

Pränatale RhD- und AB0-Diagnostik aus Fruchtwasser mittels Polymerasekettenreaktionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Kerstin Schweidler
aus Friedberg / Hessen

Giessen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Klinische Chemie, Klinische Immunologie und Humangenetik
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
Leiter: Prof. Dr. G. Bein
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Gutachter: Prof. Dr. Pralle

Tag der Disputation: 24. April 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Geschichtlicher Überblick	1
1.2	Rh-Antigene	3
1.3	Genetik	6
1.4	Rhesus-Proteine	11
1.5	D-Varianten und schwache D-Phänotypen (D-weak)	15
1.6	AB0-Blutgruppen	18
1.7	Morbus haemolyticus neonatorum	20
1.7.1	Krankheitsbild	20
1.7.2	Häufigkeit	21
1.7.3	Diagnostik	22
1.7.4	Therapie	24
1.7.5	Prophylaxe	24
1.8	Fragestellung	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.2	DNA-Isolationsmethoden	27
2.2.1	DNA-Isolation durch Erhitzen auf 90°C	27
2.2.2	DNA-Isolation mittels Phenol-Extraktionsmethode	27
2.2.3	DNA-Isolation mit Kit „Extra Gene“ (Fa. BAG)	28
2.2.4	DNA-Isolation mit „QIAamp Blood and Tissue Kit“ (Fa. Quiagen)	29
2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	29
2.4	RhD-Polymerasekettenreaktionen	30
2.4.1	Methode 1	30
2.4.1.1	Überblick	30
2.4.1.2	Primer	30
2.4.1.3	PCR-Ansatz und Reaktionszyklen	32
2.4.2	Methode 2	33

2.4.2.1	Überblick	33
2.4.2.2	Primer	33
2.4.2.3	PCR-Ansatz und Reaktionszyklen	34
2.4.3	Methode 3	35
2.4.3.1	Überblick	35
2.4.3.2	Primer	35
2.4.3.3	PCR-Ansatz und Reaktionszyklen	37
2.5	AB0-PCR: Methode 4	38
2.5.1	Überblick	38
2.5.2	Primer	38
2.5.3	PCR-Ansatz und Reaktionszyklen	39
2.5.4	Auswertung der PCR-Produkte	40
2.6	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.7	Serologie	42
2.8	Statistik	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Überblick	44
3.2	DNA-Isolationsmethoden	44
3.3	Ergebnisse der Genotypisierungen	45
3.4	Methode 1	49
3.4.1	Genotypisierung	49
3.4.2	Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte	50
3.4.3	Gruppe der RhD-negativen Mütter	50
3.5	Methode 2	52
3.5.1	Genotypisierung	52
3.5.2	Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte	52
3.5.3	Gruppe der RhD-negativen Mütter	53
3.6	Diskrepante PCR-Ergebnisse	54
3.7	Methode 3	55
3.8	Methode 4	57

4 Diskussion	61
4.1 Methoden	61
4.2 Ergebnisse	62
4.3 Klinische Anwendung von RhD-PCR-Methoden	64
4.4 PCR bei RhD-Untergruppen	66
4.5 Bedeutung bei RhD-negativen Müttern	68
4.6 Kontamination des Amniozentese-punktats durch maternale Zellen	69
4.7 Neue Ansätze in der pränatalen RhD-Diagnostik	70
4.8 Pränataler Einsatz von AB0-PCR-Methoden	72
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	75
7 Anhang	91
7.1 Antwortbogen	91
7.2 RhD-Studien	92
8 Danksagung	94
9 Lebenslauf	95

Abkürzungen

A	Adenin
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Ala	Alanin
Aq. dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Cys	Zystein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ep	Epitop
G	Guanin
Gly	Glycin
Ile	Isoleuzin
Leu	Leuzin
MHN	Morbus haemolyticus neonatorum
mRNA	Messenger-RNA
NLB	Nuclei lysis buffer
PBS	Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pro	Prolin
Rh	Rhesus
RhAG	Rhesus-assoziiertes Glykoprotein
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSW	Schwangerschaftswoche

V

T

Thymin

Trp

Tryptophan

Val

Valin

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Überblick

Der wichtigste Antikörper des Rhesussystems, heute als Anti-D bezeichnet, wurde erstmals 1939 beschrieben [Levine, Stetson; 1939]. Er wurde aus dem Serum einer Frau isoliert, die eine Fehlgeburt erlitten hatte. Transfusionen mit dem Blut ihres Ehemannes hatten zuvor eine hämolytische Reaktion ausgelöst. Der isolierte Antikörper agglutinierte sowohl die Erythrozyten ihres Mannes, als auch die von 85% der ABO-kompatiblen Blutspender der weißen Bevölkerung. Ohne ihn zu benennen, zeigten Levine und Stetson, daß es sich um einen neuen, von den bisher bekannten Blutgruppen unabhängigen, Antikörper handelte. Sie vermuteten, daß die Induktion der Antikörperbildung durch ein vom Vater vererbtes, kindliches Antigen ausgelöst wurde.

