezeichnet werden (Lander 1996).

Mittels der DNA-Chip-Technologie (microarray), die auf dem Prinzip der spezifischen Hybridisierung komplementärer DNA- und RNA-Moleküle beruht, können Tausende von Genen simultan untersucht werden. Typische Anwendung dieser Technologie sind vergleichende Expressionsstudien, Analysen von DNA-Polymorphismen oder -Mutationen auf genomischer Ebene.

1.5 Hämoglobin

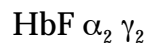
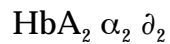
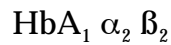
1.5.1 Struktur des Hämoglobin

Die physiologische Aufgabe des Hämoglobin ist der Transport von Atemgasen. Für die Sauerstoffbindung ist das Häm verantwortlich, welches den Sauerstoff reversibel bindet.

Das Hämoglobin, ein Tetramer, ist ein in den Erythrozyten enthaltendes Chromoprotein mit einem relativen Molekulargewicht von 64.458 (Braunitzer u. a. 1961). Das Molekül besteht aus zwei Paaren ungleicher Polypeptidketten. Jede Globinpolypeptidkette ist kovalent mit einer Hämgruppe (Ferroprotoporphyrin) verbunden.

Es kommen strukturell verschiedene Polypeptidketten vor (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), aus denen durch Kombination von je zwei Kettenpaaren mit differenter Struktur die verschiedenen Typen des adulten, fetalen und embryonalen Hämoglobins entstehen.

Die Hämoglobintypen des Erwachsenen sind folgende:



Das Erwachsenen-Hämoglobin besteht zu etwa 97,5% aus Hb A₁, zu ca. 2,5% aus Hb A₂ und zu einem sehr kleinen Anteil aus Hb F.

Drei weitere Typen (Hb Gower 1, Hb Gower 2, Hb Portland) werden unter normalen Bedingungen nur während der Embryonal- und ausschleichend während der Fetalzeit gebildet. Die Hämoglobintypen der Embryonal- und Fetalzeit sind folgende:

Embryonal:



Fetal:



Die Ketten des Hämoglobins sind untereinander durch Ionenbeziehungen und Wasserstoff-Brücken verbunden. Die α -Kette besteht aus 141, die β -Kette aus 146 Aminosäuren (Bunn u. a. 1977). Die α -helikalen Bereiche sind gegeneinander gebogen, so daß eine dreidimensionale Struktur entsteht, die wie ein Behäl-

ter für das zentral gelegene Häm wirkt (Royer u. a. 2001; Shulman 2001). Die Faltung der β -Globinkette gleicht der Faltung der α -Globinketten.

Der Aufbau des HbA₂ wurde von Ingram und Stretton (1961) geklärt. Sie fanden bei ihren Untersuchungen normale α - und δ -Globinketten. Die δ -Ketten sind wie die β -Ketten aus 146 Aminosäuren aufgebaut, unterscheiden sich von dieser jedoch an 10 Positionen. Das HbA₁ und das HbA₂ sind in ihrer Funktion nicht unterscheidbar (De Bruin u. Janssen 1973).

Bunn und Mitarbeiter (1977) beschrieben, daß sich die γ -Globinkette mit ihren 146 Aminosäuren an 39 Positionen von der β -Kette unterscheidet. HbF zeigt gegenüber anderen Hämoglobintypen eine erhöhte O₂-Affinität sowie ein geändertes chemisches, physikalisches und immunologisches Verhalten.

Schroeder (1968) entdeckte mit seinen Mitarbeitern die Heterogenität des fetalen Hämoglobins. An der Bildung von HbF sind zwei Typen von γ -Ketten beteiligt, welche sich nur in einer Position unterscheiden. Bei G γ -Ketten ist die Position 136 durch Glycin, bei A γ -Ketten durch Alanin gekennzeichnet. Sie sind Produkte nichtalleler Gene. Zusätzlich existiert ein Polymorphismus des A γ -Globins, bezeichnet als A γ I und A γ T, wobei ein Austausch von Isoleucin zu Threonin an Position 75 vorliegt (Ricco u. a. 1976).

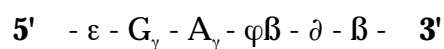
Vermutungen über ein menschliches embryonales Hämoglobin wurden 1954 von Drescher und Künzer veröffentlicht. Diese Hämoglobinkomponente fiel durch ein anderes elektrophoretisches Verhalten auf (Halbrecht u. Klibanski 1956), setzt sich aus je zwei α - und ε -Ketten zusammen und wurde Hb Gower 2 genannt (Huehns u. a. 1964). Eine elektrophoretisch schnellere Komponente nannte man Hb Gower 1, welche sich als Haupthämoglobinkomponente in der ersten embryonalen Phase (Hecht u. a. 1966) herausstellte und aus je zwei ζ -

und ε -Ketten gebildet wird (Huehns u. Farooqui 1975). Zusätzlich wird noch das Hb Portland produziert, bestehend aus je zwei ζ - und γ -Ketten.

1.5.2 Hämoglobingene

Genetische Familienanalysen zeigten eindeutig, daß die Gene für die α - und β -Ketten nicht eng gekoppelt sind und auf verschiedenen Chromosomen liegen. Die α - und ζ -Globingene konnten auf dem kurzen Arm des Chromosomen 16 (Deisserroth u. a. 1977) und die β -, γ -, δ -, und ε -Globingene auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert werden (Deisserroth u. a. 1978).

Das β -Globingen ist ein kleines Gen von nur 1,6 kb, das nur einmal im haploidem Chromosomensatz vorkommt (single copy). Es liegt zusammen mit anderen β -ähnlichen Globingenen (ε , G_γ , A_γ , δ) in einem 60 kb-Genkomplex auf dem kurzen Arm des Chromosomen 11 (Higgs 1989). Daraus ergibt sich folgende Anordnung des Genabschnitts:



Die enge Nachbarschaft der γ -, δ - und β - Gene auf dem gleichen Chromosom und die starke Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen (δ - und β -Ketten unterscheiden sich in 10 von 146 Aminosäuren; zwischen γ - und β -Ketten bestehen Differenzen von 39 Aminosäuren) unterstützt die Theorie, daß δ - und γ -Kettengene aus Duplikationen der β -Gene mit nachfolgenden Aminosäuresubstitutionen entstanden sein können.

DNA-Analysen zeigten, daß die α -Globingene in zwei sich durch hohe Homologie auszeichnenden, 4 kb umfassende Verdoppelungseinheiten gelegen sind, die während der Evolution durch Genverdopplung und ungleiches crossing over entstanden sind (Hess u. a. 1984). Der α -Globinkettenabschnitt, der 50 kb umfasst, enthält die duplizierten α -Gene (α_2 und α_1), ein embryonales α -ähnliches Gen (ζ_2) und drei Pseudogene ($\varphi\zeta_1$; $\varphi\alpha_2$; $\varphi\alpha_1$). Sie sind folgendermaßen auf dem kurzem Arm des Chromosom 16 lokalisiert (Forget 2001):

5' - ζ_2 - $\varphi\zeta_1$ - $\varphi\alpha_2$ - $\varphi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ - **3'**

Die beiden α -Gene (α_1 - α_2) werden unterschiedlich stark transkribiert. Das α_2 -Gen codiert 2-3 mal soviel α -Globin wie das α_1 -Gen (Shakin u. Liebhaber 1986).

Die α - und ζ -Globinketten zeigen nur eine Homologie von 58% in ihren 141 Aminosäuren. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich α_1 - und α_2 -Gene, die ein identisches Protein codieren nur in IVS2 und in der 3' "noncoding" Region (Higgs u. a. 1989). $\varphi\alpha_1$ und $\varphi\alpha_2$ sind unter anderem durch Mutationen in der Transkriptions- bzw. der Promotorregion inaktiviert (Proudfoot u. Maniatis 1980; Hardison u. a. 1986).

Alle Gene einer Gruppe werden in gleicher Richtung von links nach rechts transkribiert. Die übergeordnete Kontrollregion im entfernten 5'-Bereich der β -Globingene bezeichnet man als Locus-Control-Region (LCR), bestehend aus DNase-hypersensitiven Stellen (Grosveld u.a. 1987). Die Funktion dieser Region besteht in der Auflockerung der Chromatinstrukturen des nachgeschalteten Globingen-Komplexes und der Aktivierung der Transkription durch Einwirkung auf die Promotoren der einzelnen Gene. Die entsprechende Region mit DNase-hypersensitiven Stellen des α -Globingen-Komplexes, etwa 40 kb strom-

aufwärts entfernt, wird als HS-40 bezeichnet (Higgs u. a. 1990). Die Integrität dieser Region ist essentiell für die α -Globingen-Expression (Higgs 2001). Zur Genexpression sind Wechselwirkungen mit den Gen nahen regulatorischen Promotoren und Enhancern notwendig.

Die Promotor, der unmittelbar 5' vom Transkriptionsbeginn liegt (Cap-Stelle), enthält vier besonders wichtige Elemente, die entsprechend ihrer Nukleotidsequenz benannt werden. Das der Cap-Stelle am nächsten liegende Element ist die sogenannte ATAAA-Box, welches die Stelle der Transkriptionsinitiation determiniert und essentiell für die Genfunktion ist. Weiter 5' finden sich eine CAAT- und ein Paar von CACCC-Boxen, welche die Effizienz der Transkription erhöhen (Kulozik u. a. 1991). Die zusätzlich notwendigen Enhancer-Elemente liegen vor, innerhalb und hinter dem β -Globingen. Dies unterscheidet das β -Globingen von allen anderen Globingenen, bei denen Enhancer nur im jeweiligen Stromaufwärts-Bereich nachgewiesen werden konnten. Als Erklärung dient die hohe Transkriptions-Aktivität der β -Globingene bei Erwachsenen.

Bisher sind über 1000 Mutationen der humanen Hämoglobingene bekannt, der aktuelle Wissensstand ist online über <http://globin.cse.psu.edu> abrufbar (Hardison u. a. 2001).

Mutationen der Globingene führen zum einen zu einer strukturellen Veränderung der Hämoglobinketten, den Hämoglobinopathien, zum anderen zu Störungen des Gleichgewichtes in der Globinketten-Synthese, den Thalassämien (Weatherall 1997). Zahlenmäßig überwiegen die α - und β - Thalassämien sowie die Sichelzellanämie, die insgesamt zu den weltweit verbreiteten Einzelgendefekten zählen und in vielen Regionen ein großes Problem für die öffentliche Gesundheit darstellen (Angastiniotis u. a. 1995).

1.5.3 Ontogenese der Hämoglobinbildung

In den ersten acht Wochen der Fetalentwicklung, wenn die Blutbildung im Dottersack erfolgt, besteht das Hämoglobin zunächst aus den embryonalen ζ - und ε -Ketten ($\zeta_2\varepsilon_2$). Die Synthese der α - und γ -Ketten beginnt frühzeitig und erreicht ihr Maximum in der 10.-12. Woche der Fetalentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) und HbF ($\alpha_2\gamma_2$) nachweisen. Der Ort der Hämoglobinsynthese ist zunächst Milz und Leber, dann schließlich, wie beim Erwachsenen, das Knochenmark.

Die Hämoglobinkomponenten des drei Monate alten Feten bestehen aus nahezu 97% HbF. Im vierten Entwicklungsmonat tritt HbA₁ auf. Bei der Geburt ist die Haupthämoglobinkomponente mit 50-80% noch HbF, die dann kontinuierlich abnimmt und im 6. Monat nach der Geburt normalerweise auf 2% und weniger absinkt (Huisman u. a. 1955; Bard 1975).

Schon in der 6.-8. Woche sind von einigen Autoren die ersten β -Ketten nachgewiesen worden. Die Syntheserate bleibt jedoch bis zur 36. Woche relativ gering und nimmt erst von diesem Zeitpunkt an sprunghaft zu (Wood u.a. 1977). Bei Geburt erreicht sie 30-50% der γ -Kettensynthese (Huehns u. a. 1964; Bard u. a. 1970). Die Synthese der δ -Kette setzt erst im 3. Trimester ein.

Die charakteristischen Syntheseraten der verschiedenen Polypeptidketten während der Ontogenese sind wichtig für das Verständnis der klinischen Manifestation der Thalassämie-Syndrome. Synthesedefekte von α - und γ -Ketten sind schon bei der Geburt erkennbar. Die Insuffizienz der β -Ketten-Synthese und deren Strukturvarianten manifestiert sich erst später, so daß die klinische Symptomatik erst in der Postnatalperiode zur Ausprägung kommt. Jedoch ermöglicht die, wenn auch nur geringe, β -Kettensynthese im Fetus eine Diagnostik

vor der 20. Schwangerschaftswoche (Hollenberg u. a. 1971). Im Jahr 1975 wurde erstmalig sowohl α - als auch β -Thalassämie pränatal durch Gewinnung fetaler Blutproben diagnostiziert. Mittlerweile erfolgt die Thalassämie-Diagnostik durch Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese über DNA-Analyse mittels PCR, dabei muss, um Fehldiagnosen zu vermeiden, eine Kontamination durch mütterliche Zellen ausgeschlossen werden (Cao u. Rosatelli 1993).

Durch die derzeit umstrittene Präimplantationsdiagnostik könnte es gelingen Paare mit genetischer Belastung bezüglich Thalassämie eine gesunde Nachkommenschaft zu ermöglichen (Kuliev u. a. 1999).

1.5.4 Umschaltung von fetalem zu adultem Hämoglobin

Der ontogenetisch molekulare Mechanismus der Umschaltung ("switch-over") der Polypeptidkettensynthese wird vermittelt durch Interaktion zwischen Kontroll- und Steuerelementen, welche die Aktivität des gesamten Genlokus reguliert und sehr gut aufeinander abgestimmt ist (Enver u. a. 1990; Higgs u. a. 1990). Einmal induziert, ist der Umschaltungsvorgang irreversibel und die Produktion der γ -Ketten und β -Ketten erfolgt streng reziprok. Bei Persistenz oder Reaktivierung der HbF-Synthese besteht diese umgekehrte Proportionalität nicht.

Die Regulation der Genexpression hängt für den β -Globin-Komplex von einer Wechselwirkung zwischen den lokalen Promotoren, Verstärkerelementen und der Locus-Controll-Region (LCR) ab. Für den α -Globin-Komplex gibt es eine der LCR ähnliche Region mit hypersensitiven Stellen, bezeichnet als HS-40. In der fetalen Phase der Entwicklung konkurriert die fetale Funktionseinheit effektiver um die LCR-Wirkung als die adulte Funktionseinheit, während sich

dieses Verhältnis postnatal umkehrt. Das Konkurrenzverhältnis zwischen den fetalen und adulten Promotoren um die LCR-Wirkung führt zur perinatalen Umschaltung von der HbF zur HbA₁ und HbA₂-Synthese (Enver u. a. 1990; Higgs u. a. 1990). Trotz deutlicher Fortschritte im Verständnis der Umschaltvorgänge ist der genaue Mechanismus nach wie vor nicht geklärt (Fraser u. a. 1998; Weatherall u. a. 1999b).

Zur Zeit der Geburt existiert noch ein zweiter Umschaltmechanismus, der die verschiedenen Anteile von G_γ- zu A_γ-Ketten im HbF bedingt (Masala u. a. 1983; Headlee u. a. 1983). Man erklärt sich diese anteilmäßige Veränderung mit einer differentiellen Repression der beiden Genloci (Nute u. a. 1973). Das Verhältnis G_γ: A_γ Ketten liegt beim Neugeborenen bei 7:3 und im sechsten Lebensmonat bei 2:3 (Schroeder u. Huisman 1969). Dieses Verhältnis von 2:3 fanden Robinet und Mitarbeiter (1984) ebenfalls bei hämatologisch unauffälligen Erwachsenen.

1.6 Thalassämie

Die Thalassämien bilden in bezug auf die Geno- und Phänotypen eine heterogene Gruppe von Hämoglobinopathien, deren Klassifizierung auf einer genetisch determinierten, quantitativ verminderten Synthese einer oder mehrerer strukturell normaler Polypeptidketten beruht (Weatherall 1997). Nach der jeweils von der Synthesestörung betroffenen Kette unterscheidet man zwischen α-, β-, γ-, δβ-, δ- und εγδβ-Thalassämien.

1.6.1 α -Thalassämie

Die α -Thalassämien sind charakterisiert durch eine quantitativ verminderte Synthese der α -Kette, die zu einer hypochromen, mikrozytären Anämie führt (Higgs 2001). Es können die normalen Hämoglobinkomponenten (HbA₁, HbA₂, HbF) nicht oder nur vermindert gebildet werden. Klinische Symptomatik und der Anteil der beiden Überschuß-Varianten HbH (β_4) und Hb Barts' (γ_4) am Gesamthämoglobin sind eng miteinander und der Schwere des Gendefektes korreliert (Chan u. a. 1997; Chen u. a. 2000). Der Locus der α -Globinketten umfasst zwei eng miteinander gekoppelte, in hohem Maße homologe α -Globingene. Die molekulare Grundlage der α -Thalassämie stellt sich heterogen dar, meist in Form von DNA-Deletionen.

Am häufigsten sind Deletionen, die nur eines der beiden α -Globingene zerstören und zur leichten Ausprägung dem sogenannten α^+ -Thalassämie-Phänotyp führen (Higgs u. Bowden 2001). Diese Deletionen werden von einem ungleichen Crossing-Over zwischen zwei hochgradig homologen Regionen bedingt. Es entstehen Chromosomen, die 3 α -Globingene enthalten (Higgs u. a. 1980).

Betrifft die Deletion beide cis-ständigen α -Globingene, wird keine α -Globinkette synthetisiert, was zu einem α^0 -Thalassämie-Phänotyp führt. Homozygotie dieser Chromosomen führt zu Hb Bart's Hydrops fetalis-Syndrom, das nicht mit dem Leben vereinbar ist (Chen u. a. 2000). Die meisten deletionsbedingten α^0 -Thalassämie-Formen sind durch nicht homologe Rekombination entstanden (Higgs 1993).

Andere Ursachen, die zu einer α^+ -Thalassämie führen, zuerst beschrieben von Kan und Mitarbeitern (1977), zeigten sich als Ergebnisse unterschiedlicher molekularer Defekte (Higgs u. a. 1989), dabei ist das α_2 -Gen am stärksten betrof-

fen. Die Mutationen betreffen die RNA-Verarbeitung (Felber u. a. 1982), die mRNA-Translation (Moi u. a. 1987) und den Terminations-Codon (Hunt u. a. 1982). Deletionen der DNA-Regulations-Region HS-40, die 40 kb oberhalb des Globingen-Komplexes liegt, können ebenfalls eine α -Thalassämie hervorrufen, obwohl die Globingene auf dem Chromosom völlig intakt sind (Hatton u. a. 1990).

Eine Mutation auf dem Chromosom X q13.3 bedingt eine Down-Regulation der α -Globinketten-Expression ohne Einfluß auf die β -Globingen-Expression, klinisch resultiert das ATR-X-Syndrom (α -Thalassämie mit Retardierung) (Gibbons u. Higgs 2001). Diese Mutation bestätigt die unterschiedliche Regulierung der α - und β -Globingen-Komplexe.

1.6.2 β -Thalassämie

Es handelt sich meist um autosomal-rezessiv vererbte Defekte der β -Globinsynthese. Die Imbalance der Polypeptidkettensynthese führt zu einem Defizit an neu gebildetem Blutfarbstoff, damit zu einer hypochromen Anämie. Es kommt zu einer Erhöhung der γ -(HbF) und δ -(HbA₂) Kettensynthese, sowie einem Überschuß an freien α -Ketten, die sich in den Erythrozyten zu instabilen Tetrameren zusammenlagern und zu Innenkörpern präzipitieren (Weatherall 1998).

Die klinische Einteilung in Thalassaemia major (homozygote Form), Thalassaemia minor (heterozygote Form) und β -Thalassämie-Träger konnte durch molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich der Basisdefekte in den letzten Jahren größtenteils aufgeklärt werden. In Abhängigkeit der genetischen Konstitution ist die β -Kettensynthese stark vermindert (β^+ -Thalassämie) oder

ausgefallen (β^0 -Thalassämie) (Weatherall 1994). Entscheidend für die klinische Symptomatik ist die Homo- oder Heterozygotie des Defektes.

Auf molekularer Ebene sind β -Thalassämien ausgesprochen heterogen, bis heute konnten über 200 Mutationen identifiziert werden (Huisman u. Carver 1998). Im Gegensatz zur α -Thalassämie kommt die β -Thalassämie fast immer durch Punktmutationen oder kleinere Oligonucleotid-Additionen bzw. Deletionen auf den β -Globingen zustande. Die Expression des β -Globingens kann in jedem Schritt ihres Weges von der DNA zum Protein inaktiviert werden.

Auf DNA-Ebene kommt es durch Deletion des β -Globingens, je nach Umfang der Deletion, zur hereditären Persistenz fetaler Hämoglobinsynthese. Störungen der Transkription erfolgen durch Mutationen des Promotors (Kulozik u. a. 1991) und Deletionen der DNase-hypersensitiven Stellen 2-4 (Curtin u. Kan 1988). Bei der RNA-Verarbeitung führen Mutationen der Cap-Stelle oder des Poly-A-Signals zur RNA-Instabilität und gestörten Proteinsynthese (Orkin u. a. 1985; Wong u. a. 1987). Die durch Mutation bedingte unkorrekte Spleißung lässt RNA entstehen, die nur vermindert β -Globin produzieren kann (Busslinger u. a. 1981). Auf der Translationsebene können pathologische Stopcodons durch Nonsense- und Frameshift-Mutationen entstehen, die zur vollständigen Inaktivierung des β -Globingens führen (Huisman 1989). Mutationen, die die Aminosäuresequenz verändern (Misense-Mutationen) führen zu einer Instabilität der β -Globinkette (Thein u. a. 1990). Die seltene β -Thalassämie mit autosomal dominantem Erbgang gehört in diesen Formenkreis. Viele dieser Mutationen sind funktionell normal und als klinisch stumm zu bezeichnen.