Etwa zeitgleich beschrieben Landsteiner und Wiener einen Antikörper, der durch Immunisierungen von Meerschweinchen mit dem Blut von Rhesusaffen gewonnen wurde [Landsteiner, Wiener; 1940]. Dieser Antikörper agglutinierte Erythrozyten von 85% der weißen Bevölkerung in New York. Er erhielt den Namen Anti-Rh.

Zunächst wurde postuliert, der menschliche und der tierische Antikörper seien identisch. Spätere Studien zeigten jedoch, daß beide Agglutinationsreaktionen durch unterschiedliche Antikörper zustande kommen [Fisk, Foord; 1942].

Der Name Rhesus wurde für den menschlichen Antikörper beibehalten. Der tierische Antikörper wurde der Arbeit Landsteiners und Wieners zu Ehren als LW-Antikörper bezeichnet.

In den Jahren 1941-43 wurde der Nachweis erbracht, daß das Krankheitsbild des Morbus haemolyticus neonatorum durch diesen Antikörper (Anti-Rh) ausgelöst wird, der als Folge einer Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind gebildet wird. Die Mütter der erkrankten Kinder waren zu einem hohen Prozentsatz Rh-negativ, die Väter alle Rh-positiv [Levine et al.; 1941].

In den sechziger Jahren wurde die prophylaktische Gabe von Immunglobulin Anti-D an RhD-negative Frauen eingeführt. Die Gefahr einer Sensibilisierung konnte damit von 8 auf 0,8% gesenkt werden [Martius et al.; 1996]. Anti-D-Immunglobulin verhindert nach Amniozentese und Entbindung die Sensibilisierung des mütterlichen Immunsystems durch eingeschwemmte RhD-positive kindliche Erythrozyten. In Deutschland wird die prophylaktische Anti-D-Gabe in der 28.–30. SSW und postpartal durchgeführt.

Im Rhesus-System sind mittlerweile mehr als fünfzig verschiedene Antigene bekannt [v. Kiparski et al.; 2000]. Das Rhesus-Antigen D ist aufgrund seiner ausgeprägten Antigenität auch heute noch das klinisch bedeutsamste.

Bei ersten Versuchen, die genetischen Hintergründe des Rhesus-Systems zu klären, wurden die bis dahin bekannten Allele drei benachbarten Genloci zugeordnet (Drei-Locus-Theorie). Diese Genloci sollten die Antigene D/d, C/c und E/e codieren. Hieraus ergab sich eine Erklärung für acht verschiedene Genkomplexe bzw. Haplotypen [Fisher; 1944]. Ein Antikörper Anti-d als Hinweis auf ein d-Antigen wurde allerdings nie gefunden.

Wiener vertrat eine alternative Theorie von multiplen Allelen an einem einzigen Genort [Wiener; 1944].

In den 80er Jahren wurde ein neues Genmodell erstellt, das das Vorkommen zweier Rhesus-Gene beschreibt [Tippett; 1986]. Durch Southern Blot-Analyse und genomische Studien an Proben unverwandter RhD-positiver Kaukasier zeigte sich die Existenz zweier hintereinander liegender homologer Gene von identischer Organisation: *RHCE* und *RHD* [Colin et al., 1991]. RhD-positive Menschen besitzen beide Gene, RhD-negative Individuen in der Regel nur das *RHCE*-Gen.

Durch die Weiterentwicklung biochemischer und molekulargenetischer Methoden war 1992 eine Aufklärung der RhD-cDNA-Sequenz möglich [Le Van Kim et al.; 1992]. Es folgte die Entwicklung verschiedener

Polymerasekettenreaktionen (PCR), mit denen die Amplifikation und der Nachweis einzelner Abschnitte des *RHD*-Gens möglich wurde [z.B. Bennett et al.; 1993].

1.2 Rhesus-Antigene

Als eine Blutgruppe definiert man erbliche, meist stabile und in der Zellmembran lokalisierte, strukturelle Eigenschaften von Blutbestandteilen, die sich aufgrund eines genetischen Polymorphismus bei verschiedenen Individuen unterscheiden und die Bildung von spezifischen Antikörpern hervorrufen können.

AB0 und Rhesus stellen aufgrund ihrer klinischen Bedeutung die wichtigsten Blutgruppen dar.

Das wichtigste Antigen des Rhesus-Systems ist das Merkmal RhD. In der weißen Bevölkerung Europas und Nordamerikas sind 82-88% RhD-positiv. Der Prozentsatz RhD-positiver Individuen in der schwarzafrikanischen Bevölkerung liegt bei 95% [Tills et al.; 1983], in China und Japan sind es bis zu 99% [Sun et al.; 1998].

Nahezu alle Menschen exprimieren C- oder c- und E- oder e-Antigene auf ihren Erythrozyten.