Die bei der homozygoten β -Thalassämie beobachtete klinische Variabilität kann zum Teil dadurch erklärt werden, daß die verschiedenen β -Thalassämie-Mutationen die Genexpression unterschiedlich stark stören (Weatherall 1999c).

1.6.3 γ -Thalassämie

In Abhängigkeit von den unterschiedlichen Aktivitäten der 4 Strukturgene für die γ -Ketten sind theoretisch verschieden starke Synthesestörungen der γ -Ketten zu erwarten. Bedingt durch das Auftreten der γ -Ketten in der Ontogenese würde sich theoretisch eine homozygote γ -Thalassämie nur beim Feten und Neugeborenen manifestieren. Mit der physiologischen Inaktivierung der γ -Kettensynthese und paralleler Aktivierung der β -Kettengene in der Postnatalperiode würde die entsprechend zu erwartende Symptomatik verschwinden.

Der isolierten γ -Thalassämie liegen entweder Deletionen der Kettengene oder der Regulationsregion zu Grunde (Sukumaran u. a. 1983; Zeng u. a. 1985). Eine Deletion, nachgewiesen bei chinesischen Neugeborenen, ist charakterisiert bei Heterozygoten durch verminderte und bei Homozygoten durch fehlende G_γ -Kettensynthese. Diese Deletion umfasst einen 5 kb großen Abschnitt als Ergebnis eines crossing over zwischen G_γ und A_γ , dieser Defekt wurde auch bei indischen, japanischen und ost-asiatischen Neugeborenen nachgewiesen (Nakatsuji u. a. 1984). Deletion im Abschnitt 5' von -222 bis -225 bedingt eine erniedrigte A_γ -Kettensynthese bei unauffälliger bis erhöhter G_γ -Synthese und ist damit Beispiel einer Störung der Regulation durch Deletion (Gilman u. a. 1988).

1.6.4 Komplexe β -Thalassämie

Die molekularen Grundlagen der $\delta\beta$ -Thalassämien sind bekannt (Wood 1993; Baysal u. Carver 1995; Huismann u. a. 1997). Bei der $(\delta\beta)^+$ -Thalassämie kommt es zur abnormen $\delta\beta$ -Genfusion in der Meiose mit Veränderung in der Promotorregion der δ -Globinketten. Die $(\delta\beta)^\circ$ -Thalassämie ist das Ergebnis von Deletionen des β -Globingen-Komplexes unterschiedlichen Ausmaßes. Sie werden

eingeteilt in $(\delta\beta)^\circ$ - oder $(\Delta\gamma\delta\beta)^\circ$ -Thalassämien in Abhängigkeit, ob das A_γ -Globin von der Deletion betroffen ist.

Die $\delta\gamma\beta$ -Thalassämien sind als eine heterogene Gruppe bekannt und lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen in ausgeprägte Deletionen großer Teile oder des gesamten β -Globin-Komplexes, zum anderen in Deletionen, wie z.B. bei Spaniern, Briten und Niederländern beschriebenen Formen, welche die Strukturgene intakt lassen, jedoch die Kontrollelemente in der LCR betreffen (Henthorn u. a. 1985; Mager u. a. 1985; Anagnou u. a. 1988). Homozygotie für $\delta\gamma\beta$ -Thalassämie ist nicht mit dem Leben vereinbar.

1.6.5 Häufigkeit der Thalassämien

Die Thalassämien gehören zu den häufigsten Einzelgendefekten weltweit und stellen ein großes Problem für die öffentliche Gesundheit insbesondere im Mittelmeerraum, Mittlerem Osten, indischen Subkontinent, Fernen Osten, tropischen Afrika und der Karibik dar.

Durch Zuzug von Menschen aus diesen Regionen kommt es auch in Europa sowie Nord- und Südamerika zum vermehrtem Auftreten der Thalassämien (<http://www.who.int/ncd/hgn/haemogl.htm>) (Tuzmen u. Schechter 2001). Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, daß 250 Millionen Menschen, d.h. 4,5% der Weltbevölkerung, heterozygot für ein defektes Globin sind und meist eine Thalassämie oder Sichelzellanämie resultiert. Dieses führt außerdem dazu, daß jährlich 300000 letal betroffene Homozygote geboren werden (<http://www.who.int/ncd/hgn/haemogl.htm>) (WHO 2000). In Deutschland leben derzeit etwa 300 Patienten mit einer Thalassaemia major (Cario u. a. 1999).

1.7 Hereditäre Persistenz von fetalem Hämoglobin

Eine erhöhte HbF-Produktion (normal: 0,5-0,8% HbF) im Erwachsenenalter, bezeichnet als hereditäre Persistenz von HbF (HPFH), wurde erstmals von Edington und Lehmann beschrieben (1955). Die Klinik ist bei den heterozygoten Ausprägungen meist unauffällig und auch bei den Homozygoten gibt es allenfalls Veränderungen in der Erythrozytenmorphologie, jedoch keine Anämie.

Die medizinische Bedeutung der HPFH-Syndrome liegt in der modulierenden Wirkung, die sie auf die β -Thalassämien (Weatherall 1999c) und die Sichelzellanämie ausüben. Mittels eindeutiger HPFH-Diagnostik durch hämatologische und molekulargenetische Methoden lässt sich die Prognose der Patienten besser abschätzen. Bei der homozygoten β -Thalassämie ist das relative HbF wegen des selektiven Überlebensvorteils der HbF-Zellen immer erhöht. Die klinische Auswirkung der HPFH hängt wesentlich von dessen molekularer Basis ab. Als Ursache finden sich Mutationen, die an den β -Globingenkomplexes gebunden und solche, die nicht an den β -Globingenkomplex gebunden sind.

Zu den an den β -Globingenkomplexes gebundenen Mutationen gehören DNA-Deletionen, welche das β -Globingen und mehr oder weniger dessen flankierenden Sequenzen betreffen (Collins u. Weissman 1984; Tate u. a. 1986) sowie Punktmutationen der γ -Globingen-Promotoren (Gelinas u. a. 1985). Diese Mutationstypen spielen zahlenmäßig in der Modifizierung der Genotypen der β -Thalassämie kaum eine Rolle (Weatherall u. Clegg 1999a).

Genloci, die nicht an den β -Globinkomplex gebunden sind und dennoch die HbF-Produktion beeinflussen, sind auf dem Chromosom 6 (Craig u. a. 1996) und X-Chromosom lokalisiert (Dover u. a. 1992). Vermutlich haben diese Gene

Einfluss auf Transkriptionsfaktoren, die in der Aktivierung oder Hemmung der γ -Kettensynthese involviert sind.

Durch gemeinsame Vererbung von Determinanten, welche die HbF-Expression anregen, kann der Schweregrad der β -Thalassämie abgeschwächt werden. Wenn ein β -Thalassämie-Chromosom zum Beispiel zusammen mit der XmnI-Spaltungsstelle an Position –158 des G_γ -Globingens vererbt wird (Gilman u. Huisman 1985), resultiert daraus eine wesentlich schwächere Anämie als bei der Kombination mit anderen Mutationen (Winichagoon u. a. 1993).

Es ist bekannt, daß eine größere Anzahl an Genloci in die modulierende Wirkung von HPFH involviert ist, das Wissen um die genetische Grundlage dieser wichtigen Interaktion ist jedoch noch begrenzt (Weatherall 1999c).

1.8 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit galt es, qualitative und quantitative Globin-Varianten in einer großen Stichprobe hessischer Neugeborener durch die Hybrid-isoelektrische Fokussierung (HIEF) nachzuweisen. Den Schwerpunkt bildeten die Darstellung elektrisch neutraler und der Nachweis quantitativer Varianten. Die zum Zeitpunkt des experimentellen Teils der Arbeit einzige alternative Darstellungsmöglichkeit von γ -Globinvarianten war die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie.

Bisher ging man davon aus, daß elektrisch neutrale Aminosäuresubstitutionen in einem Protein nur dann mit elektrophoretischen Methoden dargestellt werden können, wenn sie mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergehen, welche die Nettoladung und/oder die äußere Form verändern oder den Verlust eines Liganden verursachen (Ramshaw u. a. 1979).

In unserem Labor gelang mit Hilfe der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung (HIEF) der Nachweis von neutralen Aminosäureaustauschen in denaturierten γ -Globinen, im Transthyretin und im Apolipoprotein AI (Altland u. a. 1986a, 1986b).

Die Prävalenz für Thalassämien ist in einigen Gegenden (Mittelmeerraum) hoch und nimmt auch in Deutschland zu. Der autosomale Vererbungsmodus führt bei Homozygotie der Anlage zu einem schweren Verlauf mit der Notwendigkeit einer lebenslangen intensiven Therapie; bei heterozygoten Merkmalsträgern zu einer milden Verlaufsform. Für die genetische Beratung in endemischen Gebieten ist ein effektives Suchverfahren notwendig. Es galt zu prüfen, ob HIEF als Suchverfahren einzusetzen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die Proben wurden aus Guthrie-Testkarten (Schleicher u. Schüll, Dassel u. Polverich, Haiger-Fellerdilln) ausgestanzt und zur weiteren Behandlung in Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden) überführt.

Die Gele für HIEF wurden mittels eines personalcomputergesteuerten Gradientenmischers gegossen, der aus 8 Schrittmotorbüretten T 100 mit Aufsätzen für 5 bzw. 10 ml (Schott-Geräte, Hofheim) und einer Mischkammer (Desaga) aufgebaut war. Das Programm für die Steuerung der Anlage stellte Prof. Altland zur Verfügung.

Die Gele wurden auf Glasplatten der Größe 200x265x0,5 mm (Glaskontor, Gießen) gegossen, die auf die Präzisionsküvetten der Größe 200x265x4 mm (Desaga) gelegt, mit Glasplatten gleicher Größe (Glaskontor, Gießen) stabilisiert und mit Klemmen (Nr. 1964 LKB, Bromma, Schweden) zusammengehalten wurden.

Nach Beenden des Polymerisationsvorganges wurden die Gele in einem Aquarium der Größe 25x25x40 cm (Karstadt, Gießen) gewaschen. Während des Waschvorganges wurde das Wasser über eine Saugfilterpumpe (Typ 2013,

Eheim, Drezisau), unter der Kontrolle eines Leitfähigkeitsmeßgerätes (Modell LF 39, WTW, Weinheim), deionisiert.

Die Elektrofokussierung erfolgte durch eine Anlage von Desaga (Heidelberg), versehen mit einer Keramik Kühlplatte 25x25 cm, welche von einem Kryostaten (Typ MC5 Colora, Lorch) gekühlt wurde. Als Stromversorgung diente ein stabilisiertes Netzgerät (2297 Makrodrive 5, LKB, Bromma, Schweden).

Die Entfärbung der Globin-Gele fand in der Diffusions- und Entfärbeapparatur (Desaga) statt.

Die Proben wurden mit dem Densitometer (Elscrip 400, Hirschmann, München), das über einen Personalcomputer HP 9836 C (Hewlett-Packard, Böblingen) mit einem von Altland und Altland entwickelten Pascal-Programm bedient wurde, quantitativ ausgewertet.

Die Gele wurden mit einer Spiegelreflexkamera Nikon FE, bestückt mit einem Makroobjektiv 4/50 mm (Asahi-Pentax), auf einen Lichtkasten (Desaga) fotografiert. Benutzt wurde Agfa Ortho 25 Professional Schwarzweißfilm (Agfa Gevaert, Leverkusen).

Als Kleinmaterial fanden noch Verwendung: Chromatographiepapier (Nr. 1 und Nr. 17, Whatmann, Kent, England), Multiple Spritze (Typ 10 und 25 µl, Desaga).

2.1.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien fanden Verwendung:

Acrylamid, 2x krist. reinst (Serva, Heidelberg); Dithiothreitol (Sigma, St. Louis, MO, USA); Immobiline und Trägerampholyte verschiedener pH-Bereiche (LKB, Bromma, Schweden); Jodacetamid (Fluka, Neu-Ulm); N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst, (Serva); N,N,N',N'-Tetramethylethlendiamin (TEMED), reinst (Serva); Triton X-100, (Merck, Darmstadt); Methacryloxypropyltrimethyloxysilan (Polyfix 1000, Desaga); Repel Silan (LKB, Bromma, Schweden); Serva Violet (Serva). Alle anderen Reagenzien wurden in p.a.-Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.3 Proben

Für die Untersuchung wurde vom Staatlichen Medizinaluntersuchungsamt Hessen Restmaterial aus dem Screening für angeborene Stoffwechselkrankheiten von über 4000 auf Guthrie-Testkarten aufgetrockneten Vollblutproben Neugeborener zur Verfügung gestellt. Von Prof. T. H. J. Huisman, Augusta, Georgia, USA, erhielten wir Blutproben mit unterschiedlichen quantitativen Verhältnissen von G_γ- und A_γ-Globin.

2.2 Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung

Von den im Staatlichen Medizinaluntersuchungsamt aus den Guthrie-Testkarten (Guthrie u. Susie 1963) ausgestanzten runden Filterpapierplättchen (Durchmesser 5,0 mm) mit dem getrockneten Blut Neugeborener wurde je eine Mikrotiterplatte mit 96 Proben beschickt und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Untersuchung wurde jedes Filterpapierplättchen mit $200\text{ }\mu\text{l}$ Elutionslösung versetzt und für 2 Std. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die multiple Probenverarbeitung (Altland 1977) ermöglichte in einem Arbeitsgang je nach freier Gerätekapazität die gleichzeitige Untersuchung von 96 bzw. 192 Eluaten getrockneter Blutproben.

Rezept der Elutionslösung (0,1 mol/l Tris; 200 g/l Succrose, pH 8,0):

40 g	Succrose
0,26 g	Saponin
2,43 g	Tris
ad 190 ml	mit deionisiertem Wasser
ad pH 8,0	mit konz. HCl
ad 200 ml	mit deionisiertem Wasser

Die Eluate wurden entweder sofort untersucht oder bis zur Verwendung in der Mikrotiterplatte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.2.2 Horizontale Hybrid-isoelektrische Fokussierung

2.2.2.1 Herstellung der Gele mit immobilisierten pH-Gradienten

Die Stabilisierung des pH-Gradienten erfolgte durch einen aus Glycerin aufgebauten linearen Dichtegradienten. Die für die Herstellung des immobilisierten pH-Gradienten benötigten Mischungen der Stammlösungen aus den reinen Immobilinen wurden durch ein Computerprogramm errechnet. Zur Reduktion von Dosierungsfehlern bei der Immobilinzusammensetzung der einzelnen Gele wurden gemischte Stammlösungen für je 50 Gele verwendet. Bei Vorversuchen erwies es sich als praktisch, die aliquotierte Stammlösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzufrieren und bei Bedarf aufzutauen. Die Qualität des pH-Gradienten blieb dadurch unbeeinflusst. Die in diesem Screening benötigten 86 Gele wurden aus nur zwei Ansätzen von Immobilinstammlösungen gegossen.

Das Rezept von Gianazza u. a. (1984) bildete die Grundlage zur Erstellung der Stammlösungen, die für den immobilisierten pH-Gradienten pH 6,3-10,5 benötigt wurde.

Der computergesteuerte Gießvorgang der Gele sorgte für identische, in unserem Fall abgeflachte pH-Gradienten. Ein Gießvorgang ermöglichte die gleichzeitige Herstellung von bis zu 8 Gelen. Das Programm ermöglichte es, pH-Gradienten flexibel und reproduzierbar zu definieren (Altland u. a. 1985b).

Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit zeigten, daß die Bandenmuster identischer Proben auf Gelen gleicher Charge an der, von der Gelkante gemessen, genau gleichen Stelle fokussierten. Bei Gelen unterschiedlicher Chargen stimmte der Abstand zwischen den Banden überein. Bei Chargenwechsel kam es zu geringfügigen anodischen oder kathodischen Verschiebungen.

Nach einer Vorschrift von Altland u. Rossmann (1985a) wurden die Immobilisierungs-Reinsubstanzen mit 1 mol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan auf pH 6,8 titriert und mit 0,1 mol/l Tris-Phosphat-Puffer (pH 6,8) bis zur gewünschten Endkonzentration von 0,25 mol/l verdünnt.

Die Acrylamid- und Katalysatorlösungen in Bürette 1 bis 4 wurden frisch angesetzt und mit der Vakuumpumpe entgast.

Die Gele mit den Maßen 250x265x0,5 mm wurden in Präzisionsküvetten gegossen, deren Präzisionsdichtungen mit eingelassenen rostfreien Stahlkugeln (Durchmesser $0,5 \pm 0,002$ mm) versehen waren, die eine hohe Genauigkeit der Schichtdicke und damit der Reproduzierbarkeit des pH-Gradienten garantieren. Die mit der Dichtung versehene Glasplatte wurde mit Repel-Silan behandelt. Als Gelträger diente eine 1,0 mm starke, gleich große, mit Haftsilan abgeriebene Glasplatte (Radola 1980), stabilisiert durch eine 3 mm starke, wiederum gleich große Glasplatte, die mit seitlich befestigten Stahlklemmen zusammengehalten wurden.

Nach Eingabe des gewünschten Gradienten in den Computer wurde mit Hilfe des Gradientenmischers (Altland u. Altland 1984a, 1984b), die Gellösung in die aufrecht gestellte Gießform in der Mitte der oberen Längskante eingefüllt. Die Versuche erfolgten mit Gelen von pH 6,3-10,5, die im pH-Bereich 7,48-7,64 auf 0,04 pH/cm abgeflacht waren.

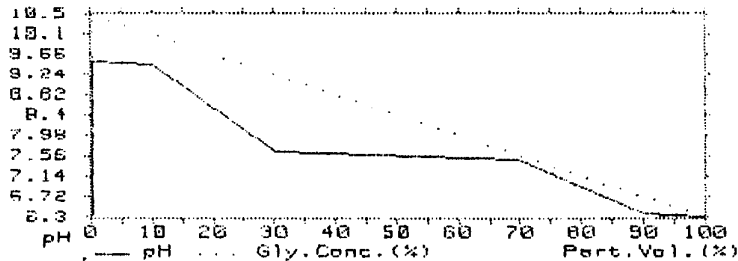
Um das nicht an die Gelmatrix gebundene, überschüssige Material zu entfernen, wurden die Gele nach einer Polymerisationszeit von 2 Std. für weitere 2 Std. in ein mit deionisiertem Wasser und 1% Glycerin gefülltes Aquarium gestellt, das über einen Saugfilter auf einer Leitfähigkeit von 0,4 μS , kontrolliert durch ein Leitfähigkeitsmeßgerät, gehalten wurde (Altland u. a. 1984c).

Bei Raumtemperatur wurden die Gele zum Trocknen vor einen Ventilator gestellt und in Polypropylenfolie bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Der kontrollierte Trocknungsprozeß führte zu einem problemlosen Probenauftrag, da bei Fehlen überschüssiger Flüssigkeit ein Ineinanderlaufen der Proben verhindert werden konnte, dieses war wichtig für die quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Sobald die Gele durchgetrocknet waren, wurden sie bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

.....
G r a d i e n t C o n t r o l

Program: Immobiline Gradient (Two pH Ranges, FN: GRA8_S2)
 File Name: HB_TRIT



D a t a

TV= 13.2 mL; BV1_4 (Gly.) = 10 mL; BV5_8 = 5 mL; MV = .3 mL;
 LGly = 0.3%; HGly = 10%;
 LpH1 = 6.3 U; HpH1 = 10.5 U; LpH2 = 7.3 U; HpH2 = 7.7 U;
 L1 = 5%; H1 = 5%; L2 = 5%; H2 = 5%; Speed: 20%

Endpoints of lines

pH Gradient:

EP No.	PV(%)	pH	EP No.	PV(%)	pH	EP No.	PV(%)	pH	EP No.	PV(%)	pH
1	0.0	9.50	2	10.0	9.45	3	30.0	7.64	4	70.0	7.48
5	90.0	6.35	6	100.0	6.30						

Glycerol Gradient:

EP No.	PV(%)	Gly. (%)	EP No.	PV(%)	Gly. (%)	EP No.	PV(%)	Gly. (%)	EP No.	PV(%)	Gly. (%)
1	0.0	10.00	2	100.0	0.00						

(EP=End Point; PV(%)=Part.Vol.; TV=Tot.Vol.; BV1,4,5,8= Vol. of Bur. no. 1-4,5-8, resp.; MV=Mix.Vol.; L, HpH1,2= Low & High limit of pH ranges 1 & 2, resp.; L, HGly=Low, High Gly.conc.limit(%); L1, H1, L2, H2 = Proportions of catalyst solutions 1 & 2 admixed to gradient solutions of low and high glycerol concentration, resp..

Abbildung 1: Parameter und Profil eines zwischen pH 7,48 und 7,64 auf 0,04 pH/cm abgeflachten immobilisierten pH-Gradienten pH 6,3-10,5, der ausschließlich in dem vorgestellten Screening Verwendung fand.

2.2.2.2 Durchführung der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung

Für die Versuche wurden die getrockneten Gele vor Gebrauch in den Präzisionsküvetten bei Zimmertemperatur rehydratisiert (Altland u. a. 1984c). Die Rehydratation fand in den gleichen Präzisionsküvetten statt, welche für das Gießen der Gele benutzt wurden. Dieses gewährleistete, daß die Zusammen-

setzung der Rehydratationslösung der im Gel aufgenommenen Lösung entsprach.

Die Rehydratationslösung wurde mit Hilfe einer Einmalspritze (20 ml) über einen Silikonschlauch in den unteren Einlaß der Küvette gefüllt. Dieser Lösung wurden als Additive DTT, Harnstoff, Triton X-100 und Trägerampholyte, abgestimmt auf den immobilisierten Gradienten, hinzugefügt (Rossmann u. a. 1986).

Von uns vorgenommene Änderungen der Konzentrationen der Additive führten zu keinen besseren Ergebnissen. Ein Zusatz von 50 mmol/l DTT verhindert die Aufspaltung der Globinketten (Rossmann u. a. 1986). Durch die Zugabe von 8 mol/l Harnstoff wurde eine gute Trennung der Globinketten und damit ein reproduzierbares Bandenmuster erreicht. Die Zugabe von Triton X-100 reduzierte die Hintergrundfärbung und ermöglichte die Trennung der γ -Globine in G_γ und A_γ sowie $A_\gamma I$ und $A_\gamma T$. Versuche mit abnehmenden Tritonkonzentrationen ergaben als optimalen Zusatz 20 ml/l Triton X-100. Der Zusatz der Trägerampholyte verringerte den adsorptiven Effekt, führte aber zu einem nachteiligen Flüssigkeitsaustritt auf die Geloberfläche und damit zu einer Abnahme der Trennschärfe. Die Konzentration der Trägerampholyte erfolgte in dieser Untersuchung nach der Vorschrift von Altland und Rossmann (1986a). Daraus ergab sich für die Rehydratationslösung (8 mol/l Harnstoff; 50 mmol/l DTT; 4 g/l Trägerampholyte pH 6-8; 20 ml/l Triton X-100) eines Gels des pH-Bereiches 6,3-10,5 folgendes Rezept:

7,2 g	Harnstoff
0,3 ml	Triton X-100
234 μ l	Ampholine pH 6-8
116,3 mg	DTT
ad 15 ml	mit deionisiertem Wasser

Zur Vorbereitung der Elektrofokussierung wurde auf die Kühlplatte der Trennkammer eine Glasschale aufgelegt, dünnflüssiges Paraffinöl diente dabei als Kontaktmedium. Das Gel wurde in die Glasschale gelegt und zum Schutz vor der Exposition gegenüber der Laboratmosphäre mit dünnflüssigem Paraffinöl vollständig abgedeckt (Altland u. a. 1987). Die in Gellänge geschnittenen und 1 cm breiten Elektrodenstreifen (Whatmann Nr. 17) wurden für die kathodische Seite in 0,01 M NaOH-Lösung und für die anodische Seite in 0,01 M H_3PO_4 -Lösung getränkt, aufgelegt und mit den Elektroden versehen.

Für die endgültige Probenverarbeitung wurden 10 μl aus dem von den Filterplättchen gewonnen Eluat mit 100 μl Mix in einer neuen Mikrotiterplatte versetzt und bei 37 °C für eine halbe Stunde inkubiert.

Rezept für die Mix-Lösung (10 mol/l Harnstoff; 50 mmol/l DTT):

6 g	Harnstoff
77 mg	DTT
ad 10 ml	mit deionisiertem Wasser

Der Probenauftrag erfolgte mit einem von Altland entwickelten Applikator (Altland u. Becher 1988), der 50 Proben zu fassen vermag. Auf den Applikator wurden mit der Multiplen Spritze (10 μl) nach Vorgabe von 2 μl dünnflüssigem Paraffin 6 μl Eluat-Mix aufgetragen und dieser danach vor der Anode auf das Gel abgesetzt.

Die Trennbedingungen, bestimmt durch die Gel-Länge sowie Steigung und Länge des abgeflachten pH-Bereiches, betragen 3,5 Stunden bei 3000 V, 4 mA, 20 Watt und einer Temperatur von 15 °C der Kühlplatte. Trennzeiten von 3,5 Std. führten zu scharf begrenzten Banden der Globinketten im Gel.

2.2.3 Fixieren, Färben, Trocknen

Zur Entfernung des Paraffinöls wurden die Gele zweimal in Petroleumbenzin gewaschen und anschließend zur Fällung der Proteine über Nacht in 200 ml/l Trichloressigsäure gegeben. Nach 5 minütigem Waschen in 5% Phosphorsäure fand die Färbung in einer Lösung aus 10 g/l Serva Violett und 11% Phosphorsäure im Verhältnis 1:9 statt (Färbung nach Patestos u. a. 1988). Die Entfärbelösung wurde in einer Saugfilterpumpe umgewälzt und auf diese Weise ständig von aus den Gelen freigesetzten Farbstoffen gereinigt. Die Entfärbung in Phosphorsäure 3% wurde beendet, wenn ein klarer Hintergrund und somit ein guter Kontrast zu den Proteinbanden erreicht war (30 min.). Anschließend wurden die Gele unter Leitungswasser mit einem Schwamm abgerieben und zur Nachbehandlung für 15 min. in eine Lösung aus 100 ml/l Essigsäure und 10 ml/l Glycerin gegeben. Die gefärbten Gele wurden bei Raumtemperatur vor dem Ventilator getrocknet, dann in Folie verpackt und bei Dunkelheit gelagert.

2.2.4 Auswertung und Dokumentation des Hämoglobin-Screenings

Die Gele wurden nach qualitativen und quantitativen Globinvarianten ausgewertet. Das Vorliegen einer qualitativen genetischen Variante wurde durch den Nachweis eines spezifischen Bandenmusters als Ausdruck des Genprodukts im Screening aufgezeigt.

In der quantitativen Auswertung wurde die Menge des Genprodukts im Gel densitometrisch bestimmt. Auf diese Weise konnte die quantitative Relation der Variante zur normalen γ -Globinkette nachgewiesen werden. Für die quantitative Auswertung wurden die frisch gefärbten und getrockneten Gele densitometriert, wenn eine saubere Trennung der einzelnen Probe sowie eine gute

Abgrenzbarkeit der Nachbarprobe gegeben war. Nach Basislinienkorrektur wurden in dem sich darstellenden Kurvendiagramm die benötigten Peaks markiert. Die Fläche jedes Peaks wurde in Prozent der gesamt markierten Fläche (β - + γ -Globinbanden) ausgedrückt. Der angeschlossene Drucker ermöglichte die Dokumentation, bei Bedarf wurde der gesamte Kurvenverlauf einer Probenspur ausgedruckt.

Für die qualitative und quantitative Auswertung wurden Probenmuster, die sich von den anderen Mustern unterschieden, nochmals aus den betreffenden Mikrotiterplatten herausgesucht und erneut getestet. Bestätigte sich das Muster, entnahm man im Landesuntersuchungsamt Dillenburg eine weitere Probe der entsprechenden Guthrie-Karte für eine Nachtestung. Im Fall der Reproduzierbarkeit des Ergebnisses galt die Probe als potentielle Variante.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Auswertung

3.1.1. Definition qualitative Varianten

In der vorliegenden Untersuchung war es möglich, mit der HIEF verschiedene Globine aufzutrennen. Die Auftrennung führte zu charakteristischen, scharf begrenzten Banden im Gel (s. **Abbildung 2**). Anhand der Position der Banden konnten Varianten der einzelnen Globinketten im Vergleich mit Normbanden identifiziert werden.

Als qualitative Varianten wurden Bandenmuster abweichend vom üblichen Fokussierungsverhalten bezeichnet. Ladungsvarianten wurden dann angenommen, wenn eine deutliche pH-Differenz zu den regelrecht fokussierten Normbanden bestand (s. **Abbildung 2B**). Da die aufgefallenen Varianten nicht auf DNA-Ebene sequenziert und bewiesen wurden, wählten wir für diese abweichenden Banden die Bezeichnung potentielle Varianten.

Von insgesamt 4038 mit der HIEF-Methode untersuchten Proben fielen zunächst 20 als potentielle qualitative Varianten auf. Nach Bestätigung des Befundes durch eine Wiederholung der HIEF wurden die optisch auffälligen Pro-

teinbanden als potentielle Globinvarianten eingestuft. Bei Wiederholung der HIEF bei den auffälligen Proben, mit neuem Material aus den Guthrie-Testkarten, konnten zwei der potentiellen qualitativen Varianten nicht bestätigt werden. So wurde in der Auswertung von 18 auffälligen Proben ausgegangen (s. **Abbildung 2B** und **Tabelle 1**).

3.1.2. Zuordnung der potentiellen Varianten

Die Zuordnung der Globinvarianten erfolgte über die Lokalisation der potentiellen Variante in Relation zu Normbanden (β , A_vI, A_vT, G_v) im Gel unterstützt durch die densitometrische Auswertung der potentiellen Varianten. Bei der Densitometrie der auffälligen Probenspur zeigte sich im Vergleich zum Flächenanteil des normalen Musters häufig eine Flächenabnahme der normal fokussierten Bande, so daß hier eine Zuordnung der auffälligen Bande möglich war.

Folgende Zuordnung wurde daher vorgenommen (s. auch **Tabelle 1**):

- Im Bandenmuster der *Probe 1* lag die auffällige Bande benachbart zur β -Bande und wurde als eine potentielle Variante der β -Globinkette gewertet. Der gemeinsame Flächenwert der β -Bande mit der benachbarten Bande betrug 28,7% bei einem Mittelwert des Probenumfangs für die β -Bande von 25,5% bei einer Standardabweichung von $\pm 5,7\%$.
- Im Bandenmuster der *Probe 2* lag die auffällige Bande ebenfalls in Nähe zur β -Bande, so daß eine potentielle Variante der β -Globinkette vermutet wurde. Der gemeinsame Flächenwert betrug 24,5%.

- Im Bandenmuster der *Probe 3 und 4* konnten keine spezifischen Auffälligkeiten der Bandenlokalisierung im Gel festgestellt werden. Es bestand aber eine Verminderung der jeweiligen β -Bande. Der gemeinsame Flächenwert bei der Probe 3 betrug 26,2% und bei der Probe 4 lag er bei 36,0%, so daß potentielle Ladungsvarianten der β -Globinketten angenommen wurden.
- Im Bandenmuster der *Probe 5* konnte ebenfalls keine spezifische Auffälligkeit der Bandenlokalisierung im Gel festgestellt werden. Auffällig war jedoch der verminderte Flächenanteil der Bande des A_{γ} I-Globins. Das deutet auf eine potentielle Ladungsvariante der A_{γ} I-Globinkette bei dieser Probe hin.
- In den Bandenmustern der *Proben 6-8* konnten ebenfalls keine spezifischen Auffälligkeiten der Bandenlokalisierung im Gel festgestellt werden. Aufgrund des Fokussierungsverhaltens gehen wir bei diesen Proben von potentiellen Ladungsvarianten aus, ohne daß eine Zuordnung zu einer bestimmten Bande möglich ist.
- In den Bandenmustern der *Proben 9-13* lagen die auffälligen Banden benachbart zur G_{γ} -Bande. Der densitometrisch bestimmte gemeinsame Flächenwert lag zwischen 45,8 und 58,7% bei einem sonst nachgewiesenen G_{γ} -Mittelwert von 45,6% mit einer Standardabweichung von $\pm 4,8\%$. Das deutet auf eine potentielle Variante der G_{γ} -Globinkette bei diesen Proben hin.
- Im Bandenmuster der *Probe 14* lag die auffällige Bande in Nähe zur G_{γ} -Bande. Bei Betrachtung zeigt sich eine Verminderung des Flächenanteils der A_{γ} I-Bande, der gemeinsame Flächenwert betrug 24% bei sonst nachzuweisendem A_{γ} I-Mittelwert von 24,6% mit einer Standardabweichung von $\pm 4,2\%$. Das deutet auf eine potentielle Variante der A_{γ} I-Globinkette bei dieser Probe hin.

- Im Bandenmuster der *Probe 15* konnte keine spezifische Auffälligkeit der Bandenlokalisierung im Gel festgestellt werden. Eine Abnahme der G_{γ} -Bande deutet auf eine potentielle Variante der G_{γ} -Globinkette bei dieser Probe hin, densitometrisch wurde eine gemeinsame Fläche von 59% bestimmt.
- Im Bandenmuster der *Probe 16* lag die auffällige Bande in Nähe zur G_{γ} -Bande. Es zeigte sich aber auch eine Verminderung des Flächenanteils der A_{γ} I-Bande, die gemeinsame Fläche der Variante mit der A_{γ} I-Bande betrug 25,9%. Das deutet auf eine potentielle Variante der A_{γ} I-Globinkette bei dieser Probe hin.
- Im Bandenmuster der *Probe 17* lag die auffällige Bande in der Nähe zur üblichen A_{γ} T-Bande und wurde daher als eine potentielle Variante der A_{γ} T-Globinkette gewertet.
- In den Bandenmustern der *Probe 18* konnten keine spezifischen Auffälligkeiten der Bandenlokalisierung im Gel festgestellt werden. Insgesamt besteht jedoch ein Hinweis auf potentielle Ladungsvarianten bei dieser Probe, ohne daß eine Zuordnung zu einer bestimmten Bande möglich ist.
- Das Bandenmuster der *Probe 19* stellte keine Variante dar.

Tabelle 1: Zusammenfassung der gefundenen 18 potentiellen qualitativen Globinvarianten

-
- 2 Varianten der β -Globinkette (Probe 1 und 2)
 - 2 Ladungsvarianten der β -Globinkette (Probe 3 und 4)
 - 2 Varianten der $A_{\gamma}I$ -Globinkette (Probe 14 und 16)
 - 1 Ladungsvariante der $A_{\gamma}I$ -Globinkette (Probe 5)
 - 1 Variante der $A_{\gamma}T$ -Globinkette (Probe 17)
 - 6 Varianten der G_{γ} -Globinkette (Probe 9-13 und 15)
 - 4 Ladungsvarianten ohne Zuordnung (Probe 6-8 und 18)
-

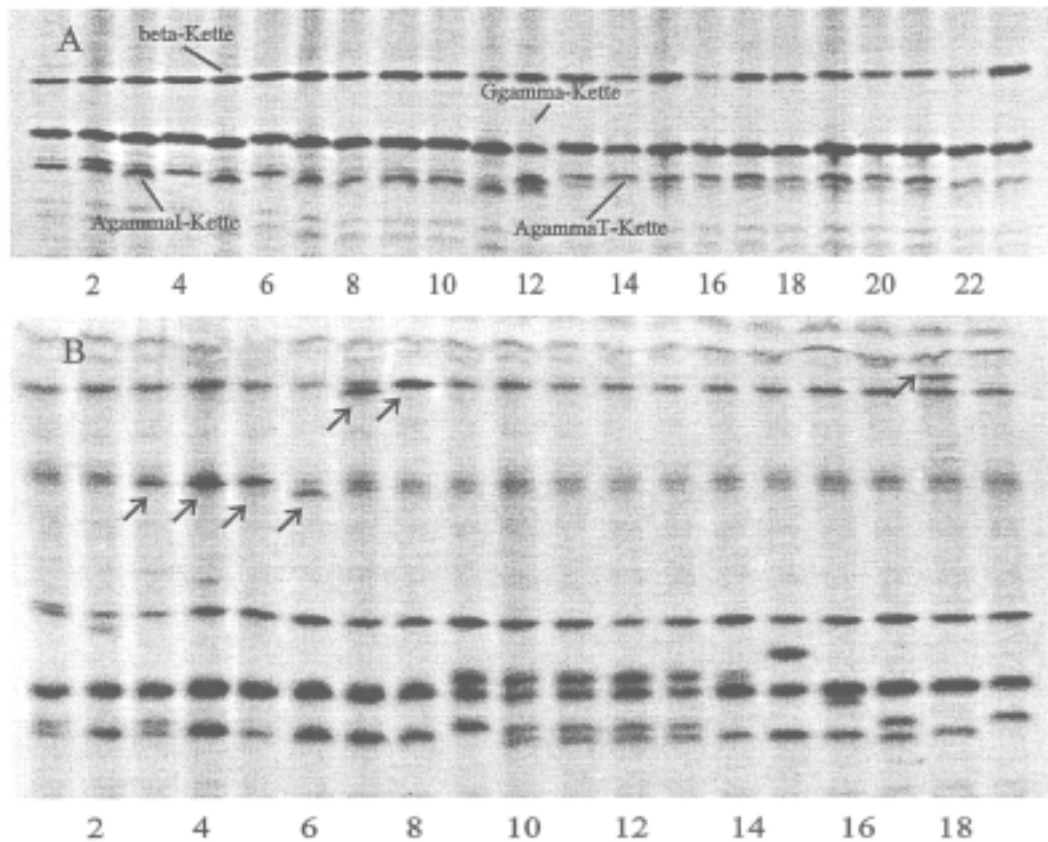


Abbildung 2, A und B: Im gesamten HIEF-Screening aufgefallene potentielle quantitative Varianten des A_{γ} -Globin-Polymorphismus und qualitative Varianten der β - und γ -Globine. Beide Gele hatten einen immobilisierten pH-Gradienten von pH 6,3-10,5 und waren im pH-Bereich 7,48-7,64 auf 0,04 pH/cm abgeflacht.

A: Potentielle quantitative Varianten des A_{γ} -Globin-Polymorphismus. Der Probenauftrag erfolgte von links nach rechts mit zunehmenden A_{γ} T-Anteil am Quotienten A_{γ} T-Globin/Gesamt- A_{γ} -Globin. Probe 2 stellte sich in der letzten Kontrolle heterozygot unauffällig dar und konnte daher nicht weiter als quantitative Variante betrachtet werden. Der Proband von Probe 14 stellte sich als homozygot für A_{γ} T-Globin heraus, so daß diese Probe ebenfalls nicht weiter als Variante betrachtet wurde.

B: Potentielle qualitative Varianten der β - und γ -Globine. Es sind insgesamt 18 potentielle Varianten dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen potentielle Ladungsvarianten. Probe 19 stellte keine Variante dar.

3.1.3 Darstellung des A_{γ} -Polymorphismus

Die 4038 untersuchten Proben von Neugeborenen aus Hessen lassen sich nach ihrem Phänotyp unterteilen. Das Ergebnis stellt sich folgendermaßen dar:

- 2519 Homozygote für $A_{\gamma}I$
- 3 potentielle $A_{\gamma}I$ -Varianten
- 196 Homozygote für $A_{\gamma}T$
- 1 potentielle $A_{\gamma}T$ -Variante
- 1319 Heterozygote $A_{\gamma}I/A_{\gamma}T$

Die Auswertung der quantitativen Ergebnisse ergaben einen $A_{\gamma}T$ -Anteil von 45,9% ($\pm 3,8\%$) der A_{γ} -Gesamtmenge.

3.1.4. Bestimmung der Allelfrequenzen des A_{γ} -Polymorphismus

Allelfrequenzen können mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz bestimmt werden. Die Allelfrequenz ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Allels im Verhältnis zu seinen außerdem vorkommenden Allelen. Wenn die Häufigkeit eines Gens mit p und die Häufigkeit seines Allels mit q gleichgesetzt wird, gilt $p+q=1$. Genfrequenzen werden als Bruchteil von 1 angegeben.

Die 4038 untersuchten Proben Neugeborener aus Hessen unterteilen sich nach ihrem Phänotyp in 2519 Homozygote für $A_{\gamma}I$, 3 potentielle Varianten für $A_{\gamma}I$, 196 Homozygote für $A_{\gamma}T$, 1 potentielle Variante $A_{\gamma}T$ und 1319 Heterozygote $A_{\gamma}I$ und $A_{\gamma}T$.

Die Genfrequenz für $A_{\gamma}T$ lässt sich aus der Summe aller Allele für $A_{\gamma}T$ ($2 \times 196 + 1 + 1319 = 1712$) dividiert durch die Summe der Allele $A_{\gamma}I$, $A_{\gamma}T$ sowie der potentiellen Varianten ($6360 + 1712 + 3 + 1 = 8076$) berechnen. Die Genfrequenz für $A_{\gamma}T$ liegt demnach bei 0,212.

3.2 Quantitative Auswertung

3.2.1 Definition quantitativer Varianten

Im Gegensatz zu qualitativen Varianten, die durch das bloße Vorliegen der exprimierten Genprodukte nachgewiesen werden, lässt der Nachweis quantitativer Varianten aufgrund der Menge des exprimierten Genprodukts Rückschlüsse auf die genetische Variabilität zu. Damit ist der Nachweis einer quantitativen Variante ebenso wie der Nachweis einer qualitativen Variante ein Indikator für das Vorliegen einer Änderung im Erbgut.

Zum Nachweis quantitativer Varianten wurden die Globine, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, gefärbt und einer densitometrischen Messung unterzogen. Dabei war jede Bande im Gel in der Auswertung durch einen Peak an charakteristischer Stelle repräsentiert. Die Fläche unter der Kurve verhielt sich proportional zur Menge der nachgewiesenen Substanz im Gel. Damit war ein quantitativer Nachweis des exprimierten Genprodukts möglich.

3.2.2 Darstellung quantitativer Varianten

Nur Gele, deren Proben im Gel geradeaus gewandert, nicht ineinander gelaufen und gut fokussiert waren, konnten im Screening berücksichtigt werden. Von den auf 86 Gelen gelaufenen 4038 Proben eigneten sich insgesamt 3280 Probenspuren von 75 Gelen für die densitometrische Auswertung. In der **Abbildung 3** wird die densitometrische Auswertung einer Probenspur gezeigt.