Aufgrund seiner starken Immunogenität ist das RhD-Antigen das bedeutendste Blutgruppenantigen neben den AB0-Antigenen. Die Immunisierungsrate RhD-negativer Individuen liegt nach einer einmaligen Transfusion von 200 ml RhD-positiven Blutes bei über 80% [Urbaniak, Robertson; 1981]. Sie ist etwa 20fach höher als die der anderen Rh-Antigene [v. Kiparski et al.; 2000]. Aufgrund der starken Antigenität können durch nicht-kompatible Transfusionen hämolytische

Reaktionen ausgelöst werden, weshalb stets RhD-kompatible Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden sollten.

Bislang sind 45 serologisch definierte Rh-Antigene beschrieben. Sie differieren in ihrer Häufigkeit und bezüglich des Vorkommens in verschiedenen Bevölkerungsgruppen.

Die Antigene des Rhesus-Systems werden unterschiedlich klassifiziert. Als Fisher-Race-Terminologie wird jene Nomenklatur bezeichnet, die aus Fishers Gedankenansatz entstanden ist [Fisher; 1944; Race; 1948]. Die heute gültige Terminologie ist die numerische Nomenklatur: jede mit Hilfe eines Antikörpers nachweisbare Determinante ist nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit einer Zahl gekennzeichnet [Rosenfield et al.; 1962].

Numerisch	CDE oder Rh-Hr	Kommentar
Rh1	D, Rh ₀	sehr stark immunogen
Rh2	C, Rh [`]	schwach immunogen
Rh3	E, rh ^{``}	schwach immunogen
Rh4	c, hr [`]	stark immunogen
Rh5	e, hr ^{``}	Vorkommen 98%
Rh6	f, ce, hr	verbunden
Rh7	Ce, rhi	verbunden
Rh8	C ^w , rh ^{w1}	selten
Rh9	C ^x , rh ^x	selten
Rh10	V, ce ^s	> 20% der schwarzen Bevölkerung der USA
Rh11	E ^w , rh ^{w2}	selten
Rh12	G, rh ^G	gewöhnlich auf D+ und C+
Rh13		obsolet (Rh ^A)
Rh14		obsolet (Rh ^B)
Rh15		obsolet (Rh ^C)
Rh16		obsolet (Rh ^D)

Numerisch	CDE oder Rh-Hr	Kommentar
Rh17	Hr _o	häufig (-D- Rh:-17)
Rh18	Hr	häufig (meist mit Rh:17)
Rh19	hr ^s	e-Variante (häufig in der schwarzen Bevölkerung)
Rh20	VS, e ^s	> 20% der schwarzen Bevölkerung der USA
Rh21	C ^G	meist mit C+
Rh22	cE	verbunden
Rh23	D ^w	selten (D ^{Va})
Rh24		obsolet (E ^T)
Rh25		obsolet (LW)
Rh26	c-ähnlich	meist mit c+
Rh27	cE	verbunden
Rh28	hr ^H	e-Variante (häufig in der schwarzen Bevölkerung)
Rh29	rh _m , „total Rh“	häufig (Rh _{null} , Rh: -29)
Rh30	D ^{cor} , Go ^a	selten (D ^{IVa})
Rh31	hr ^B	e-Variante (Schwarze)
Rh32		selten (R ^N &DBT)
Rh33		selten (R _o ^{Har}) (Hawd)
Rh34	Bas Hr ^B	häufig (-D- Rh-34)
Rh35	1114	selten (C)D(e)
Rh36	Be ^a	selten (c)(e)
Rh37	Evans	selten (.D.)
Rh38		obsolet (Duclos)
Rh39	C-ähnlich	Auto-Antikörper
Rh40	Tar	selten (D ^{VII} & -D-)
Rh41	Ce-ähnlich	ähnlich Rh:7
Rh42	Cce ^s	normalerweise c und e ^s cis
Rh43	Crawford	selten
Rh44	Nou	häufig
Rh45	Riv	selten
Rh46	Sec	häufig (antithetisch zu Rh32)

Numerisch	CDE oder Rh-Hr	Kommentar
Rh47	Dav	häufig
Rh48	JAL	selten
Rh49	STEM	selten (hr ^s)
Rh50	FPTT	selten (DFR)
Rh51	MAR	häufig (antithetisch zu C ^w und C ^x)
Rh52	BARC	selten (R ₁ ^{VI})

Tabelle 1: Antigene des Rhesussystems [modifiziert nach Sonneborn, Voak; 1997]

1.3 Genetik

Die beiden Rhesus-Gene (*RHD* und *RHCE*) liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 p34.3 bis p36.1 [Chérif-Zahar et al.; 1991]. Ihre 3'-Enden liegen zueinander orientiert und sind durch 30000 Basenpaare getrennt. In diesem Abschnitt ist ein weiteres Gen (*SMP1*) lokalisiert, welches ebenfalls für ein Membranprotein kodiert [Flegel, Wagner; 2000]. Vom Zentromer ausgehend scheint die Anordnung nach neuesten Erkenntnissen *RHD-RHCE* zu sein [Okuda et al.; 1999] und nicht *RHCE-RHD*, wie lange angenommen wurde [Carritt et al; 1997].

Das *RHD*-Gen kodiert für das Hauptantigen RhD, das *RHCE*-Gen kodiert für die Antigene C bzw. c und E bzw. e. Sowohl homo- als auch hemizygoten *RHD*-Träger zeigen den Phänotyp RhD-positiv.

Bei RhD-negativen Kaukasiern ist das *RHD*-Gen in der Regel auf beiden Chromosomen vollständig deletiert. In anderen Bevölkerungsgruppen (Japaner,

Chinesen und afrikanische Schwarze) konnten phänotypisch RhD-negative Individuen mit vorhandenem, aber scheinbar funktionslosem *RHD*-Gen nachgewiesen werden [Okuda et al.; 1997; Singleton et al.; 2000].

Bei RhD-negativen Schwarzen mit dem Rhesuskomplex dCe^s (r^s) findet sich im *RHD*-Gen eine interne Deletion. Einige *RHD*-Exons sind vorhanden, ein Genprodukt wurde bislang nicht gefunden [Blunt et al.; 1994]. Bei Kaukasiern mit einem ähnlichen dCe(r')-Komplex wurde kein Teil des *RHD*-Gens nachgewiesen.

Kürzlich wurde das Pseudogen *RHD*Ψ beschrieben. Es kommt bei RhD-negativen afrikanischen Schwarzen zu einem großen Prozentsatz vor. Im *RHD*Ψ-Gen findet sich an der Grenze von Intron 3 zu Exon 4 eine Insertion von 37 Nukleotiden, ebenso existieren weitere Mutationen in Exon 5 und 6. Durch die Veränderung in Exon 4 liegt an Position 210 ein Stop-Codon. Das funktionslose Gen fand sich bei 66% der Studienpopulation [Singleton et al.; 2000].

Infolge des Fehlens des *RHD*-Genes wird auf den Erythrozyten RhD-negativer Individuen kaukasischer Abstammung kein RhD-Polypeptid exprimiert. Dies erklärt, warum nie ein Antikörper gegen das postulierte antithetische Merkmal Rhesus-d identifiziert werden konnte.

Das *RHD*- und das *RHCE*-Gen bestehen aus je zehn Exons mit einer gemeinsamen Größe von 69 Kilobasen (kb) DNA [Avent, Reid; 2000]. Die Exon-Intron-Struktur ist identisch [Chérif-Zahar et al.; 1994]. Infolge der ausgeprägten Homologie des *RHD*- und des *RHCE*-Gens vermutet man ein gemeinsames Vorläufergen [Colin et al.; 1991]. Vergleichende Analysen zwischen den humanen Rhesusgenen und denen einiger Primaten untermauern diese Theorie [Salvignol et al.; 1993].

Die Sequenz der RhD-cDNA wurde 1992 entschlüsselt [Le van Kim et al.; 1992], wobei die Homologie zum *RHCE*-Gen 97% beträgt. Die Differenz besteht in 41 unterschiedlichen Codons, aus denen je nach Protein 32 bis 35 Aminosäure-Substitutionen resultieren [Avent et al.; 1990]. Lediglich für Exon 1

und 8 sind keine Sequenzunterschiede beschrieben (siehe Tabelle 2) [Gassner et al.; 1997]. Im *RHD*-Gen findet man eine Deletion von 600 Basenpaaren (Bp) im Intron zwischen Exon 4 und 5 [Arce et al.; 1993]. In den Promotor-Regionen des *RHD*- und des *RHCE*-Gens sind fünf diskrepante Nukleotide beschrieben [v. Kiparski et al.; 2000].

Die Allele C und c unterscheiden sich durch eine Nukleotidsubstitution in Exon 1 und fünf weiteren in Exon 2 des *RHCE*-Gens, wohingegen E- und e-Allel nur in einer einzigen Substitution in Exon 5 differieren [Mouro et al.; 1993].