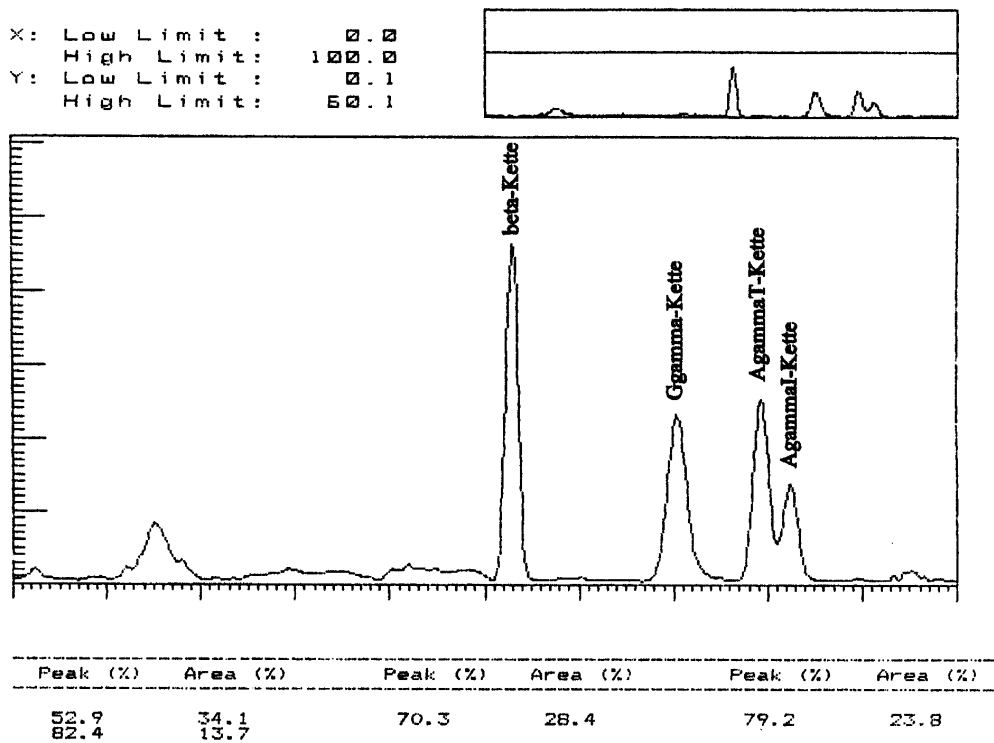


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt das vom Computer ausgegebene Ergebnis der densitometrischen Auswertung einer Probenspur. Die graphische Darstellung zeigt die ausgewerteten Flächen. Die nachfolgende Tabelle gibt die Lokalisation nach Basislinienkorrektur (Peak %) der ausgewerteten Peaks auf der in % unterteilten x-Achse sowie die Fläche (Area %) der ausgewerteten Peaks als prozentualen Anteil der Gesamtfläche aller ausgewerteten Peaks wieder.

Die densitometrische Auswertung bezog sich zum einen auf das Verhältnis G_{γ} -Globin zu Gesamt- γ -Globin und zum anderen auf das Verhältnis unter den Proben, die heterozygot bezüglich $A_{\gamma}T$ -Globin und $A_{\gamma}I$ -Globin waren. Die qualitativen Varianten wurden aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Von jedem Gel wurden von allen ausgewerteten Probenspuren (max. 48) der Mittelwert und die Standardabweichung für die Quotienten G_{γ} -/Gesamt- γ -Globin und $A_{\gamma}T$ /Gesamt- A_{γ} -Globin bestimmt. Aus den Mittelwerten und Standardabweichungen aller Gele wurde ein Gesamt-Mittelwert und eine Gesamt-Standardabweichung ermittelt. Zur Identifizierung der quantitativen Varianten wurden Gesamt-Mittelwert und Gesamt-Standardabweichung zugrunde gelegt. Dabei blieben Proben mit einem standardisierten Dichtewert größer als $\pm 4,0$ ohne Berücksichtigung.

Als potentielle quantitative Varianten wurden Proben bezeichnet, die außerhalb einer Standardabweichung von $\pm 3,75\%$ vom Mittelwert lagen. Sind bestimmte Probenmuster aufgefallen, so wurden die Eluate erneut untersucht. Konnte eine potentielle Variante festgestellt werden, wurde im positiven Fall nochmals eine Blutprobe der Guthrie-Testkarte entnommen. Gelang in diesem dritten Test erneut der Nachweis, sah man die Probe als potentielle quantitative Variante an.

Da eine Bestätigung der aufgefallenen Proben auf molekularer Ebene nicht erfolgte, wurden die quantitativ abweichenden Proben als potentielle quantitative Varianten bezeichnet.

In **Abbildung 4** wird ein Screening-Gel im direkten Vergleich zur graphischen Darstellung der Daten gezeigt.

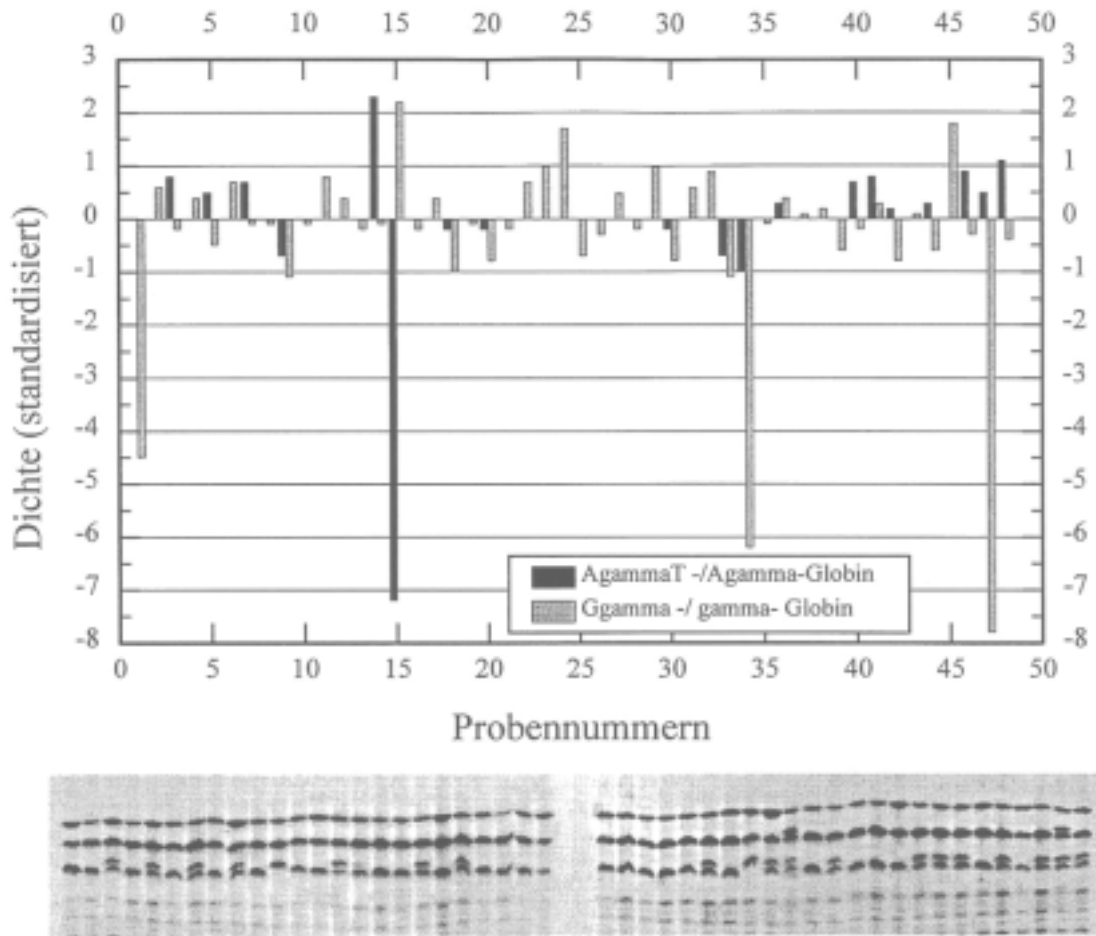


Abbildung 4: Der untere Teil der Darstellung zeigt ein quantitatives Screening-Gel mit 48 Probenspuren. Die darüber liegende Graphik zeigt die Auswertung der densitometrischen Messungen dieser 48 Probenspuren als transformierte (standardisierte) Dichtewerte. Für jede Probe ist sowohl der Quotient G_{γ}/γ -Globin (grau) als auch der Quotient A_{γ}/A_{γ} -Globin (schwarz) in der Graphik wiedergegeben. Jeweils eine potentielle qualitative G_{γ} -Variante ist in Spur 34 und Spur 47 zu sehen.

3.2.3 Auswertung des G_{γ} - zu Gesamt- γ -Verhältnisses

Die Gesamtdichte der γ -Globinbanden setzte sich aus den Dichtewerten der G_{γ} - und der A_{γ} -Globinbande zusammen. Der Anteil der G_{γ} -Globinbande an der Gesamtdichte der γ -Globinbanden wurde im Rahmen der densitometrischen Auswertung berechnet. Die auf diese Weise transformierten und gerundeten densitometrischen Werte wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt (s. **Abbildung 5**).

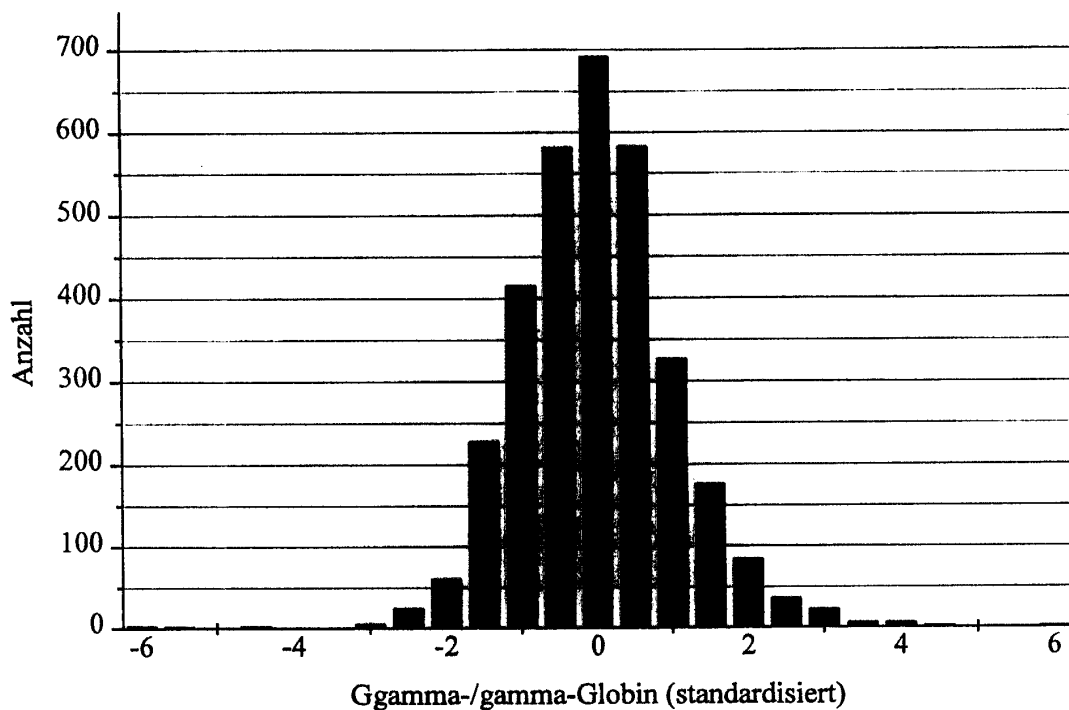


Abbildung 5: Das Säulendiagramm beinhaltet Häufigkeitsverteilung der Quotienten nach Transformierung (Standardisierung) der densitometrischen Daten. Der Anteil des G_{γ} -Globins am Gesamt- γ -Globin, bestehend aus G_{γ} -Globin und A_{γ} -Globin, ist dadurch ersichtlich. Auf der x-Achse ist der transformierte (standardisierte) Quotient G_{γ} -/Gesamt- γ -Globin eingetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der entsprechenden Proben eingetragen. Der Stichprobenumfang betrug 3280. Der gesamte Probenumfang lag der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung zugrunde. Dabei wurden transformierte (standardisierte) Dichtewerte von $\pm 4,0$ ausgeschlossen. Der Mittelwert lag bei 61,2%, die Standardabweichung lag bei $\pm 3,8\%$. Im quantitativen Screening fielen 25 Proben auf, deren G_{γ} größer bzw. kleiner als 3,75% Standardabweichung waren. Reproduzierbar und als potentielle quantitative Varianten eingestuft wurden 20 Proben (**Abbildung 6**).

Die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung erfolgte aus dem gesamten Probenumfang. Dabei wurden allerdings diejenigen Proben ausgeschlossen, deren transformierte Dichtewerte $\pm 4,0$ betrug. Damit ergab sich für die Dichte der G_{γ} -Bande der Mittelwert 61,2% (Flächenanteil der densitometrischen Messung) mit einer Standardabweichung von $\pm 3,8\%$. Bei den statistischen Auswertungen von 3280 densitometrierten Proben fielen insgesamt 25 Proben auf, die außerhalb einer Standardabweichung von $\pm 3,75\%$ lagen.

Von diesen 25 Proben wiesen 13 Proben einen erniedrigten und 12 Proben einen erhöhten G_{γ} -Anteil auf. In der anschließenden Kontrolle waren 20 Proben reproduzierbar und wurden als potentielle quantitative Varianten eingestuft, wobei 9 Proben einen erniedrigten und 11 Proben einen erhöhten G_{γ} -Anteil aufwiesen. Die **Abbildung 6** zeigt die im Screening aufgefallenen quantitativen G_{γ} - und A_{γ} -Varianten. In **Abbildung 7** sind exemplarisch vier Proben mit ihrer densitometrischen Auswertung graphisch dargestellt.

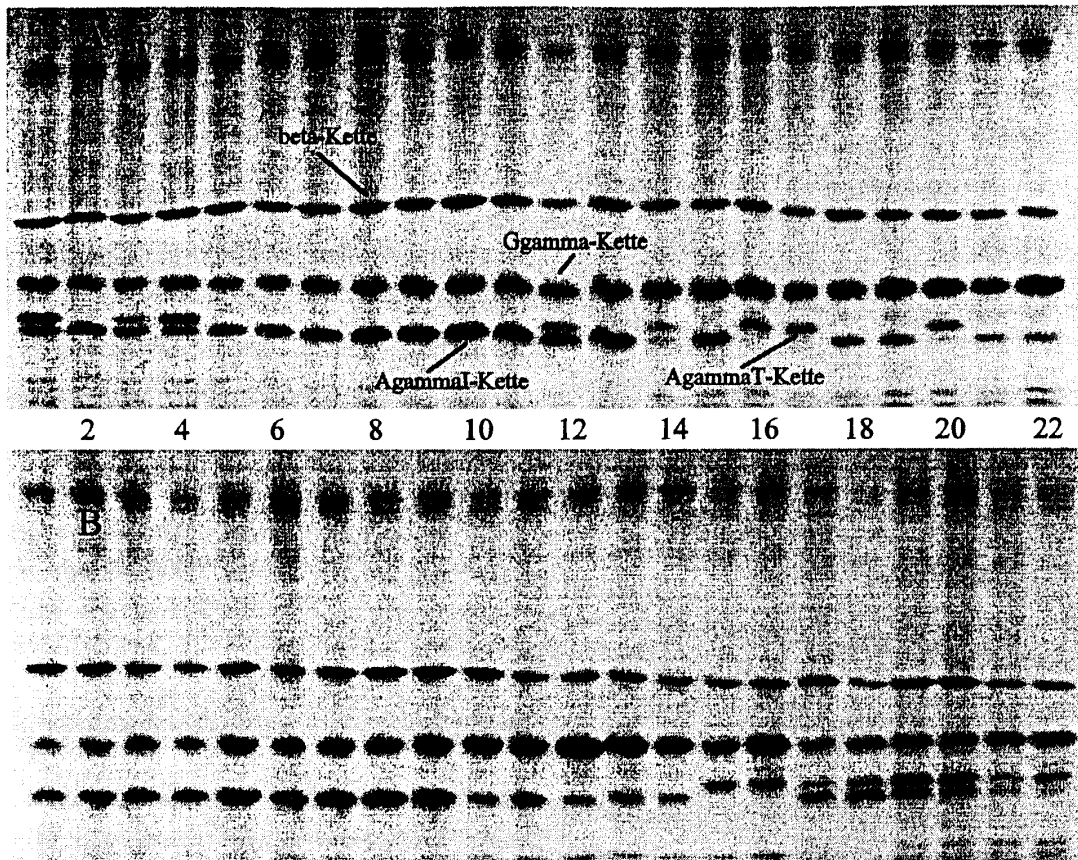


Abbildung 6, A und B: Die beiden abgebildeten Gele zeigen die im Screening aufgefallenen quantitativen Varianten der G_γ -Globine bzw. A_γ -Globine.

A: Bei diesem Gel erfolgte der Probenauftrag von links nach rechts mit zunehmendem densitometrisch nachgewiesenen G_γ -Anteil. Die Proben 15 und 17 in **Abb. A** (=Proben 11 und 15 in **Abb. B**) fielen beim Vergleich mit den transformierten Dichtewerten der G_γ -Banden von jeweils +1,5 als nicht mehr erhöht auf.

B: Hier kommen dieselben Proben zur Darstellung, die Proben sind jedoch in der Reihenfolge der Phänotypen auf das Gel aufgetragen.

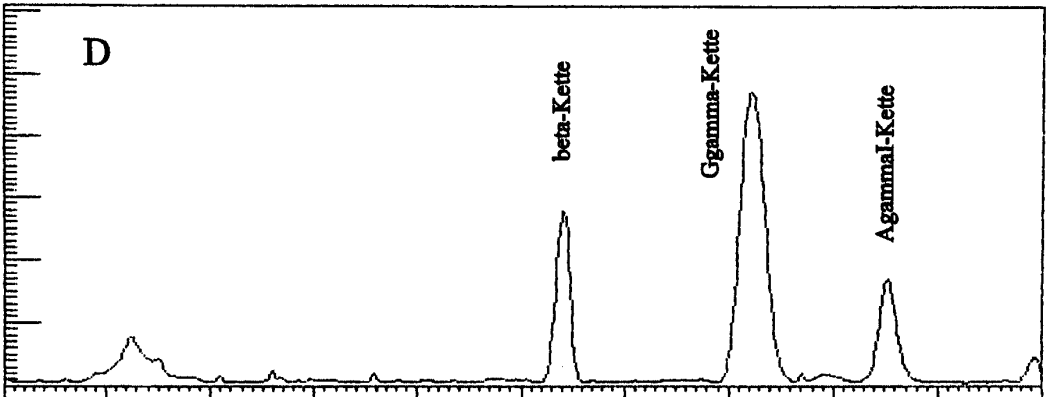
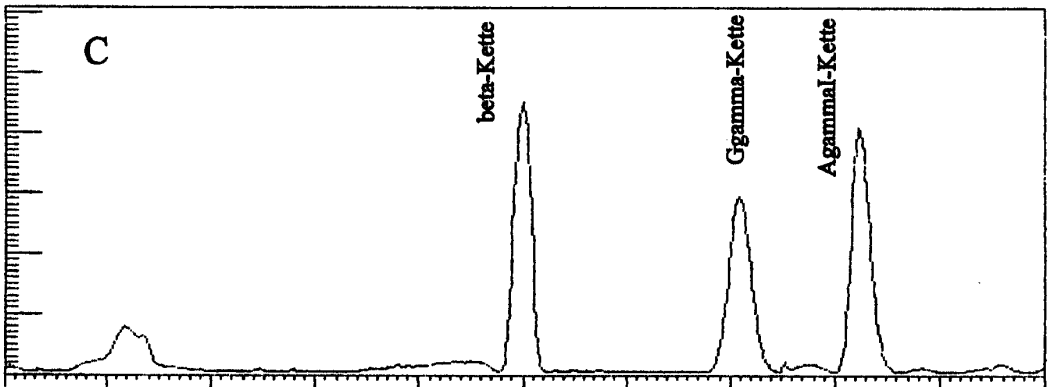
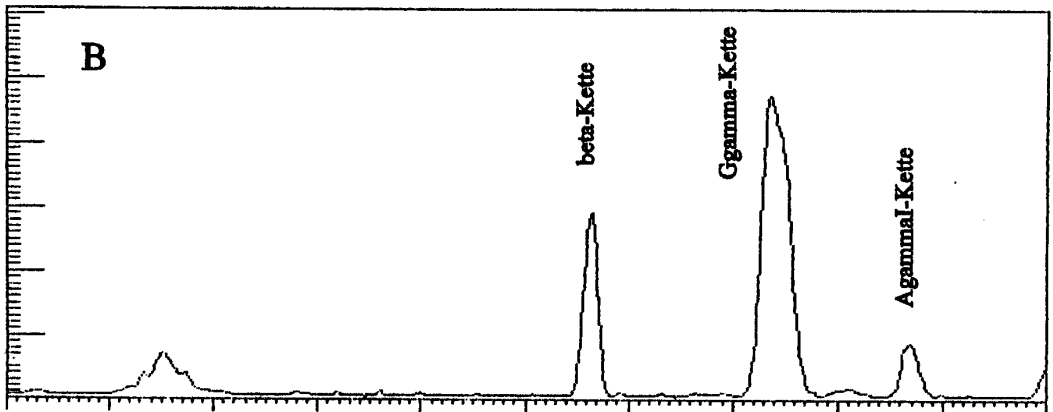
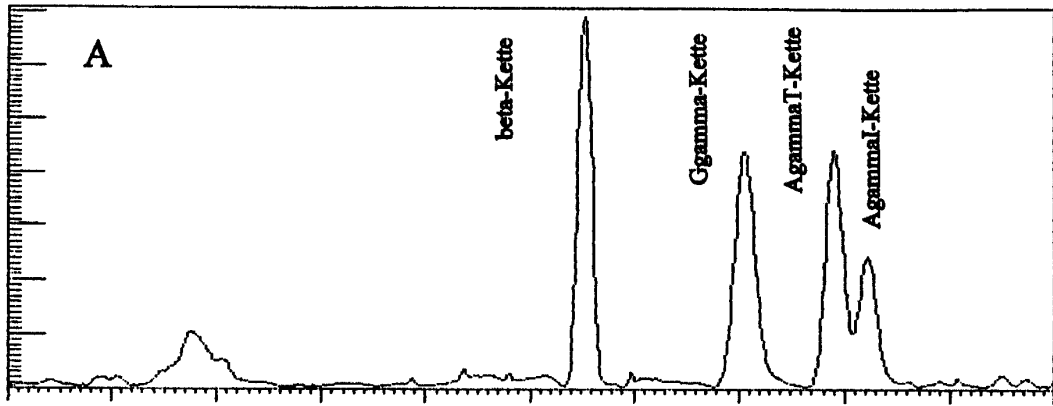


Abbildung 7, A-D: Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der in Abbildung 6 dargestellten quantitativen G_γ/A_γ -Varianten. Die Darstellung verdeutlicht die Quantitätsunterschiede der einzelnen Globinbanden. Der Berechnung liegen die unter den gekennzeichneten Peaks liegenden Flächen zugrunde.