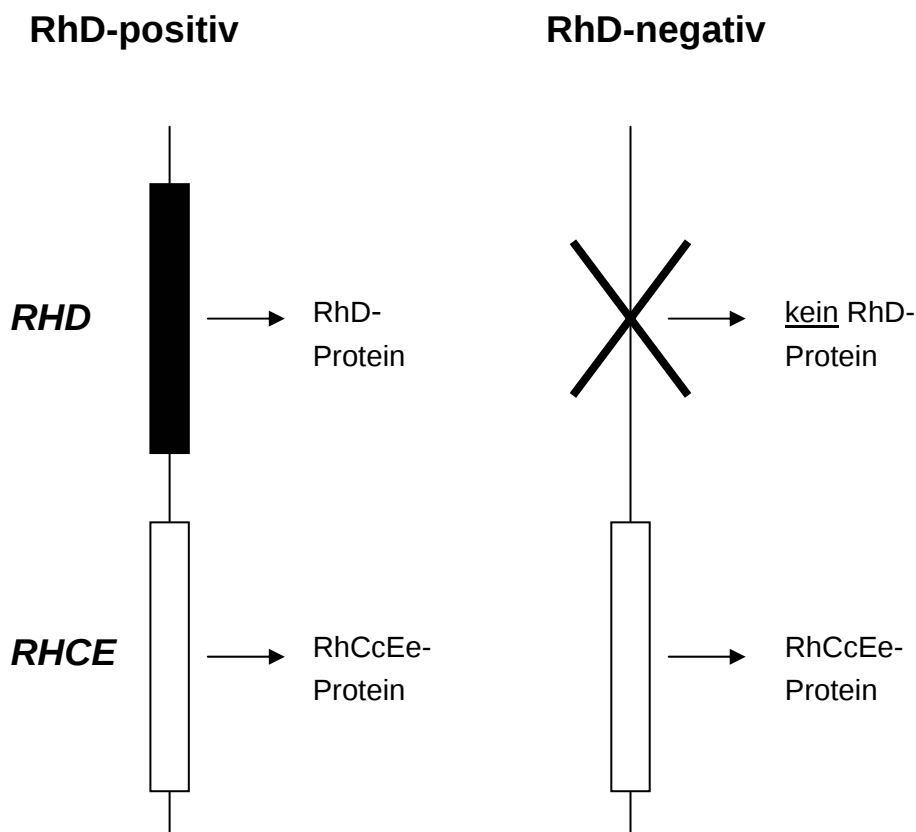


Abbildung 1: Der Rhesus-Genkomplex bei Kaukasiern. Das *RHD*-Gen steuert den Phänotyp Rh-positiv. Rh-negative Personen besitzen kein *RHD*-Gen [modifiziert nach Cartron; 1994].

Das Gen des Rhesus-assoziierten Glykoproteins, einem eng mit den Rhesus-Proteinen verbundenen Protein, liegt auf Chromosom 6 p11 bis 21.1. Es umfaßt ebenfalls 10 Exons und entspricht in seiner Struktur dem *RHD*- und *RHCE*-Gen [Matassi et al.; 1998]. Seine Sequenz stimmt zu 36% mit der der beiden *RH*-Gene überein [Ridgwell et al.; 1992]. Ein gemeinsamer Ursprung der Gene ist hier ebenfalls wahrscheinlich. Man vermutet, daß das Gen des Glykoproteins vor 250 bis 346 Millionen Jahren durch eine Duplikation aus dem *RH*-Gen hervorgegangen sein muß. Eine zweite Gen-Duplikation, die zur Trennung von *RHD* und *RHCE* führte, fand vor 5 bis 12 Millionen Jahren statt [Matassi et al.; 1998].

Exon	1		2						
Nukleotid	1-148		149-335						
Substitution	48		150	178	201	203	307		
RhD	G		T	A	G	G	T		
RhC	C		T	A	G	G	T		
Rhc	G		C	C	A	A	C		
RhE			C		A				
Rhe			C		A				

Exon	3				4				
Nukleotid	336-486				487-635				
Substitution	361	380	383	455	505	509	514	544	577
RhD	T	T	A	A	A	T	A	T	G
RhC	A	C	G	C	C	G	T	A	A
Rhc	A	C	G	C	C	G	T	A	A
RhE	A	C	G	C	C	G	T	A	A
Rhe	A	C	G	C	C	G	T	A	A

Exon	4		5						
Nukleotid	487-635		636-801						
Substitution	594	602	667	676	697	712	733	744	787
RhD	A	C	T	G	G	G	G	C	G
RhC	T	G	G		C	A	C	T	A
Rhc	T	G	G		C	A	C	T	A
RhE	T	G	G	C	C	A	C	T	A
Rhe	T	G	G	G	C	A	C	T	A

Exon	5		6		7				
Nukleotid	636-801		802-939		940-1073				
Substitution	800		916	932	941	968	974	979	985
RhD	A		G	A	G	C	G	A	G
RhC	T		A	G	T	A	T	G	C
Rhc	T		A	G	T	A	T	G	C
RhE	T		A	G	T	A	T	G	C
Rhe	T		A	G	T	A	T	G	C

Exon	7								
Nukleotid	940-1073								
Substitution	986	989	992	1025	1048	1053	1057	1059	1060
RhD	G	A	A	T	G	C	G	A	G
RhC	A	C	T	C	C	T	T	G	A
Rhc	A	C	T	C	C	T	T	G	A
RhE	A	C	T	C	C	T	T	G	A
Rhe	A	C	T	C	C	T	T	G	A

Exon	7	9	10
Nukleotid	940-1073	1154-1227	1228-1251
Substitution	1061	1193	1358
RhD	C	A	C
RhC	A	T	-
Rhc	A	T	-
RhE	A	T	-
Rhe	A	T	-

Tabelle 2: Polymorphismen in der kodierenden Sequenz des *RHD*- und *RHCE*-Gens [modifiziert nach Gassner et al., 1997]

1.4 Rhesus-Proteine

Rhesus-Proteine wurden erstmals 1982 isoliert [Moore et al.; 1982]. Es handelt sich um nicht-glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 32 kDa und hydrophoben Eigenschaften [Chérif-Zahar et al.; 1990]. Sie sind ausschließlich auf Erythrozyten und deren Vorläuferzellen nachzuweisen. Dort sind sie in der Erythrozytenmembran lokalisiert. Rhesus-Proteine werden nur bei Co-Existenz des Rh-assoziierten Glykoproteins (RhAG) exprimiert. Sie bilden in der Erythrozytenmembran einen Komplex, bestehend aus zwei Rh-assoziierten Glykoproteinen und zwei RhCcEe- bzw. RhD-Proteinen [Huang; 1997]. Weitere mit ihnen assoziierte Proteine sind das LW- und das Fy-Glykoprotein, Glykophorin B und das Integrin-assoziierte Protein [Avent, Reid; 2000].

Die Rhesus-Proteine besitzen zwölf transmembranäre Domänen, deren Hauptanteil zwischen der Phospholipid-Doppelschicht liegt und die durch kurze

hydrophile Schleifen verbunden sind [Eyers et al.; 1994]. Sechs Schleifen liegen extra- und fünf intrazellulär.

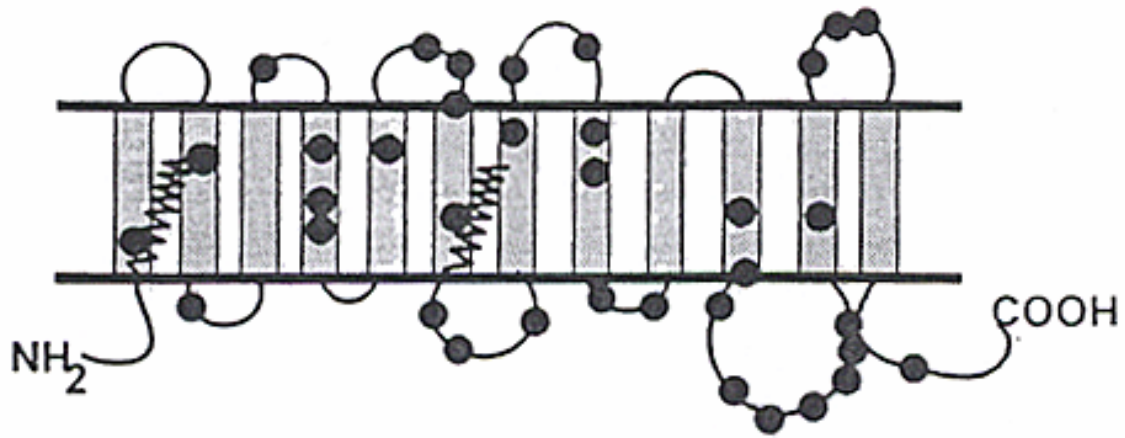


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Topologie des RhD-Polypeptids.

Diskrepante Aminosäuren zwischen dem RhD- und dem RhCcEe-Polypeptid sind als schwarze Kreise dargestellt [nach Avent et al.; 1997c]. Das RhAg entspricht in seinem Aufbau dem RhD- und RhCcEe-Polypeptid.

Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende sind zum Zytoplasma orientiert [Avent et al.; 1992 und Eyers et al.; 1994]. Die Proteine sind durch Palmitoylierung mit der Zellmembran verbunden [de Vetten, Agre; 1988].

Negative Ladungen finden sich in den transmembranären Helices 1, 2, 3 und 5. Eine negative Ladung in der 12. Helix findet man nur im RhD-Protein. Die genaue Funktion dieser Ladungen ist nicht bekannt, man vermutet jedoch eine Beteiligung am transmembranösen Ionentransport.

Das RhD-Protein trägt das D-Antigen. Die jeweiligen C/c- bzw. E/e-Antigene entstehen nicht, wie früher angenommen, durch ein unterschiedliches mRNA-Splicing, sondern werden von einem gemeinsamen RhCcEe-Protein getragen [Avent et al.; 1996]. RhD-positive Individuen besitzen beide Proteine, RhD-negative nur das RHCcEe-Protein.

Die Strukturen beider Proteine weisen nur geringe Unterschiede auf. Bei einer Gesamtlänge der Polypeptidkette von 417 Aminosäuren besteht eine Divergenz von 8,4%, was ca. 32 bis 35 Aminosäuresubstitutionen entspricht [Avent et al.; 1990; Mouro et al.; 1994]. Nur 8 der RhD-spezifischen Aminosäuren befinden sich außerhalb der Phospholipiddoppelschicht bzw. in der Nähe der Zelloberfläche [Cartron; 1994], die übrigen liegen transmembranär oder sind zum Zytoplasma hin orientiert.

C und c unterscheiden sich an vier Positionen: Cys16Trp, Ile60Leu, Ser68Asn und Ser103Pro. Der Polymorphismus Ser103Pro auf der zweiten extrazellulären Schleife scheint für die Antigenität verantwortlich zu sein [Avent et al.; 1997a].

Eine einzige Substitution auf der vierten extrazellulären Schleife unterscheidet E von e: Pro226Ala [Mouro et al.; 1993]. Varianten, die die Expression des e-Antigens verändern, sind beschrieben: Val245Leu [Steers et al.; 1996], Cys16 Trp [Westhoff et al.; 1998] und eine Deletion von Arginin an Stelle 229 [Huang et al.; 1997].