A: diese Probe (Probe 1 der **Abb. 6A**) wies im Screening einen transformierten (standardisierten) Dichte-Wert der G_γ -Bande von -6,0 auf.

B: diese Probe (Probe 22 **Abb. 6A**) wies im Screening einen transformierten (standardisierten) Dichtewert der G_γ -Bande von +6,0 auf.

C: diese Probe (Probe 10 **Abb. 6A**) wies im Screening einen transformierten (standardisierten) Dichtewert der G_γ -Bande von -4,5 auf.

D: diese Probe (Probe 19 **Abb. 6A**) wies im Screening einen transformierten (standardisierten) Dichtewert der G_γ -Bande von +4,5 auf.

3.2.4 Auswertung des $A_\gamma T$ - zu Gesamt- A_γ -Verhältnisses

In der gesamten Stichprobe des quantitativen Screenings fanden sich 1039 Heterozygote für $A_\gamma I$ und $A_\gamma T$. In der statistischen Auswertung wurde der Anteil des $A_\gamma T$ -Globins am Gesamt- A_γ -Globin errechnet. Die durch Standardisierung erzielten Häufigkeitswerte wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt (s. **Abbildung 8**).

Aus den 1039 heterozygoten Proben erfolgte die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Ausgeschlossen waren dabei die Proben, deren transformierte Dichtewerte $\pm 4,0$ betragen. Für das Globin $A_\gamma T$ betrug der Mittelwert 45,9% bei einer Standardabweichung von $\pm 3,8\%$.

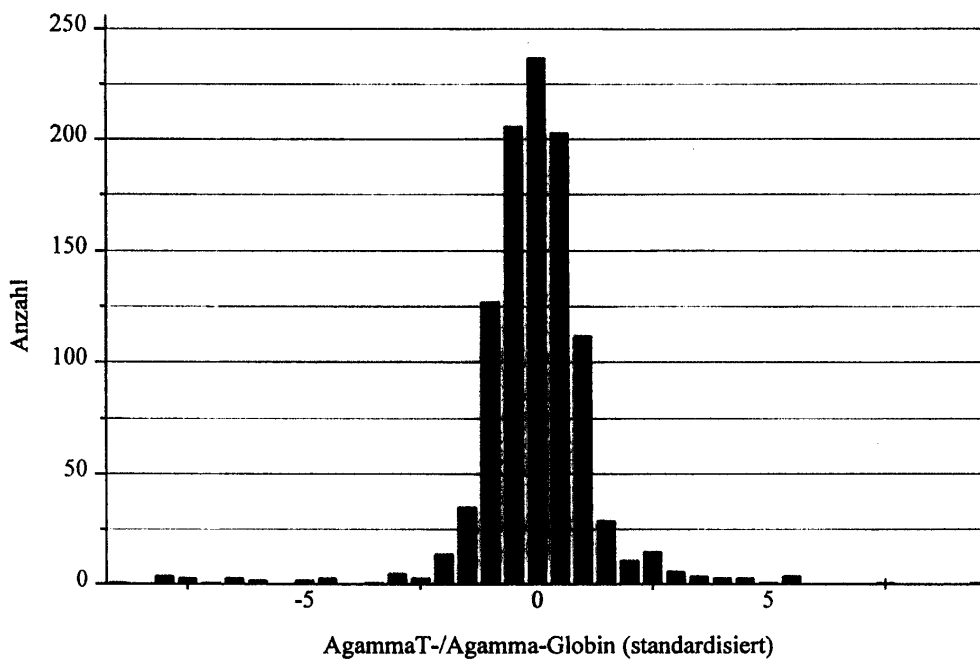


Abbildung 8: Das Säulendiagramm beinhaltet die Häufigkeitsverteilung der Quotienten nach Transformierung (Standardisierung) der densitometrischen Daten. Der Anteil des $A_{\gamma}T$ -Globinanteils am Gesamt- A_{γ} , bestehend aus $A_{\gamma}T$ und $A_{\gamma}I$, ist dadurch ersichtlich. Auf der x-Achse ist der transformierte (standardisierte) Quotient $A_{\gamma}T$ /Gesamt- A_{γ} -Globin eingetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der entsprechenden Proben eingetragen. Der Stichprobenumfang umfaßte 1039 heterozygote Proben. Der Berechnung wurden Mittelwert und Standardabweichung des gesamten Probenumfangs zugrunde gelegt. Ausgeschlossen waren die transformierten Dichtewerte, die außerhalb $\pm 4,0$ lagen. Der Mittelwert betrug 45,9% bei einer Standardabweichung von $\pm 3,8\%$. Im quantitativen Screening fielen 31 Proben auf, deren $A_{\gamma}T$ -Anteil kleiner oder größer 3,75% Standardabweichung war und als potentielle Varianten eingestuft werden konnten. Von diesen potentiellen Varianten waren 21 Proben reproduzierbar (s. **Abb. 2A**).

Bei der statistischen Auswertung waren insgesamt 31 Proben auffällig, davon hatten 18 erniedrigte Werte für das $A_{\gamma}T$ -Globin und 13 hatten erhöhte Werte für das $A_{\gamma}T$ -Globin. In Kontrolluntersuchungen waren 21 Proben reproduzierbar, davon 10 Proben mit erniedrigten und 11 mit erhöhten Werten für das $A_{\gamma}T$ -Globin. Die **Abbildung 9 A-D** zeigt ausgewählte Densitogramme von Proben der in **Abbildung 2 A** gezeigten quantitativen Varianten des $A_{\gamma}T$ -Globins im Verhältnis Gesamt A_{γ} -Globin (s. **Abbildung 9**).

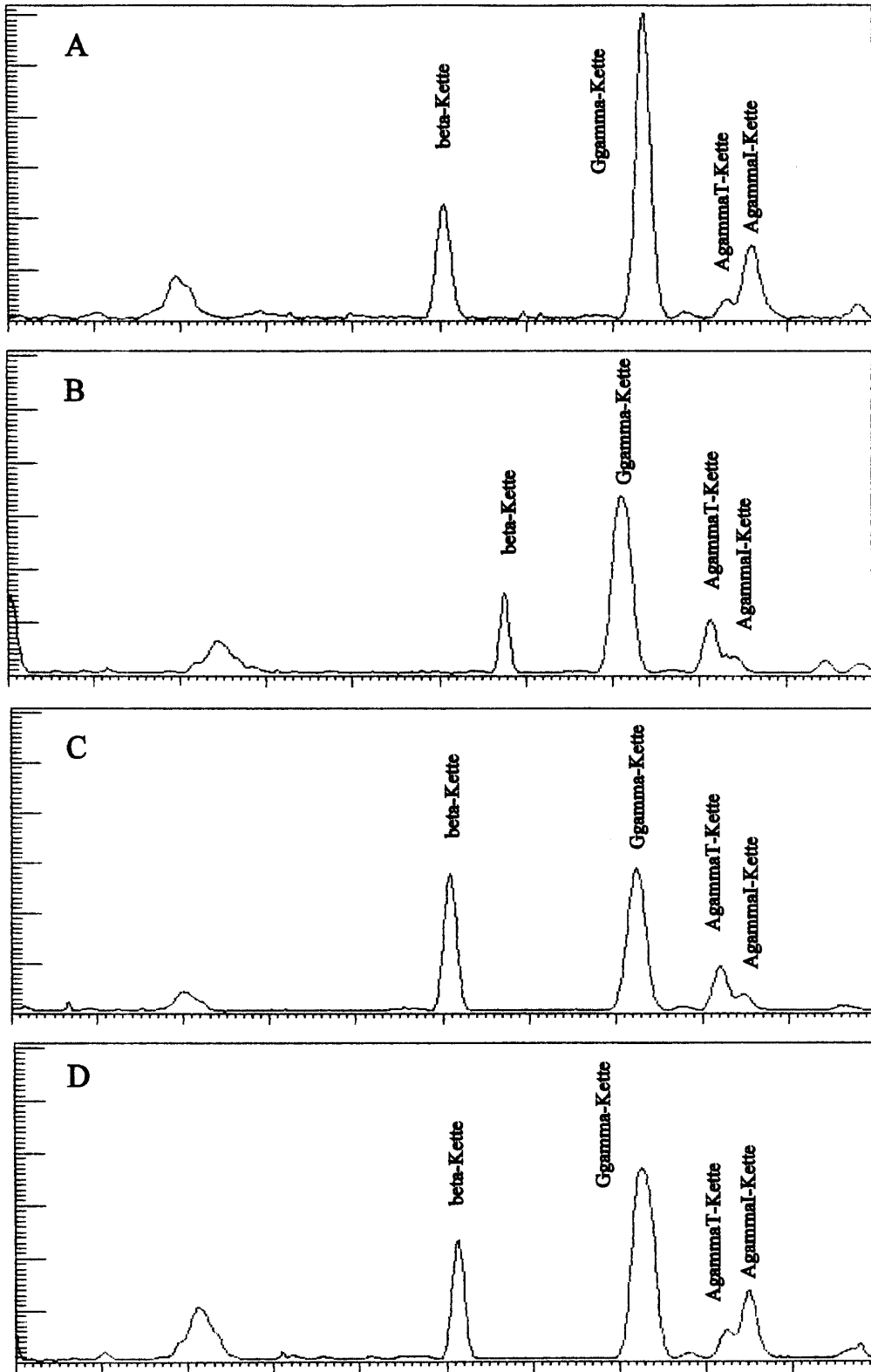


Abbildung 9, A-D: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von vier in **Abbildung 2A** gezeigten quantitativen Varianten des A_γT-Globins im Verhältnis zum A_γ-Globin.

A: Diese Probe (Probe 1 in **Abb. 2A**) fiel im Screening durch einen standardisierten Dichtewert von -8 hinsichtlich A_γT-Globin auf.

B: Diese Probe (Probe 22 in **Abb. 2A**) war mit einem standardisierten Dichtewert von +7,5 hinsichtlich des A_γT-Globins in der densitometrischen Auswertung auffällig.

C: Diese Probe (Probe 13 in **Abb. 2A**) fiel mit einem standardisierten Dichtewert von +5 hinsichtlich des A_γT-Globins in der densitometrischen Auswertung auf.

D: Diese Probe (Probe 11 in **Abb. 2A**) war mit einem standardisierten Dichtewert von -4 hinsichtlich des A_γT-Globins in der densitometrischen Auswertung auffällig.

3.2.5 Reproduzierbarkeit der densitometrischen Auswertung

Die Reliabilität der quantitativen Auswertungsergebnisse wurde durch Berechnung des Variationskoeffizienten nachgewiesen. Die Berechnung des Variationskoeffizienten erfolgte zum einen durch erneute Dichtemessung des gleichen Gels und zum anderen durch Dichtemessung der gleichen Proben auf verschiedenen Gelen.

Im Fall der wiederholten Messung des gleichen Gels betrug der durchschnittliche Variationskoeffizient 1,8%. Hierbei wurde das gleiche Gel an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zweimal nacheinander densitometriert.

Im Fall der wiederholten Messung gleicher Proben auf insgesamt vier verschiedenen Gelen wurden jeweils zwei Gele an einem Tag untersucht. Auf diese Weise konnten die Gele mit dem gleichen Ansatz Rehydratationslösung und die Proben mit dem gleichen Ansatz Inkubationslösung behandelt werden.

Für die Messung der Proben gleicher Probanden auf verschiedenen Gelen wurde ein Variationskoeffizient von durchschnittlich 4,6% festgestellt. Die Variationskoeffizienten belegen damit eine gute Reliabilität der Methode.

4. Diskussion

4.1 Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur Identifizierung qualitativer und quantitativer Varianten

Die Separation der humanen Globinketten ist eine Schlüsseltechnik für die Untersuchung der Hämoglobinopathien. Zu den diagnostischen Methoden, welche die qualitative und quantitative Untersuchung von Hämoglobinopathien gewährleisten, zählen die traditionelle Elektrophorese, die isoelektrische Fokussierung (IEF), die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) sowie deren Weiterentwicklung, die Umkehrphasen-Hochleistungs-Chromatographie (RHPLC).

Die traditionelle Elektrophorese im alkalischen (pH 8,2) und sauren Milieu (pH 6,2) galt lange als Standardmethode in der Diagnostik der Thalassämien und der Hämoglobinopathien (Fairbanks 1980). Sie ist die Methode der Wahl zur Identifikation und Quantifizierung von HbS. Durch kommerzielle Testsysteme ist durch Anfärben der Banden eine qualitative und durch Densitometrie eine quantitative Diagnostik möglich. Der Nachteil der Methode liegt darin, daß viele bekannte Hämoglobinvarianten sich nicht trennen lassen, außerdem ist bei niedrigen Probenkonzentrationen für die quantitative Auswertung keine gute Reproduzierbarkeit gegeben. Die Hb A₂-Bestimmung durch Elektrophorese ist im Vergleich zur HPLC unpräzise (Papadea u. Cate 1996). Im Vergleich zu den anderen Techniken ist sie sehr arbeits- und zeitintensiv.

Bei der Identifizierung zum Screening für Genträger sollten in der ersten Untersuchungsreihe MCV- und MCH-Bestimmungen und eine Hb-Elektrophorese

durchgeführt werden. Potentielle Genträger für α - und β -Thalassämie sowie HbS- und HbC-Träger können so identifiziert werden. Kombinierte α - und β -heterozygote Genträger mit normalen Erythrozytenindizes können übersehen werden (Cao u. a. 1994). In Populationen, in denen sowohl α - als auch β -Thalassämien häufiger vorkommen, sollte durch Elektrophorese oder HPLC eine HbA₂-Bestimmung vorgeschaltet werden. Letzteres hat den Nebeneffekt, daß HbA₂ und HbF nicht nur quantitativ bestimmt, sondern auch verschiedene Hb-Varianten entdeckt werden können (Galanello u. a. 1995).

Die von Comi und Mitarbeitern (1979) entwickelte IEF ermöglichte durch Zusatz von Nonidet P-40 die Auftrennung von α -, β -, G _{γ} - und A _{γ} -Globinketten. Die quantitative Auswertung wurde dann mit radioaktiv markiertem Probenmaterial durchgeführt. Die IEF stellt eine gute und zuverlässige Methode zur qualitativen und quantitativen Hb-Diagnostik dar. Die Methode ist sehr zeit- und arbeitsaufwendig, zeigt aber eine deutlich verbesserte Auflösung gegenüber der Elektrophorese (Turpeinen u. a. 1995; Campell u. a. 1999).

Die Weiterentwicklung der konventionellen isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit immobilisierten pH-Gradienten führte zur Kombination des rehydratierten immobilisierten pH-Gradienten mit Trägerampholyten. Diese Methode wurde als Hybrid-iselektrische Fokussierung (HIEF) bezeichnet (Altland u. Rossmann 1985b; Fawcett u. Chrambach 1985; Rimpilainen u. Righetti 1985). Das Ergebnis war eine durch die Leitfähigkeitserhöhung ermöglichte Reduktion der Trennzeit mit gleichzeitiger Reduktion der Gefahr einer Proteinmodifikation. Außerdem erhöhte die Zugabe der Trägerampholyte die Ionenkonzentration und damit die Probenlöslichkeit.

Durch Alter und Mitarbeiter (1980) wurde die von Rovera u. a. (1978) entwickelte Triton X-100-Säure-Harnstoff-Elektrophorese modifiziert. Synthesestudien wurden mit ³H-Leucin-markiertem Probenmaterial durchgeführt, die erstellten Fluorogramme densitometrisch ausgewertet.

Mit der HPLC-Methode von Huisman und Mitarbeitern (1981a) konnten die drei γ -Globinketten des fetalen Hämoglobins separiert werden. Die Trennung und quantitative Auswertung läuft bei dieser Technik in einem Schritt. Die heute zur Verfügung stehenden automatisierten HPLC-Programme zur genauen quantitativen Erfassung normaler und abnormaler Hämoglobine erlauben bei geringem Zeitaufwand in der Vielzahl der Fälle, unter Berücksichtigung der Grenzen der Methode, eine korrekte Diagnose (Fisher u. a. 1997; Fucharoen u. a. 1998).

Mit Hilfe des RHPLC-Verfahrens bei niedrigem pH gelang es Shelton und seinen Mitarbeitern (1979) die Trennung von G_γ - und A_γ -Ketten. Eine Weiterentwicklung seinerseits (Shelton u. a. 1979, 1984) führte auch zur Darstellung des A_γ -Polymorphismus mit Auftrennung in $A_{\gamma I}$ - und $A_{\gamma T}$ -Ketten, bei angeschlossener quantitativer Auswertung.

Die Vorteile, welche früher die HIEF im Vergleich zu den chromatographischen Methoden auszeichneten, wie beispielsweise der Einsatz kleinerer Probenmengen oder die größere Unempfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen, sind durch Weiterentwicklungen heutzutage zu vernachlässigen. Vorteile, welche heute die HIEF gegenüber der HPLC und der RHPLC bietet, bestehen darin, daß mit der HIEF viele Proben gleichzeitig unter identischen Bedingungen und nicht hintereinander untersucht werden können. Früher konnten mit RHPLC pro Tag und Gerät lediglich 3-4 Proben ausgewertet werden (Huisman u. a. 1981b), mittlerweile ist durch Automatisierung die Untersuchung eines großen Probenumfangs pro Tag möglich. Mit der HIEF sind bei unserer Versuchsreihe pro Gerät bis zu 48 Proben gleichzeitig zu fahren. Durch die einfache Handhabung kann eine Person bis zu vier Geräte parallel beschicken, so daß insgesamt 192 Proben pro Tag bearbeitet werden können. Die quantitative Auswertung einer entsprechenden Probenzahl vom Vortag ist während der Laufzeit der Gele gut möglich, so daß eine qualitative und quantitative Auswertung eines großen Probenumfangs innerhalb von zwei Arbeitstagen zu gewährleisten ist.

Bei der in dieser Untersuchung eingesetzten Methode benötigt man im Gegensatz zu herkömmlichen IEF-Methoden für die quantitative Auswertung kein radioaktiv markiertes Material. Ebenfalls entfällt die Reinigung oder Isolierung der Globinketten, ein Schritt, der bei den anderen Techniken häufig vorgeschaltet werden muß. Obwohl die HIEF im Vergleich zu den anderen Trennungsv erfahren viele Vorteile bietet, hat sich als Standard in der Routinediagnostik, wegen der höchsten Ausbeute an qualitativen und quantitativen Varianten, eine Kombination aus automatisierter HPLC und bei Vorliegen identischer Elutionsgeschwindigkeiten eine angeschlossene Hb-Elektrophorese etabliert (Sabo u. a. 1999).

Die fortschreitende Entwicklung der elektrophoretischen Methoden zeigt, daß Techniken wie die HIEF als ein Baustein in der Entwicklung von Untersuchungsmethoden anzusehen sind, die mit Proteomics den derzeitigen Höhepunkt erreicht haben.

4.2 Vergleich elektrophoretischer Screeningmethoden für Hämoglobin

Bis heute wurde eine Anzahl verschiedener elektrophoretischer Screeningtests für Hämoglobinvarianten beschrieben. Erste größere Stichproben wurden mit der Cellulose-Acetat-Elektrophorese (Bartlett 1963) und der Citrat-Agar-Elektrophorese (Robinson u. a. 1957) untersucht. Von 1957-1967 wurden in Japan 279.000 Probanden (Iuchi 1968) und von 1965-1980 100.000 Probanden (Imamura u. a. 1980) mit der Elektrophorese in Stärkegelelen auf Hämoglobinvarianten untersucht. Mit der von Altland (1977) entwickelten Screeningmethode untersuchten Beuzard und Mitarbeiter (1981) 150.000 Erwachsene und 7000 Neugeborene. Altland u. Hackler (1979) sowie Righetti und Mitarbeiter (1979)

entwickelten ein Screeningverfahren für Globine, welches Wada und Mitarbeiter (1986) zu Analyse 80.000 getrockneter Blutproben nutzten.

Die Ergebnisse der einzelnen Screeningstudien zeigten eine erhebliche Diskrepanz in der Verteilung der Hämoglobinvarianten. Während Fairbanks (1980) beispielsweise mehr als doppelt soviel β - als α -Globinvarianten und nur ca. 1/10 γ -Globinvarianten fand, ermittelten Wada und Mitarbeiter (1986) ein Verhältnis von γ - zu α -Varianten von 2:1, β -Globinvarianten wurden jedoch nicht gefunden.