Die für die Antikörperbindung verantwortlichen Epitope befinden sich auf den extrazellulären Schleifen. Sie werden durch monoklonale Antikörper definiert. Jeweils fünf bis acht Aminosäuren scheinen einem Epitop zu entsprechen [Scott et al.; 2000].

Bei Veränderungen der Aminosäuresequenz wandelt sich die Epitopstruktur und damit die Qualität der Antikörperbindung [Huang et al.; 2000]. Für die RhD-Antigenstruktur ist die Region von Aminosäure 350 bis 354 auf der sechsten Schleife von Bedeutung [Zhu et al.; 1999]. Die Aminosäuren an Stelle 350 (Asp) und 353 (Gly) sind für die Ausbildung von epD3 verantwortlich, die AS an Stelle 354 (Ala) für epD9 [Liu et al.; 1999].

Bezüglich der Anzahl der Epitope des RhD-Proteins auf den extrazellulären Polypeptid-Schleifen existieren unterschiedliche Modelle. Ursprünglich ging man von 9 RhD-Epitopen (epD1 bis epD9; 9-Epitop-Modell) aus, neuere

Studien zeigen die Existenz von 30 oder mehr Epitopen [Scott et al.; 1996/97]. Unlängst wurden 24 RhD-Epitope charakterisiert [Scott et al.; 2000]. Für RhE sind 4 verschiedene Epitope beschrieben [Scott et al.; 2000].

Trotz der geringen Sequenzunterschiede sind keine D-Epitope auf dem RhCcEe-Protein und weder C- noch E-Antigene auf dem RhD-Protein nachweisbar [Avent, Reid; 2000].

Die Rhesus-Proteine scheinen eine wichtige Bedeutung für die Integrität der Erythrozytenmembran zu haben. Erythrozyten, die keine Rhesus-Proteine besitzen (Rh_{null}-Zellen), zeigen morphologische und funktionelle Abnormitäten. Betroffene Individuen leiden an einer hämolytischen Anämie unterschiedlicher Ausprägung, Stomato-Sphärocytose, abnormer osmotischer Stabilität und veränderter Kationenpermeabilität der Erythrozytenmembran [Ballas et al.; 1984]. Den Rhesus-Proteinen wird eine physiologische Rolle in der Aufrechterhaltung der Membranstabilität und der Regulation des Zellvolumens der Erythrozyten zugeschrieben [Agre, Cartron; 1991]. Es bestehen Ähnlichkeiten zwischen den Proteinsequenzen des RhAG und NH₄⁺-Transportern [Marini et al.; 1997]. Unlängst konnte der Nachweis erbracht werden, daß das RhAG die Fähigkeit besitzt, Ammonium aus Zellen zu transportieren. Es wird vermutet, daß es als Teil des Rh-Komplexes den Transport von akkumuliertem Ammonium aus Erythrozyten fördert [Marini et al.; 2000].

1.5 Partielles D und schwache D-Phänotypen (D-weak)

Individuen, die ein qualitativ oder quantitativ verändertes RhD-Polypeptid auf ihren Erythrozyten exprimieren, gehören je nach Veränderung zu einem partiellen oder schwachen D-Phänotyp (D-weak).

Erythrozyten von Individuen, die partielle D-Varianten aufweisen, tragen nicht alle RhD-Epitope. Die RhD-Proteine sind qualitativ verändert. Nach Transfusionen mit RhD-positivem Blut bzw. durch eine Schwangerschaft mit einem RhD-positiven Fetus können diese Personen Antikörper gegen nicht vorhandene Epitope ausbilden [Cartron; 1994].

Für eine Charakterisierung werden die D-Varianten analog zum 9-Epitop-Modell in sechs Gruppen eingeteilt (D^I bis D^{VI}) [Lomas et al.; 1993]. Die Anzahl der Epitope variiert in den jeweiligen Gruppen [Tippett; 1988]. Die Gruppe D^{III} besitzt mit neun die meisten, die Gruppe D^{VI} mit drei die wenigsten Epitope (siehe Tabelle 3). Mittlerweile sind weitere partielle D-Phänotypen bekannt (z.B. D^{DFW} , D^{HMi} , D^{DNU}).

Obwohl die Immunogenität der D-Varianten gering ist, sind Inkompatibilitäten zwischen Mutter und Kind mit verschiedenen Blutgruppenkonstellationen beschrieben.

Bei einer D^{VI} -phänotypischen Mutter kam es während der Schwangerschaft zu einer klinisch relevanten Immunisierung durch ihr RhD-positives Kind [Lacey et al.; 1983]. In einem weiteren Fall ist das Krankheitsbild des Morbus haemolyticus neonatorum bei einem Kind mit D^{Va} -Phänotyp beschrieben. Die Mutter war RhD-negativ [Mayne et al.; 1990].