Dieser große Unterschied kann als Ausdruck unterschiedlicher Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Methoden erklärt werden. Berücksichtigt man die stark abweichenden Ergebnisse von Wada und Mitarbeitern nicht und vergleicht die Resultate der anderen Untersuchungen, so fällt auf, daß bei fast allen die Mehrzahl der entdeckten Varianten der β -Globinkette zuzuordnen sind (Bunn u. a. 1977; Fairbanks 1980). Theoretisch müßten mehr α - und γ -Globinvarianten beobachtet werden, da es für die α - und die γ -Kette im Genom jeweils 4 Loci, für die β -Kette aber nur 2 Loci gibt.

In der hier vorgestellten HIEF-Methode bildeten die γ -Globinvarianten den Hauptteil der gefundenen Varianten, gefolgt von den β -Varianten. Dagegen fanden sich keine α -Varianten. Dieses verdeutlicht die verbesserte Nachweisempfindlichkeit im γ -Bereich, bedingt durch die pH-Abflachung und unterstützt durch den Einsatz von Triton X-100 im verwendeten Screening-Gel.

Bei einem in unserem Labor mit der herkömmlichen IEF durchgeführten Screening von Globinvarianten bei Neugeborenen wurden 1988 unter 42.003 getrockneten Blutproben im dritten Test 67 Varianten gefunden. 15 der vermutlichen Varianten konnten bei erneuter Entnahme bei den 3 bis 6 Monate alten

Kindern nicht wiedergefunden werden. Die 52 reproduzierbaren Varianten gliederten sich in 4 α -, 35 β - und 13 γ -Globinvarianten auf. Insgesamt wurden 12 unterschiedliche Varianten gefunden.

Das hier vorgestellte qualitative Screening mittels HIEF führte zur Entdeckung von 18 potentiellen Varianten unter 4038 untersuchten getrockneten Blutproben Neugeborener. Die 18 Varianten gliederten sich in 4 β -, 10 γ - sowie 4 nicht näher definierbare Ladungsvarianten auf. Varianten der α -Kette konnten nicht gefunden werden.

Vergleicht man die beiden Untersuchungen, fällt eine deutlich höhere Variantausbeute bei der HIEF auf. Aufgrund unserer Ergebnisse können wir eindeutig belegen, daß durch die HIEF die Nachweisempfindlichkeit erheblich verbessert werden konnte. Ein nicht zu vernachlässigender Vorteil ist die Verwendung von getrockneten Blutproben bei der hier vorgestellten Methode, dieses vereinfacht die Probengewinnung, wichtig bei großem Probenumfang für Screening-Untersuchungen.

Die Zuordnung der potentiellen Varianten zu den einzelnen Globinen erwies sich als sehr ungenau. Ziel dieser Untersuchung war jedoch nicht die Zuordnung der Varianten und deren Transmissionsnachweis, sondern der Nachweis einer erhöhten Ausbeute an potentiellen Varianten sowie die Darstellung potentieller neutraler Aminosäureaustausche. Zur Untermauerung unseres Nachweises würde sich ein Screening mit nachfolgendem Transmissionsnachweis, durch DNA-Analysen ergänzt, anbieten.

4.3 Bedeutung der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung für den Nachweis neutraler Aminosäure-Substitutionen in Hämoglobinen

Lange war man davon ausgegangen, daß durch die IEF Basenaustausche nur dann entdeckt werden können, wenn sie einen Ladungswechsel in der Polypeptidkette verursachen. Führt nun ein Basenaustausch in der DNA zu einem Ersatz einer elektrisch neutralen Aminosäure gegen eine andere ebenfalls elektrisch neutrale Aminosäure, dürfte dies herkömmlicherweise in der HIEF nicht zur Darstellung kommen, da die Trennung der Proteine in der HIEF auch auf den pH-Unterschieden und damit den Ladungsunterschieden beruht. Allerdings gelang einer Arbeitsgruppe in unserem Labor beispielsweise die Darstellung neutraler Varianten beim Transthyretin sowie beim Apolipoprotein AI mittels HIEF.

Bei der Untersuchung nativer Hämoglobin-Varianten, darunter neutrale Varianten, kamen Ramshaw und Mitarbeiter (1979) zu dem Ergebnis, daß durch Änderungen der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur die Gestalt und Nettoladung des Proteins modifiziert wird. Diese Aussage trifft für die Darstellung der Globinketten des γ - und A_γ -Polymorphismus durch die hier vorgestellte Versuchsanordnung nicht zu, da sie durch die denaturierenden Bedingungen größtenteils in ihrer Primärstruktur entfaltet vorliegen dürften.

Die von den neutralen Austauschen betroffenen Aminosäuren in den γ -Globinen ($\text{Leu}_{75} \rightarrow \text{Thr}$), im Transthyretin ($\text{Va}_{130} \rightarrow \text{Met}$; $\text{Thr}_{60} \rightarrow \text{Ala}$; $\text{Ser}_{77} \rightarrow \text{Tyr}$) und im Apolipoprotein AI ($\text{Asp}_{39} \rightarrow \text{Glu}$) sind den geladenen Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin, Histidin oder Lysin benachbart. Im Fall des $A_\gamma\text{T}$ befindet sich ein Lysinrest an Position 76, Histidin an Position 77, ebenfalls in Frage kommt Asparaginsäure an den Positionen 73 und 79. Bei der Transthyretin-Variante $\text{Ile}_{34} \rightarrow \text{Ser}$ liegt die nächste geladene

Aminosäure vier Positionen entfernt. Die zwischengeschaltete Sequenz enthält einen Prolinrest, der eine räumliche Annäherung ermöglicht.

Bei dem Austausch der γ -Globine von Gly₁₃₆ \rightarrow Ala liegt an Position 132 ein Lysin- und an Position 139 ein Asparaginrest. Die Trennung wurde als spezifischer Triton-Effekt angenommen. Durch das hydrophobere Alanin an Position 136 wird eine zusätzliche Bindung des Triton X-100 an die Aminosäuren 133-141 gefördert. Der beobachtete Sprung in der Position im Gel des A _{γ} wurde als eine Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins an Position 132 gedeutet.

Aufgrund der in unserem Labor gemachten Beobachtungen postulierten Altland und Mitarbeiter (1986b,c), daß in kleinmolekularen Proteinen unter denaturierenden Bedingungen neben Ladungsvarianten auch Varianten nachweisbar seien, in denen entweder geladene Aminosäuren "elektrisch neutral" substituiert werden (Lys \rightarrow Arg; Glu \rightarrow Asp) oder in dem die substituierte, neutrale Aminosäure zu einer der fünf geladenen Aminosäuren benachbart ist. Aus dieser Hypothese lassen sich Schlüsse für die Sensitivität der HIEF beim Nachweis genetischer Varianten ziehen.

In dieser Untersuchung gelang es, unter denaturierenden Bedingungen den Beweis der Darstellung elektrisch neutraler Aminosäuresubstitutionen durch die Separation der γ -Globinketten in G _{γ} und A _{γ} , sowie die weitere Auftrennung von A _{γ} in A _{γ} I und A _{γ} T zu erbringen.

Durch AUT-PAGE und RHPLC konnte kürzlich eine neue G _{γ} -Variante HbF-Calabria entdeckt werden und durch DNA-Sequenzierung als neutrale Variante (Phe \rightarrow Leu an Position 118) bestätigt werden (Manca u. a. 2000), dieses unterstreicht, daß elektrophoretische Methoden nach wie vor ihren Stellenwert in der Diagnostik der Hämoglobinopathien haben.

4.4 Sensitivität der Hybrid-isoelektrischen Fokussierung zum Nachweis quantitativer Veränderungen der γ -Globine

4.4.1 γ -Polymorphismus

Fetales Hämoglobin dominiert in den Erythrozyten des Feten und des Neugeborenen. Nach der Geburt wird es durch adultes Hämoglobin verdrängt. Die beiden Typen der γ -Globinketten von HbF (G_γ und A_γ) unterscheiden sich an Position 136 (Glycin versus Alanin) und werden von benachbart liegenden Genen auf dem β -Globingen-Cluster produziert. Die Erythrozyten hämatologisch unauffälliger Erwachsener beinhalten normalerweise weniger als 1% HbF.

Neben dem charakteristischen Umschaltmechanismus zwischen der γ - und β -Kettensynthese existiert in der Postnatalperiode noch ein zweiter Umschaltmechanismus, der die verschiedenen Anteile der G_γ - und A_γ -Ketten im HbF bedingt. Das Verhältnis $G_\gamma:A_\gamma$ liegt bei Neugeborenen bei 7:3 und ab dem 6. Lebensmonat, ähnlich wie im Erwachsenenalter, bei 2:3 (Schroeder u. Huisman 1969; Schroeder u. a. 1970). Die von Huisman und Mitarbeitern (1983) angewendete HPLC- oder RHPLC-Methode zeigt bei den meisten Neugeborenen G_γ - vom Gesamt- γ -Anteil von 60-80%. Die Auswertung unseres Stichprobenumfanges von 3280 Neugeborenen ergab einen Mittelwert für G_γ von $61,2 \pm 3,8\%$ und belegt damit die Zuverlässigkeit bzw. Vergleichbarkeit der Methode bezüglich der quantitativen G_γ -Bestimmung.

Aufgrund dieser beiden sich ab dem Neugeborenenalter vollziehenden Umschaltvorgänge eignen sich die quantitativen Auswertungen des Hämoglobins für in-vitro-Studien über die Regulation der Genexpression. Durch Auswertung der unterschiedlichen G_γ/A_γ -Verhältnisse in verschiedenen angeborenen und

erworbenen Störungen, wie Thalassämien, HPFH u. a. erhofft man sich weitere Aufschlüsse dieser Vorgänge.

Für das Aufdecken von quantitativen Veränderungen der Globinkettenzusammensetzung eignet sich die von uns vorgestellte HIEF-Methode. Voruntersuchungen für das quantitative Screening bildete eine Auswertung der durch Prof. T. H. J. Huisman zur Verfügung gestellten Blindproben. Die nach der Färbung optisch aufgefallenen Proben konnten mit dem Densitometer eindeutig als quantitative Varianten identifiziert werden. Für die getesteten Proben wurden uns die Ergebnisse der DNA-Analyse mitgeteilt. Es handelte sich bei den einzelnen Proben um eine γ -Thalassämie mit dem Verlust eines G_γ -Gens, um eine G_γ -Gentriplizierung sowie um eine G_γ -Genduplizierung.

Diese Untersuchung zeigt, daß quantitative Veränderungen der Globinketten mit der HIEF zu erfassen sind. Durch die DNA-Analysen konnte gezeigt werden, daß mit dieser Methode auch Genmutationen in Form von Deletion und Duplikation nachweisbar sind. Die von Prof. T. H. J. Huisman zur Verfügung gestellten Proben bestätigten die Spezifität und Zuverlässigkeit dieser Methode. Die Technik erlaubt die direkte Bestimmung der G_γ/A_γ - und der $A_\gamma I/A_\gamma T$ -Quotienten sowie des Verhältnisses der β - zu den γ -Globinketten. Die hohe Auflösung, der exakte Probenlauf und die reduzierte Hintergrundfärbung sind Voraussetzung für exakte Bestimmungen. Durch die hohe Reproduzierbarkeit ist es möglich, ein Screening in größerem Umfang durchzuführen, beispielsweise in Ländern mit hoher Thalassämie-Frequenz. Durch die HIEF mit anschließender DNA-Analyse werden sich in Zukunft eine Reihe heute noch offener Fragen beantworten lassen. Auch andere Screeningverfahren setzen zunehmend auf hintereinandergeschaltete Techniken, wie z.B. HPLC, ergänzt durch traditionelle Hb-Elektrophorese und DNA-Sequenzierung, um eine exakte Diagnose zu erhalten (Sabo u. a. 1999).

Durch die Erkennung von Gendosiseffekten erweitert sich die Diagnostik auch auf den Bereich der Introns. Es ist bekannt, daß vielen Thalassämieformen eine Störung im Intron zugrunde liegt (Orkin u. a. 1983; Treisman u. a. 1983; Kulozik u. a. 1991). Der resultierende Einfluß auf die Initiationseffizienz führt zu einer quantitativen Änderung der Globine. Mit der vorliegenden Methode hat man die Möglichkeit, den testbaren Bereich auf die Erfassung von Mutationen in nicht codierten Regionen auszudehnen.

4.4.2 A_γ-Polymorphismus

HbF-Sardinia (75 Ile → Thr) wurde 1975 in β-Thalassämie-Patienten auf Sardinien entdeckt (Griffoni u. a. 1975). Spätere Studien (Ricco u. a. 1976; Huisman u. a. 1977; Schroeder u. a. 1979) zeigten, daß dieser Polymorphismus weltweit auftritt, aber mit unterschiedlichen Frequenzen verbreitet ist. Strukturanalysen von Saglio u. a. (1979) und Efremov u. a. (1979) zeigten, daß diese Variante das Ergebnis einer Mutation des A_γ-Globin-Gens ist, die A_γT genannt wurde.

Statistische Analysen der Gen-Frequenzen von A_γT ergaben die höchsten Werte in italienischen (f=0,239), jugoslawischen (f=0,238) und weißen kaukasischen (f=0,224) Neugeborenen (Huisman u. a. 1985). Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, daß das Mutationsereignis im südlichen Europa stattgefunden und sich von dort verbreitet hat. Die relativ hohen Genfrequenzen unter japanischen (f=0,178) und indischen (f=0,173) Säuglingen waren überraschend. Man vermutete ein zweites Mutationsereignis. DNA-Analysen ergaben eine hohe Übereinstimmung zwischen A_γT-Globingenen tragenden Chromosomen von Europäern und Japanern. Dieses führte zu der Annahme, daß die Mutation einen gemeinsamen Vorfahren hat, der seinen Ursprung in Südeuropa hatte. Niedrige Genfrequenzen findet man in China (f=0,079) und an der Westküste Afrikas.

Die nach Hardy-Weinberg errechnete Genfrequenz für $A_\gamma T$ in der Population hessischer Neugeborener unseres Screenings betrug 0,212, damit entspricht die ermittelte Genfrequenz den von Huisman u. a. 1985 erhobenen Werten bei den Kaukasiern.

Die Charakterisierung der quantitativen Zusammensetzung der γ -Globinketten in HbF von $A_\gamma T$ -heterozygoten Patienten mit Sichelzellanämie, β - oder $\delta\beta^\circ$ -Thalassämie erlauben detaillierte Untersuchungen über den Beitrag der γ -Globingene beider Chromosomen bezüglich der Zusammensetzung der γ -Ketten des zirkulierenden fetalen Hämoglobins (HbF). In normalen Neugeborenen mit der $A_\gamma T$ -Heterozygotie beträgt die Menge für $A_\gamma T$ $44,1 \pm 3,8\%$ (Huisman u. a. 1983), gleiches gilt bei den für $A_\gamma T$ heterozygoten SS-Patienten. Die Thalassämie-Heterozygoten zeigen unterschiedliche Verhältnisse in Abhängigkeit, ob die $A_\gamma T$ -Determinante in cis- oder trans-Stellung zu der β -Thalassämie-Determinante liegen. Insgesamt haben $2/3$ bis $3/4$ der $A_\gamma T$ -Ketten ihren Ursprung vom β -Thalassämie-Chromosom, die restlichen vom anderen Chromosom. Anders ist es bei den für $\delta\beta^\circ$ -Thalassämie Heterozygoten. Hier werden fast 90-100% der $A_\gamma T$ -Kette von dem $\delta\beta^\circ$ -Thalassämie-Chromosom produziert.

Die vorgestellten Ergebnisse sind allesamt durch die HPLC oder RHPLC erhoben worden. Unsere Auswertung mittels HIEF ergab bei der quantitativen Auswertung der Gesamt- A_γ -Menge einen $A_\gamma T$ -Anteil von $45,9 \pm 3,8\%$ und entspricht damit den Werten, die Huisman u. a. 1983 bei gesunden kaukasischen Neugeborenen fand. Dieses unterstreicht nochmals die, bezüglich der quantitativen Globinketten-Analyse, gute Übereinstimmung der Methoden und die Sensitivität für die quantitative Bestimmung durch HIEF.

5. Zusammenfassung

Die Separation der humanen Globinketten bildet eine Schlüsseltechnik für die Untersuchung von Hämoglobinopathien. In der vorliegenden Arbeit galt es, mit einer Methode qualitative und quantitative Globinvarianten in einer großen Stichprobe hessischer Neugeborener nachzuweisen.

Die Trennung der Globine aus getrockneten Blutproben hessischer Neugeborener erfolgte durch Hybrid-isoelektrische Fokussierung (HIEF) in Polyacrylamidgelen mit immobilisierten pH-Gradienten von pH 6,3-10,5, abgeflacht auf 0,04 pH/cm im pH-Bereich 7,48-7,64 mit einer Pufferkapazität von 1 meq/pH/l.

Qualitative Varianten der einzelnen Globinketten wurden durch Inspektion und densitometrische Auswertung der angefärbten Proteinbanden identifiziert. Nach oben genannten Kriterien fielen von 4038 mit der HIEF-Methode untersuchten getrockneten Blutproben insgesamt 18 Proben als potentielle Globinvarianten auf. Die Auswertung zeigt, daß die γ -Globinvarianten den Hauptteil der nachgewiesenen Varianten bilden. Dies ist bedingt durch eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit der vorgestellten HIEF-Technik bei der Darstellung der γ -Globine aufgrund der pH-Abflachung im Gel und der Verwendung von Triton X-100 in der Rehydratationslösung.

Durch die Separation der γ -Globinketten in G_γ und A_γ sowie die Auftrennung von A_γ in $A_{\gamma I}$ und $A_{\gamma T}$ ist der Beweis der Darstellung von elektrisch neutralen Aminosäuresubstitutionen mittels HIEF erbracht worden. Die Genfrequenz für $A_{\gamma T}$ bestimmt nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz lag bei 0,212.

Für die densitometrische Auswertung der quantitativen Varianten, der ein standardisiertes Computerprogramm zugrunde lag, eigneten sich von den auf 86 Gelen gelaufenen 4038 Proben 3280 Probenspuren von 75 Gelen. Die densitometrische Auswertung bezog sich zum einen auf das Verhältnis G_γ -Globin zu Gesamt- γ -Globin und zum anderen auf das Verhältnis unter den Proben, die heterozygot bezüglich $A_\gamma T$ -Globin und $A_\gamma I$ -Globin waren.

Die Gesamtdichte der γ -Globinbanden setzte sich aus den Dichtewerten der G_γ - und der A_γ -Globinbande zusammen. Für die Dichte der G_γ -Bande ergab sich der Mittelwert 61,2% (Flächenanteil der densitometrischen Messung) mit einer Standardabweichung von 3,8%. Bei den statistischen Auswertungen von 3280 densitometrierten Proben fielen insgesamt 25 Proben auf, die innerhalb einer Standardabweichung von $\pm 3,75\%$ lagen. In der anschließenden Kontrolle waren 20 Proben reproduzierbar.

In der gesamten Stichprobe des quantitativen Screenings fanden sich 1039 heterozygote Globine für $A_\gamma I$ und $A_\gamma T$. In der statistischen Auswertung wurde der Anteil des $A_\gamma T$ -Globin am Gesamt- A_γ -Globin errechnet und betrug im Mittelwert 45,9% mit einer Standardabweichung von 3,8%. Bei der statistischen Auswertung waren insgesamt 31 Proben quantitativ auffällig. In Kontrolluntersuchungen waren 21 Proben reproduzierbar.

Die Reliabilität der quantitativen Auswertungsergebnisse wurde durch Berechnung des Variationskoeffizienten nachgewiesen. Der Berechnung des Variationskoeffizienten erfolgte durch wiederholte Dichtemessungen des gleichen Gels und betrug 1,8%, der durch Dichtemessung der gleichen Proben auf verschiedenen Gelen ermittelte Variationskoeffizient betrug 4,6%.

Die vorgestellte HIEF zeigt, daß mit einer Methode sowohl die Darstellung qualitativer und quantitativer Varianten möglich ist. Durch Erkennung von Gendosiseffekten erweitert sich die Diagnostik von den Exons in den Bereich der Introns. Die hohe Anzahl der nachgewiesenen Varianten zeigt die Empfindlichkeit der Methode. Die genaue Zuordnung der potentiellen Varianten, die nicht Gegenstand dieser Arbeit war, ist durch eine angeschlossene DNA-Analyse möglich. Durch Fortentwicklung der Untersuchungstechniken, auch auf molekularer Ebene, ist die HIEF als Screening-Methode jedoch nur bedingt einsetzbar. Sie ist eher als Baustein in der Entwicklung der elektrophoretischen Techniken anzusehen, die mit Proteomics den derzeitigen Höhepunkt erreicht hat.

6. Abkürzungen

A	Adenin
AGS	Adrenogenitales Syndrom
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATR	α -Thalassämie mit Retardierung
C	Cytosin
2D	Zweidimensional
DGGE	Denaturing-gradient-Gelelektrophorese
DHS	DNase-hypersensitive Stelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
f	Genfrequenz
G	Guanin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Hb	Hämoglobin
HbA	adultes Hämoglobin
HbC	Hämoglobin-Variante
HbF	fetales Hämoglobin
HGMD	Human Gene Mutation Database
HbH	Überschußvariante β_4
HbS	Sichelzellhämoglobin
HD	Heteroduplex-Analyse
HIEF	Hybrid-isoelektrische Fokussierung
HPFH	Hereditäre Persistenz von fetalem Hämoglobin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HS	hypersensitive Stelle
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ile	Isoleucin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient

kb	Kilobase
LCR	locus control region
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	molar
MCH	Mittlerer Hb-Gehalt der Erythrozyten
MCV	Mittleres Zellvolumen der Erythrozyten
Met	Methionin
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
NP-40	Nonidet P-40
O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-chain-reaction
pI	Isoelektrischer Punkt
PKU	Phenylketonurie
RHPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSCP	Single-strand-conformation-polymorphism- Analyse
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Va	Valin

7. Literaturverzeichnis

ALTER, B. P., Goff, S. C., Efremov, G. D., Gravely, M. E., Huisman, T. H. J.:
Globin chain electrophoresis: A new approach to the determination of the
 G_{γ}/A_{γ} ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis.
Br J Haematol 44: 527-534 (1980)

ALTLAND, K.:
Screening for abnormal hemoglobins in the newborn. A highly economic
procedure using isoelectric focusing. In Radola, B.J., Graessling, D. (eds.):
Electrofocusing and Isotachopheresis.
Walter de Gruyter, Berlin: 295-301 (1977)

ALTLAND, K., Hackler, R.:
Double-One-Dimensional Slab-Gel Electrophoresis.
Electrophoresis 79: 53-66 (1979)

ALTLAND, K., Kaempfer, M., Forssbohm, M., Werner, W.:
Monitoring for changing mutation rates using blood samples submitted to
PKU-screening.
Proc VII Int Cong Hum Gen: 277-287 (1982)

ALTLAND, K., Altland, A.:
Forming reproducible density and solute gradients by computer-
controlled cooperation of stepmotor driven burettes.
Electrophoresis 5: 143-147 (1984a)

ALTLAND, K., Altland, A.:
Pouring reproducible gradients in gels under computer control:
new devices for simultaneous delivery of two independent gradients for
more flexible slope and pH-range of immobilized pH-gradient.
Clin Chem 30: 2098-2103 (1984b)

ALTLAND, K., Banzhoff, A., Hackler, R., Rossmann, U.:

Improved control of rehydrating polyacrylamide gels in the presence of solutes. Demonstration of inherited human prealbumin variants in gels containing variants by isoelectric focusing in an immobilized pH-gradient in gels containing urea.

Electrophoresis 5: 379-381 (1984c)

ALTLAND, K., Rossmann, U.:

Hybrid isoelectric focusing in rehydrated immobilized pH-gradients with added carrier ampholytes: Demonstration of hum globins.

Electrophoresis 6: 314-325 (1985a)

ALTLAND, K., Hackler, R., Banzhoff, A., v. Eckardstein, A.:

Experimental evidence for flexible slope of immobilized pH-gradients poured under computer control.

Electrophoresis 6: 140-142 (1985b)

ALTLAND, K., Rossmann, U.:

Hybrid isoelectric focusing in rehydrated immobiline gels.

LKB Application Note 346 (1986a)

ALTLAND, K., Banzhoff, A.:

Separation by hybrid isoelectric focusing of normal human plasma transthyretin (prealbumin) and a variant with a methionine for valine substitution associated with familial amyloidotic polyneuropathy.

Electrophoresis 7: 529-533 (1986b)

ALTLAND, K., Hackler, R., Rossmann, U.:

Avoiding liquid exsudation on the surface of rehydrated gels used for hybrid isoelectric focusing in carrier ampholyte supplement immobilized pH gradients.

Electrophoresis 7: 251-259 (1986c)

- ALTLAND, K., v. Eckardstein, A., Banzhoff, A., Wagner, M., Rossmann, U.,
Hackler, R., Becher, P.:
Hybrid isoelectric focusing: Adsorption of proteins onto immobilized pH-
gradient matrices and desorption by carrier ampholytes.
Electrophoresis 8: 52-62 (1987)
- ALTLAND, K., Becher, P.:
A new sample applicator for isoelectric focusing in horizontal polyacry-
lamide gels.
Electrophoresis 9: 485-487 (1988)
- ANAGNOU, N. P., Papayannopoulou, T., Nienhuis, A. W.,
Stamatoyannopoulos, G.:
Molecular characterization of a novel form of (A_γδβ)^o-thalassemia deletion
with a 3' breakpoint close to those of HPFH-3 and HPFH-4: Insights for a
common regulatory mechanism.
Nucleic Acids Res 16: 6057 (1988)
- ANGASTINIOTIS, M., Modell, B., Englezos, P., Boulyjenkov, V.:
Prevention and control of haemoglobinopathies.
Bull World Health Organ 73 (3): 375-386 (1995)
- BARD, H., Makowski, E. L., Meschia, G., Battaglia, F. C.:
The relative rates of synthesis of hemoglobin A and F in immature red
cells of newborn infants.
Pediatrics 45: 766-772 (1970)
- BARD, H.:
The post-natal decline of hemoglobin F synthesis in normal fullterm in-
fants.
J Lab Clin Invest 55: 395-398 (1975)
- BARTLETT, R. C.:
Rapid cellulose acetate electrophoresis II. Qualitative and quantitative
hemoglobin fractionation.
Clin Chem 9: 325-329 (1963)

BASSET, P., Beuzard, Y., Gard, M. C., Rosa, J.:

Isoelectric focusing of human hemoglobin: Its application to screening, to the characterization of 70 variants and to the study.

Blood 51: 971-980 (1978)

BAYSAL, E., Carver, M. F.:

The β - and δ -thalassemia repository.

Hemoglobin 19: 213-236 (1995)

BEUZARD, Y., Galacteros, F., Braconnier, F., Dubart, A., Chen-Marotel, J.,

Caburi-Martin, J., Monplaisir, N., Sellaye, M., Saint-Martin, J., Seytor, S.,

Basset, P., Rosa, J.:

Isoelectric focusing of human hemoglobins.

Prog Clin Biol Res 60: 177-195 (1981)

BJELLQUIST, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R.,

Postel, W.:

Isoelectric focusing in immobilized pH-gradients: Principle, methodology and some applications.

J Biochem Biophys Methods 6: 317-339 (1982)

BLUM, H. E.:

Proteomics.

Dtsch med Wschr 125: 803-804 (2000a)

BLUM, H. E.:

Genomics.

Dtsch med Wschr 125: 529-530 (2000b)

BOGUSKI, M. S.:

Biosequence exegesis.

Science, 286: 453-458 (1999)

BRAUNITZER, G., Gehring-Müller, R., Hilschman, N., Hilse, K., Hobom, G.,

Rudloff, V., Wittmann-Liebold, B.:

Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins.

Hoppe Seylers Z Phys Chem 325: 283-286 (1961)

- BUNN, H. F., Forget, B. G., Ranney, H. M.:
Human hemoglobins.
Sounders, Philadelphia, London, Toronto (1977)
- BUSSLINGER, M., Moschonas, N., Favell, R. A.:
 β^+ Thalassemia: Aberrant splicing results from a single point mutation in
an intron.
Cell 27: 289-298 (1981)
- CAMPBELL, M., Henthorn, J. S., Davies, S. C.:
Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focussing
for neonatal hemoglobinopathy screening.
Clin Chem 45: 969-975 (1999)
- CAO, A., Rosatelli, M. C.:
Screening und prenatal diagnosis of the hemoglobinopathies.
Bailliere`s Clin Haematol 6: 263-289 (1993)
- CAO, A., Galanello, R., Rosatelli, M. C.:
Genotype-phenotype correlations in β -thalassemias.
Blood Rev 8: 1-12 (1994)
- CARIO, H., Stahnke, K., Kohne, E.:
 β -Thalassämie in Deutschland.
Klin Pädiatr 211: 431-437 (1999)
- CHAN, V., Chan W.-Y., Tang, M., Lau, K., Todd, D., Chan, T. K.:
Molecular defects in Hb H hydrops fetalis.
Br J Haematol 96: 224-228 (1997)
- CHEN, F. E., Ooi, C., Ha, S. Y., Cheung, B. M., Todd, D., Liang, R.:
Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients.
N Engl J Med 343 (8): 544-550 (2000)
- COLLINS, F. S., Weissman, S. M.:
The molecular genetics of human hemoglobin.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 31: 315-438 (1984)

- COMI, P., Giglioni, B., Ottolenghi, S., Gianni, A. M., Ricco, G., Mazza, U., Soglio, G., Camaschella, C., Pich, P. G., Gianazza, E., Righetti, P. G.:
G_γ and A_γ globin chains separation and quantitation by isoelectric focusing.
Biochem Biophys Res Commun 87: 1-8 (1979)
- CRAIG, J. E., Rochette, J., Fisher, C. A., Weatherall, D. J., Marc, S., Lathrop, G. M., Demenais, F., Thein, S. L.:
Haemoglobin switch: Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach.
Nat Genet 12: 58-64 (1996)
- CRICK, F. H., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R. J.:
General nature of the genetic code for proteins.
Nature 192: 1227-1232 (1961)
- CROW, J. F.:
Chemical risk to future generations.
Scientist and Citizen, June-July, 113-117 (1968)
- CROW, J. F.:
Human population monitoring.
In Hollaender (ed.): Chemical Mutagenesis. Principles and methods for their detection. Plenum Press, New York Vol. 2: 591-605. (1971)
- CURTIN, P. T., Kan, Y. W.:
The inactive β globin gene on a γδβ thalassemia chromosome has a normal structure and functions normally in vitro.
Blood 71: 766-770 (1988)
- DeBRUIN, S. H., Janssen, L. H. M.:
Comparison of the oxygen and proton binding behaviour of human hemoglobin A and A₂.
Biochem Biophys Acta 295: 490-494 (1973)

- DEISSEROTH, A., Nienhuis, A., Turner, P., Velez, R., Anderson, W. F.,
Ruddle, F., Lawrence, J., Creagan, R., Kucherlapati, R.:
Localization of the human α -globin structural gene to chromosome 16 in
somatic cell hybrids by molecular hybridization assay.
Cell 12: 205-218 (1977)
- DEISSEROTH, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P.,
Ruddle, F. H.:
Chromosomal localization of human β -globin gene on human chromo-
some 11 in somatic cell hybrids.
Proc Natl Acad Sci USA 75: 1456-1460 (1978)
- DOVER, G. J., Smith, K. D., Chang, Y. C., Purvis, S., Mays, A., Meyers, D. A.,
Sheils, C., Serjeant, G.:
Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are
partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2.
Blood 80: 816-824 (1992)
- DRESCHER, H., Künzer, W.:
Der Blutfarbstoff des menschlichen Feten.
Klin Wochenschr 32: 92 (1954)
- EDINGTON, G. M., Lehmann, H.:
Expression of sickle cell gene in Africa.
Br Med J (Clin Res) 1: 1308, 2: 1328 (1955)
- EFREMOV, G. D., Wilson, J. B., Huisman, T. H. J.:
The chemical heterogeneity of human hemoglobin F: Direct evidence for
the existence of three types of γ chains, the G_γ , $A_\gamma I$, and $A_\gamma T$ chains.
Biochim Biophys Acta 579: 421 (1979)
- ENVER, T., Raich, N., Ebens, A. J., Papyannopoulou, T., Constantini, F.,
Stamatoyannopoulos, G.:
Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching
in transgenic mice.
Nature 344: 309-313 (1990)

FAIRBANKS, V. F.:

Hemoglobinopathies and Thalassemias.

Laboratory Methods. Georg Thieme Verlag: 83-117 (1980)

FAWCETT, J. S.:

The pH-drift during isoelectric focusing; a comparison between different techniques.

In Righetti, P. G. (ed.): Isoelectric focusing and isotachopheresis. American Elsevier, North Holland, Amsterdam: 25-37 (1975)

FAWCETT, J. S., Chrambach, A.:

Electrofocusing in wide pH-range immobilized gels containing carrier ampholytes.

Prot Biol Fluids: 439-442 (1985)

FELBER, B. K., Orkin, S. H., Hamer, D. H.:

Abnormal RNA splicing causes one form of α -thalassemia.

Cell 29: 895-902 (1982)

FERGUSON, K. A.:

Starch gel electrophoresis: Application to the classification of pituitary proteins and polypeptides.

Metabolism 13: 985-1002 (1964)

FINLAYSON, G. R., Chrambach, A.:

Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its preparative application.

Anal Biochem 40: 292-311 (1971)

FISHER, S. I., Haga, J. A., Castleberry, S. M., Hall, R. B., Thompson, W. C.:

Validation of an automated HPLC method for quantification of Hb S.

Clin Chem 43: 1667-1668 (1997)

- FLEISCHMANN, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M.:
Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd.
Science 269: 496-512 (1995)
- FORGET, B. G.:
Molecular genetics of the human globin genes.
In: Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., Nagel, R. L., editors. Disorders of hemoglobin; genetics, pathophysiology, and clinical management.
Cambridge (UK): Cambridge University Press: 117-130 (2001)
- FRANKLIN, S. G., Zweidler, A.:
Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals.
Nature 266: 273-275 (1977)
- FRASER, P., Gribnau, J., Trimborn, T.:
Mechanisms of developmental regulation in globin loci.
Cur Opin Hematol 5: 139-144 (1998)
- FUCHAROEN, S., Winichagoon, P., Wisedpanichkiy, R., Sae-Ngow, B., Sriphanich, R., Oncoung, W., Muangsapaya, W., Chowthaworn, J., Kanokpongsakdi, S., Bunyaratvej, A., Piankijagum, A., Dewaele, C.:
Prenatal and postnatal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC.
Clin Chem 44: 740-748 (1998)
- GALANELLO, R., Barella, S., Gasperini, D u.a.:
Evaluation of a new automatic HPLC analyser for thalassaemia and haemoglobin variants screening.
J Autom Chem 17: 73-76 (1995)

- GELINAS, R., Endlich, B., Pfeiffer, C., Yagi, H., Stamatoyannopoulos, G.:
G to A substitution in the distal CCAAT box of the A_γ globin gene in
Greek hereditary persistence of fetal hemoglobin.
Nature 313: 323-325 (1985)
- GIANAZZA, E., Celentano, F., Dossi, G., Bjellquist, B., Righetti, P. G.:
Preparation of immobilized pH-gradients spanning 2-6 pH units with two
chamber mixers. Evaluation of two experimental approaches.
Electrophoresis 4: 88-97 (1984)
- GIBBONS, R. J., Higgs, D. R.:
The alpha thalassemia/mental retardation syndroms.
In: Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., Nagel, R. L., editors. Dis-
orders of hemoglobin; genetics, pathophysiology, and clinical manage-
ment.
Cambridge (UK): Cambridge University Press: 470-488 (2001)
- GILMAN, J. G., Huisman, T. H. J.:
DNA sequence variation associated with elevated fetal G_γ globin produc-
tion.
Blood 66: 783-787 (1985)
- GILMAN, J. G., Johnson, M. E., Mishima, N.:
Four base-pair DNA deletion in human A_γ globin-gene promotor associ-
ated with low A_γ expression in adults.
Br J Haematol 68: 455-458 (1988)
- GRIFFONI, V., Kamuzora, H., Lehmann, H., Charlesworth, D.:
A new Hb F variant: F Sardinia γ 75 (E 19) isoleucine threonine found in a
family with Hb G Philadelphia, β chain deficiency and a Lepore-like hae-
moglobin, indistinguishable from Hb A₂.
Acta Haematol (Basel) 53: 347-355 (1975)
- GROSVELD, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R., Kollias, G.:
Position-Independent, high-level of the human β-globin gene in trans-
genic mice.
Cell 56: 975-985 (1987)

GUTHRIE, R., Susi, A.:

A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants.

Pediatrics 9: 338-341 (1963)

HAHN, E. M.:

Nachweis von Punktmutationen mit Hilfe hochauflösender Gelelektrophorese - Entwicklung und Validierung eines Testsystems.

Wissenschaftl. Fachverlag Gießen (1987)

HALBRECHT, J., Klibanski, C.:

Identification of a new normal embryonic haemoglobin.

Nature 178: 794-795 (1956)

HARDISON, R. C., Sawada, I., Cheng, J.-F., Shen, C.-K. J., Schmid, C. W.:

A previously undetected pseudogene in the human α -globin gene cluster.

Nucleic Acids Res 14: 1903-1911 (1986)

HARDISON, R. C., Chui, D. H. K., Riemer, C., Giardine, B., Lehv slaiho,

H., Wajcman, H., Miller, W.:

Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server.

Hemoglobin 25 (2): 183-193 (2001)

HARRIS, H., Hopkinson, D. A., Robson, E. B.:

The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man.

Ann Hum Genet 37: 237-253 (1974)

HATTON, C. S., Wilkie, A. O., Drysdale, H. C., Wood, W. G., Vickers, M. A.,

Sharpe, J., Ayyub, H., Pretorius, I. M., Buckle, V. J., Higgs, D. R.:

α -thalassemia caused by a large (62kb) deletion upstream of the human α -globin gene cluster.

Blood 76: 221-227 (1990)

- HATTORI, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., Tayoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D. K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K.:
The DNA sequence of human chromosome 21.
Nature 405 (6784): 311-319 (2000)
- HEADLEE, M. E., Gardiner, M. B., Reese, A. L., Huisman, T. H. J.:
The distribution of fetal hemoglobin and the types of γ chain in red cell fractions separated by gradient centrifugation from blood of patients with sickle cell anemia and other hemoglobinopathies.
Biochem Med 29: 337-354 (1983)
- HECHT, F., Motulsky, A. G., Lemire, R. J.:
Predominance of hemoglobin Gower 1 in early human embryonic development.
Science 152: 91-92 (1966)
- HENTHORN, P. S., Smithies, O., Nakatsuji, T., Felice, A. E., Gardiner, M. B., Reese, A. L., Huisman, T. H. J.:
(A γ $\delta\beta$)^o-thalassemia in blacks is due to a deletion of 34 kbp of DNA.
Br J Haematol 9: 342 (1985)
- HENZEL, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C.:
Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases.
Proc Natl Acad Sci USA 90: 5011-5015 (1993)
- HESS, J. F., Schmid, C. W., Shen, C.-K. J.:
A gradient of sequence divergence in the human adult α -globin duplication units.
Science 226: 67 (1984)
- HIGGS, D. R., Old, J. M., Pressley, L., Clegg, J. B., Weatherall, D. J.:
A novel α -globin gene arrangement in man.
Nature 284: 632-635 (1980)

HIGGS, D. R., Pressley, L., Aldrige, B., Clegg, J. B., Weatherall, D. J., Cao, A., Hadjiminias, M. G., Kattamis, C., Metaxatou-Mavromati, A., Rachmilewitz, E.A., Sophocleous, T.:
Genetic and molecular diversity in nondeletion Hb H disease.
Proc Natl Acad Sci USA 78: 5833-5837 (1989)

HIGGS, D. R., Wood, W. G., Jarman, A. P., Sharpe, J., Lida, J., Pretorius, I. M., Ayyub, H.:
A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus.
Genes Dev 4: 1588-1601 (1990)

HIGGS, D. R.:
 α -thalassemia.
In Higgs, D. R., Weatherall, D. J. eds. Bailliere`s Clinical Haematology, Philadelphia: WB Saunders 6: 117-150 (1993)

HIGGS, D. R.:
Molecular mechanisms of α -thalassemia.
In: Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., Nagel, R. L., editors. Disorders of hemoglobin; genetics, pathophysiology, and clinical management.
Cambridge (UK): Cambridge University Press: 405-430 (2001)

HIGGS, D. R., Bowden, D. K.:
Clinical and laboratory features of the α -thalassemia syndromes.
In: Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., Nagel, R. L., editors. Disorders of hemoglobin; genetics, pathophysiology, and clinical management.
Cambridge (UK): Cambridge University Press: 431-469 (2001)

HOLLENBERG, M. D., Kaback, M. M., Kazazian, H. H. jr.:
Adult hemoglobin synthesis by reticulocytes from the human fetus at midtrimester.
Science 174: 698-702 (1971)

- HUEHNS, E. R., Dance, N., Beaven, G. H., Hecht, F., Motulsky, A. G.:
Human embryonic hemoglobins.
Cold Spring Harbor Quant Biol 29: 327-331 (1964)
- HUEHNS, E. R., Farooqui, A. M.:
Oxygen dissociation properties of human embryonic red cells.
Nature 254: 335-337 (1975)
- HUISMAN, T. H. J., Jonxis, J. H. P., Dozy, A.:
Is foetal haemoglobin present in the blood of normal human adults?
Biochem Biophys Acta 18: 576-577 (1955)
- HUISMAN, T. H. J., Harris, H., Gravely, M., Schroeder, W. A., Shelton, J. R.,
Shelton, J. B., Evans, L.:
The chemical heterogeneity of the fetal hemoglobin in normal newborn
infants and in adults.
Mol Cell Biochem 17: 45 (1977)
- HUISMAN, T. H. J., Altay, C., Webber, B., Reese, A. L., Gravely, M. E.,
Okonjo, K., Wilson, J. B.:
Quantitation of three types of γ chain of HbF by high pressure liquid
chromatography. Application of this method to the HbF of patients with
sickle cell anemia or the S-HPFH condition.
Blood 57: 75-82 (1981a)
- HUISMAN, T. H. J., Gravely, M. E., Webber, B., Okonojo, K., Henson, J.,
Reese, A. L.:
The γ chain heterogeneity of fetal hemoglobin in Black β -Thalassemia and
HPFH heterozygotes.
Blood 58: 62-70 (1981b)
- HUISMAN, T. H. J., Reese, A. L., Gardiner, M. B., Wilson, J. B., Lam, H.,
Reynolds, A., Nagle, S., Trowell, P., Zeng, Y. T., Huang, S. Z., Sukumaran,
P. K., Miwa, S., Efremov, G. D., Petkov, G., Sciarratta, G. V., Sansone, G.:
The occurrence of different levels of G_γ chain and of the $A_\gamma T$ variant of fe-
tal hemoglobin in newborn babies from several countries.
Am J Haematol 14: 133-148 (1983)

- HUISMAN, T. H. J., Kutlar, F., Nakatsuji, T., Bruce-Tagoe, A., Kilin, Y.,
Cauchi, M. N., Garcia, C. R.:
The frequency of the γ chain variant A γ T in different populations and its
use in evaluating γ gene expression in association with thalassemia.
Hum Genet 71: 127-133 (1985)
- HUISMAN, T. H. J.:
 β -thalassemia repository.
Hemoglobin 13: 775-785 (1989)
- HUISMAN, T. H. J., Carver, M. F. M., Baysal, E.:
A Syllabus of thalassemia mutations.
Augusta, G.A., The sickle cell anemia foundation (1997)
- HUISMAN, T. H. J., Carver, M. F.:
The beta- and delta-thalassemia repository (Ninth Edition; Part I).
Hemoglobin 22: 169-195 (1998)
- HUNT, D. M., Higgs, D. R., Winichagoon, P., Clegg, J. B., Weatherall, D. J.:
Haemoglobin Constan Spring has an unstable α messenger RNA.
Br J Haematol 51: 405-413 (1982)
- IMAMURA, T., Sugihara, J., Matsuo, T., Maruyama, T., Ohta, Y., Sumida, I.,
Yamaoka, K., Yanase, T.:
Frequency and distribution of structural variants of hemoglobin and tha-
lassemic states in Western Japan.
Hemoglobin 4: 409-415 (1980)
- INGRAM, V. M., Stretton, A. V. W.:
Human hemoglobin A $_2$: Chemistry, genetics and evolution.
Nature 190: 1079 (1961)
- IUCHI, I.:
Abnormal hemoglobin in Japan: Biochemical and epidemiological charac-
ters of abnormal hemoglobin in Japan.
Acta Haematol Jap 31: 842-851 (1968)

JENSEN, O. N., Mortensen, P., Vorm, O., Mann, A.:

Automation of matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry using fuzzy logic feedback control.

Anal Chem 69: 1706-1714 (1997)

JEPPSON, J. O., Berglund, S.:

Thin-layer isoelectric focusing for haemoglobin screening and its application to haemoglobin Malmö.

Clin Chim Acta 40: 153-158 (1972)

JONSSON, M.:

Distorted zones in isoelectric focusing systems.

Electrophoresis 1: 141-149 (1980)

KAN, Y. W., Dozy, A. M., Trecartin, R., Todd, D.:

Identification of a nondeletion defect in α -thalassemia.

N Engl J Med 297: 1081-1084 (1977)

KLOSE, J.:

Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing induced point mutations in mammas.

Hum Genet 26: 231-243 (1975)

KOEPKE, J. A., Thoma, J. F., Schmidt, R. M.:

Identification of human hemoglobins by use of isoelectric focusing in gel.

Clin Chem 21: 1953-1955 (1975)

KULIEV, A., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Ivakhnenko, V., Cieslak, J., Evsikov,

S., Wolf, G., Angastiniotis, M., Kalakoutis, G., Strom, C., Verlinsky, Y.:

Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of thalasseмии.

J Assist Reprod Genet 16 (4): 207-211 (1999)

- KULOZIK, A. E., Bellan-Koch, A., Bail, S., Kohne, E., Kleihauer, E.:
Thalassaemia intermedia: moderate reduction of β -globin gene transcriptional activity by a novel mutation of the proximal CACCC promoter element.
Blood 77: 2054-2058 (1991)
- LANDER, E. S.:
The new genomics: Global view of biology.
Science 274: 536-539 (1996)
- LIECHTI-GALLATI, S., Schneider, V., Neeser, D., Kraemer, R.:
Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease.
Eur J. Hum Genet 7: 590-598 (1999)
- MAGER, D. L., Henthorn, P. S., Smithies, O.:
A Chinese $G_\gamma + (A_\gamma\delta\beta)^\circ$ thalassaemia deletion: Comparison to other deletions in the human β -globin cluster and sequence analysis of the breakpoints.
Nucleic Acids Res 13: 6559 (1985)
- MANCA, L., Cherchi, L., De Rosa, M. C., Giardina, B., Masala, B.:
A new, electrophoretically silent, fetal hemoglobinvariant: HbF-Calabria (G_γ 118(GH1) Phe – Leu).
Hemoglobin 24 (1): 37-44 (2000)
- MASALA, B., Manca, L., Formato, M., Pilo, G.:
A study of the switch of fetal hemoglobin in newborn erythrocytes fractionated by density gradient.
Hemoglobin 7: 567-572 (1983)
- MOI, P., Cash, F. E., Liebhaber, S. A., Cao, A., Pirastu, M.:
An initiation codon mutation (AUG>GUG) of the human α 1-globin gene: Structural characterisation and evidence for a mild thalassaemic phenotype.
J Clin Invest 89: 1416 (1987)

MONTE, M., Beuzard, Y., Rosa, J.:

Mapping of several abnormal haemoglobins by horizontal polyacrylamide gel isoelectric focusing.

Am J Clin Pathol 66: 753-759 (1976)

MULLER, H. J.:

Artificial transmutation of the gene.

Science 66: 84-87 (1927)

NAKATSUJI, T., Ohba, Y., Huisman, T. H. J.:

Hb F-Yamaguchi (γ 75Thr, γ 80Asn, γ 136Aia) is associated with G _{γ} thalassaemia.

Am J Hematol 16: 189 (1984)

NEEL, J. V., Tiffany, T. O., Anderson, N. G.:

Approaches to monitoring human populations for mutation rates and genetic disease. In Hollaender, A.: Chemical mutagens, principles and methods for their detection, Vol. 3, Chapt. 28.

Plenum Press New York, London (1973)

NEEL, J. V.:

Developments in monitoring human population for mutation rates.

Mutation Research 26: 319-328 (1974)

NEEL, J. V., Mohrenweiser, H. W., Meisler, M. H.:

Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure.

Proc Natl Acad Sci USA 77: 6037-6041 (1980)

NEEL, J. V., Mohrenweiser, H. W., Hanash, S., Rosenblum, B., Sternberg, S.,

Wurzinger, K.-H., Rothman, E., Satoh, C., Goriki, K., Krasteff, T.,

Long, M., Skolnick, M., Krzesicki, R.:

Biochemical approaches to monitoring human populations for germinal mutation rates.

In 1. Electrophoresis. De Serres, F. J., Sheridan, W., (eds.):

Utilization of mammalian specific locus studies in hazard evaluation and estimation of genetic risk.

Plenum Publishing Corporation (1983)

NEEL, J. V., Rosenblum, B., Sing, C. F., Skolnick, M., Hanash, S., Sternberg, S.:
Adapting Two-Dimensional Gel Electrophoresis to the Study of Human
Germ-Line Mutation Rates.

Academic Press: 259-306 (1984)

NUTE, P. E., Pataryas, H. A., Stamatoyannopoulos, G.:

The G_γ and A_γ hemoglobin chains during human fetal development.

Am J Hum Genet 25: 271-276 (1973)

O'FARRELL, P.:

High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins.

J Biol Chem 250: 4007-4021 (1975)

OLSON, M. V.:

The human genome project.

Proc Natl Acad Sci USA 90: 4338-4343 (1993)

ORKIN, S. H., Sexton, J. P., Cheng, T.-C., Goff, S. C., Giardina, P. V. J., Lee, J. I.,
Kazazian, H. H. Jr.:

ATA box transcriptional mutation in β-thalassemia.

Nucleic Acid Res 11: 4727-4734 (1983)

ORKIN, S. H., Cheng, T. C., Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H.:

Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of
the human β-globin gene.

EMBO J 4: 453-456 (1985)

PAPADEA, C., Cate, J. C.:

Identification and quantification of hemoglobins A, F, S and C by auto-
mated chromatography.

Clin Chem 42: 57-63 (1996)

PATESTOS, N. P., Fauth, M., Radola, B. J.:

Fast and sensitive protein staining with colloidal acid violet 17 following
isoelectric focusing in carrier ampholyte generated and immobilized pH
gradients.

Electrophoresis 9: 488-496 (1988)

PROUDFOOD, N. J., Maniatis, T.:

The structure of a human α -globin gene duplication.
Cell 21: 537-544 (1980)

RADOLA, B. J.:

Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanized glass or polyester films. In Radola, B. J. (ed.):
Electrophoresis 79: 79-94
Walter de Gruyter, Berlin, New York (1980)

RAMSHAW, J. A. M., Coyne, J. A., Lewontin, R. C.:

The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variation.
Genetics 93: 1019-1039 (1979)

RICCO, G., Mazza, U., Turi, R. M., Pich, P. G., Camaschella, C., Saglio, G.,
Bernini, L. F.:

Significance of a new type of human fetal hemoglobin carrying a replacement Isoleucine > Threonine at position 75 of the γ -chain.
Hum Genet 32: 305-313 (1976)

RIGHETTI, P. G., Drysdale, J. W.:

Isoelectric focusing in polyacrylamide gels.
Biochim Biophys Acta 236: 17-28 (1971)

RIGHETTI, P. G., Gianazza, E., Gianni, A. M., Comi, P., Giglioni, B.,

Ottolenghi, S., Secchi, C., Rossi-Berardi, L.:

Human globin chain separation by isoelectric focusing.
J Biochem Biophys Methods 1: 45-47 (1979)

RILBE, H.:

Stable pH-gradients - A key problem in isoelectric focusing.
In: Radola, B. J., Graesslin, D. (eds.): Electrofocusing and Isotachopheresis.
Walter de Gruyter, Berlin 35-50 (1977)

- RIMPILAINEN, M. A., Righetti, P. G.:
Membrane protein analysis by isoelectric focusing in immobilized pH
gradients.
Electrophoresis 6: 419-422 (1985)
- ROBINET, D., Sarmini, H., Lesure, J., Funes, A.:
Separation of hemoglobins using a monodisperse cation exchanger.
J Chromatogr Sci 297: 333-337 (1984)
- ROBINSON, A. R., Robson, M., Harrison, A. P., Zuelzer, W. W.:
A new technique for differentiation of hemoglobin.
J Lab Clin Med 50: 745 (1957)
- RODBARD, D., Chrambach, A.:
Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration.
Proc Natl Acad Sci USA 65: 970-977 (1970)
- RODBARD, D., Chrambach, A.:
Estimation of molecular radius, free mobility and valence using poly-
acrylamide gel electrophoresis.
Anal Biochem 40: 95-134 (1971)
- RODBARD, D., Chrambach, A.:
Quantitative PAGE: Mathematical and statistical analysis of data.
In: Allen, R. C., Maurer, H. R. (eds.): Electrophoresis and isoelectric fo-
cusing in PAGE.
De Gruyter, Berlin (1974)
- ROSSMANN, U., Hackler, R., Spönemann, P., Altland, K.:
Effects of adding a reducing agent to gels containing immobilized pH
gradients.
In: Peeters, H. (ed): Protides of the biological fluids.
Pergamon Press Oxford 34: 723-726 (1986)

- ROVERA, G., Magarian, C., Borun, T. W.:
Resolution of hemoglobin subunits by electrophoresis in acid urea polyacrylamid gels containing Triton X-100.
Anal Biochem 85: 506-518 (1978)
- ROYER, W. E., Knapp, J. E., Strand, K., Heaslet, H. A.:
Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms.
Trends in Biochem Sci 25 (5): 297-304 (2001)
- SABO, G., Brodbeck, U., Cardile, N., Viollier, A.-F., Scheurmann, T., Knecht, H.:
Diagnose der Thalassämien und Hämoglobinopathien mittels HPLC (high performance liquid chromatographie): eine Studie von 627 Patienten.
Schweiz Med Wochenschr 129: 1196-1200 (1999)
- SAGLIO, G., Mazza, U., Camascella, C., Melloni, T., Ciocca-Vasino, M. A., Pich, P. G., Ricco, G.:
Composition of the γ -chains of human fetal hemoglobin at birth and during intrauterine life.
Acta Haematol (Basel) 62: 45-50 (1979)
- SCHROEDER, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Kleihauer, E. F., Dozy, A. M., Robberson, B.:
Evidence for multiple structural genes for the γ chain of human fetal hemoglobin.
Proc Natl Acad Sci USA 60: 537-544 (1968)
- SCHROEDER, W. A., Huisman, T. H. J.:
Investigations of molecular variation in human fetal hemoglobin in the infant and in certain hematological conditions in the adult.
In: Peeters, H. (ed.): Protides of the biological fluids.
Pergamon Press, Oxford: 249-255 (1969)
- SCHROEDER, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, J. R., Wilson, J. B.:
An improved method for quantitative determination of human fetal hemoglobin.
Anal Biochem 35: 235-243 (1970)

- SCHROEDER, W. A., Huisman, T. H. J., Efremov, G. D., Shelton, J. R.,
Shelton, J. B., Phillips, R., Reese, A., Gravely, M., Harrison, J. M., Lam, H.:
Further studies of the frequency and significance of the A_γT-chain of the
human fetal hemoglobin.
J Clin Invest 63: 268-275 (1979)
- SHAKIN, S. H., Liebhaber, S. A.:
Translational profiles of α_1 -, α_2 - and β -globin messenger ribonucleic acids
in human reticulocytes.
J Clin Invest 78: 1125-1129 (1986)
- SHELTON, J. B., Shelton, J. R., Schroeder, W. A.:
Preliminary experiments in the separation of globin chains by high per-
formance liquid chromatography.
Hemoglobin 3: 353-358 (1979)
- SHELTON, J. B., Shelton, J. R., Schroeder, W. A.:
High performance liquid chromatographic separation of globin chains on
a large-pore C₄ column.
J Liq Chromatogr 7: 1969-1977 (1984)
- SHULMAN, R. G.:
Spectroscopic contributions to the understanding of hemoglobin funktion:
Implications for structural biology.
IUBMB Life 51 (6): 351-367 (2001)
- SUKUMARAN, P. K., Nakatsuji, T., Gardiner, M. B., Reese, A. L., Gilman, J. G.,
Huisman, T. H. T.:
 γ Thalassemia resulting from the deletion of γ globin gene.
Nucleic Acids Res 11: 4635-4643 (1983)
- SVENSON, H.:
Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in
natural pH-gradients. I. The differential equation of state of solute concen-
trations at a steady state and its solution for simple cases.
Acta Chem Scand (B) 16: 465-466 (1961)

TATE, V. E., Wood, W. G., Weatherall, D. J.:

The British form of hereditary persistence of fetal hemoglobin results from a single base mutation adjacent to an S1 hypersensitive site 5' to the A_γ globin gene.

Blood 68: 1389-1393 (1986)

THEIN, S. L., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I. J., Hutchingson, R. M., Old, J. M., Wood, W. G., Clegg, J. B., Weatherall, D. J.:

Molecular basis for dominantly inherited inclusion body β-thalassemia.

Proc Natl Acad Sci USA 87: 3924-3928 (1990)

TREISMAN, R., Orkin, S. H., Maniatis, T.:

Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β-thalassemia genes.

Nature 302: 591-596 (1983)

TURPEINEN, U., Sipliä, I., Antila, P., Kayalainen, U., Kuronen, B.,

Kalkinen, N., Ahola, T., Stenman, U. H.:

Two α-chain variants, Hb Brousscis and Hb Cemenelum characterized by cation-exchange HPLC, isoelectric focussing and peptide sequencing.

Clin Chem 41: 532-536 (1995)

TUZMAN, S., Schechter, A. N.:

Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β-thalassemia mutations.

Blood Rev 15: 19-29 (2001)

VESTERBERG, O.:

Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes.

Acta Chem Scand (B) 20: 2653-2666 (1969)

VOGEL, F., Rathenberg, R.:

Spontaneous Mutation in Man.

Adv Hum Genet 5: 223-319 (1975)

VOGEL, F., Altland, K.:

Utilization of material from PKU-screening programs for mutation screening. In: Bora, K. C. (ed.): Proceedings of an International Symposium on Chemical Mutagenesis, Human Population Monitoring and Genetic Risk Assessment. Progress in Mutation Research, Vol. 3: 143-157. Elsevier Biochemical Press (1982)

VOGEL, F., Motulsky, A. G.:

Human Genetics. Problems and Approaches. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1986)

WADA, Y., Matsuo, T., Katakuse, I., Suzuki, T., Azuma, T., Tsujino, S., Kishimoto, S., Matsuda, H., Hayashi, A.:

Mass spectrometric detection of the plasma prealbumin (transthyretin) variant associated with familial amyloidotic polyneuropathy. Biochim Biophys Acta 837: 316-319 (1986)

WASINGER, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., Humphery-Smith, I.:

Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis 16: 1090-1094 (1995)

WATSON, J. D., Crick, F. H. C.:

A structure for desoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737-738 (1953)

WEATHERALL, D. J.:

The thalasseмииs.

In: Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A. W., Majerus, P. W., Varmus, H. ed. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia: WB Saunders 157-205 (1994)

WEATHERALL, D. J.:

ABC of clinical haematology. The hereditary anaemias.
BMJ 314: 492-496 (1997)

WEATHERALL, D. J.:

Pathophysiology of thalassemia.
Bailliere Clin Haematol 11: 127-147 (1998)

WEATHERALL, D. J., Clegg, J. B.:

Genetic disorders of hemoglobin.
Semin Hematol 36 , No 4, Suppl 7: 24-37 (1999a)

WEATHERALL, D. J., Clegg, J. B., Higgs, D. R.:

The hemoglobinopathies.
In Scriver C. R., Beaudet, A. L. Sly, W. S., u.a. (eds):
The metabolic and molecular bases of inherited disease (ed 8)
New York, NY, McGraw-Hill, (1999b)

WEATHERALL, D. J.:

From genotype to phenotype: genetics and medical practice in the new
millennium.
Phil Trans R Soc Lond B 354: 1995-2010 (1999c)

WHO (World Health Organization) Scientific Group.

Updated estimates of the frequency of the haemoglobin disorders in each
country.
<http://www.who.int/ncd/hgn/haemogl.htm> (2000)

WILKINS, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C.,
Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L.,
Hochstrasser, D. F.:

From protein to proteom: large scale protein identification by two-
dimensional electrophoresis and amino acid analysis.
Biotechnology 14: 61-65 (1996)

- WINICHAGOON, P., Thonglairoam, V., Fucharoen, S., Wilairat, P., Fukumaki, Y., Wasi, P.:
Severity differences in β -thalassaemia/haemoglobin E syndromes: implication of genetic factors.
Br J Haematol 83: 633-639 (1993)
- WONG, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Erlich, H. A., Kazazian, H. H.:
Characterisation of β -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA.
Nature 330. 384-386 (1987)
- WOOD, W. G., Clegg, J. B., Weatherall, D. J.:
Developmental biology of human haemoglobins.
Prog Hematol 10: 43-90 (1977)
- WOOD, W. G.:
Increased HbF in adult life.
Clin Haematol 6: 177-213 (1993)
- ZENG, Y. T., Huang, S. Z., Nakatsuji, T., Huisman, T. H. J.:
 $G_\gamma A_\gamma$ -Thalassemia and γ -chain variants in Chinese newborn babies.
Am J Hematol 18: 235-242 (1985)

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Altland danke ich für die Überlassung der Thematik, für seine anregende Zusammenarbeit während der Laborarbeiten und die kritische Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen.

Herrn Prof. Dr. W. Fuhrmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau P. Winter und Frau Dr. U. Rossmann danke ich für die Einarbeitung in den Laboralltag, ihre Hilfsbereitschaft, ihr Verständnis sowie die fruchtbaren Diskussionen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Freiherr A. von Eckardstein für die kritische Beurteilung des Textes.

Herrn G. Röhm danke ich für die Unterstützung bei den Fotoarbeiten.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen guten Freunden Frau Dr. D. Tamas und Herrn PD Dr. A. Günther, die mich zusammen mit meinem Mann motiviert haben, die Dissertation selbstständig einzureichen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann, der mich durch Entlastung im Alltag und durch Verständnis für Feierabend- und Wochenendarbeit entscheidend bei der Entstehung dieser Dissertation unterstützt hat.

9. Lebenslauf

26.01.1966	Geboren in Bad Salzuflen, Nordrhein-Westfalen
1972 - 1976	Grundschule an der Gete, Bremen
1976 - 1982	Gymnasium Julius-Brecht-Allee, Bremen
1982 - 1985	Gymnasium Hermann-Böse-Straße, Bremen
Juni 1985	Abiturprüfung
1985 - 1987	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1987 - 1991	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
04.05.1990	Heirat von Herrn Hans Werner Görges, Augenarzt
1991 - 1992	Praktisches Jahr am ZKH „Links der Weser“, Bremen, Lehrkrankenhaus der Georg-August-Universität, Göttingen
01.05.1992	Teilapprobation
01.09.1992	Ärztin im Praktikum, Pädiatrie ZKH Bremen-Nord
01.03.1994	Vollapprobation
01.03.1994-31.01.1997	Assistenzärztin, Pädiatrie, ZKH Bremen-Nord
01.02.1997-31.10.1997	Assistenzärztin, Neonatologie, ZKH St. Jürgen-Str. Bremen
01.11.1997-31.12.1998	Assistenzärztin, Pädiatrie, ZKH Bremen-Nord
07.07.1998	Facharztprüfung, Kinderheilkunde
seit 01.01.1999	Fachärztin, Pädiatrie, Kinderklinik, Neubrandenburg
02.02.2000	Fachkunde Ultraschall, Kolloquium für Schädel, Abdomen und Hüfte
15.11.2000	Prüfung für Schwerpunktbezeichnung Neonatologie