MAb-D Anti-	D-Varianten						
	II	IIIa	IVa	IVb	Va	VI	VII
epD1	+	+	-	-	-	-	+
epD2	+	+	-	-	+	-	+
epD3	+	+	-	-	+	+	+
epD4	-	+	+	-	+	+	+
epD5	+	+	+	+	-	-	+
epD6/7	+	+	+	+	+	-	+
epD8	+	+	+	+	+	-	-
epD9	-	+	-	-	+	+	+

Tabelle 3: D-Epitope auf D-Zellen. Einteilung nach dem 9-Epitop-Modell. Die Analyse erfolgte mit humanen monoklonalen Antikörpern [Tippett, 1988 und Lomas et al.; 1993].

D-Varianten können durch Rearrangement (z. B. crossing over) zwischen dem *RHD*- und dem *RHCE*-Gen entstehen. Bei einigen Typen sind ein oder mehrere Exons des *RHD*-Gens gegen die korrespondierenden Segmente des *RHCE*-Gens ausgetauscht, so daß Fusionsproteine gebildet werden [Avent, Reid; 2000]. Das Ausmaß des Rearrangements variiert von einem Nukleotidaustausch in der Gruppe D^{II} bis hin zum Austausch von fünf Exons in D^{DBT}.

Einige Varianten (D^{VII}, D^{DFW}, D^{HMi}, D^{DNU}, D^{DNB}) zeigen Veränderungen, die weder im *RHD*- noch im *RHCE*-Gen zu finden sind. Als Ursache werden Spontanmutationen angenommen [Huang et al.; 2000].

Die Variante D^{VI} hat die größte klinische Relevanz. Ihr Anteil innerhalb der D-Varianten beträgt 6-10%. Sie liegt bei 0,02 bis 0,05% der kaukasischen Bevölkerung vor und zeigt aufgrund der geringen Epitopanzahl am seltensten

eine positive Reaktion mit polyklonalen anti-D-Seren [Wagner et al.; 1995]. Nur 15% der unselektierten und 35% der selektierten polyklonalen anti-D-Seren reagieren mit D^{VI}-Zellen [Mouro et al.; 1994]. Nach dem 9-Epitop-Modell fehlen epD1, D2 und D5-8 bzw. epD1-4, 7-22 und 26-29 nach dem 30-Epitop-Modell [Mouro et al.; 1994]. Es wurden drei verschiedene Typen gefunden [Wagner et al.; 1998].

Die Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion schreiben vor, daß zur serologischen RhD-Bestimmung bei Patienten immer zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper eingesetzt werden müssen. Beide dürfen das D^{VI}-Protein nicht erkennen. Dieses Vorgehen stellt sicher, daß D^{VI}-Individuen als RhD-negativ typisiert und im Falle einer Transfusion mit RhD-negativem Blut versorgt werden [Müller et al.; 2001].

Nicht zu verwechseln sind D-Varianten mit den schwachen D-Phänotypen (D-weak, früher D^u), bei denen die Expression des D-Antigens quantitativ verändert ist. Auch diese Gruppe kann in der konventionellen RhD-Diagnostik erhebliche Probleme bereiten. Individuen mit schwachem D finden sich bei 0,2 bis 1% in der weißen Bevölkerung [Wagner et al.; 1995]. Bislang konnte keine anti-RhD-Antikörperproduktion durch D-weak Individuen nachgewiesen werden. Die verminderte Anzahl von RhD-Proteinen auf der Erythrozytenmembran wurde lange durch herabgesetzte Genexpression [Spence et al.; 1994] bzw. posttranskriptionelle Veränderungen erklärt [Rouillac et al.; 1996]. Man nimmt jedoch an, daß viele D-weak Individuen Mutationen des *RHD*-Gens und strukturell veränderte RhD-Proteine besitzen.

Eine neuere Studie über schwache D-Phänotypen zeigt Veränderungen in den kodierenden Sequenzen des *RHD*-Gens. Es wurden 16 Varianten gefunden, wobei keine der 161 untersuchten D-weak Proben der Wildtyp-Sequenz des *RHD*-Gens entspricht. Als Ursache der meisten Varianten fanden sich Punktmutationen zwischen Position 267 und 397. Andere Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz liegen zwischen den Aminosäuren 2-13, 179-225, 267-397 und um Position 149. Alle Veränderungen sind im RhD-Protein intrazellulär bzw. transmembranär lokalisiert [Wagner et al.; 1999].

Die Gruppen D-weak 4 und 14 zeigen Aminosäuresubstitutionen, die in identischer Form im RhCcEe-Protein vorkommen. Da Überlappungen zwischen den partiellen und den schwachen D-Phänotypen wahrscheinlich sind [Huang et al.; 2000], wird gefordert, die Definitionen durch den gemeinsamen Begriff „aberrantes D“ zu ersetzen [Avent et al; 2000].

1.6 AB0-Blutgruppen

Neben Rhesus ist AB0 das klinisch wichtigste Blutgruppensystem. Es wurde erstmals 1900 beschrieben [Landsteiner].

Die AB0-Antigene kommen, im Gegensatz zu anderen Blutgruppenantigenen, nicht nur auf Erythrozyten, sondern auch auf Leukozyten, Epithel- und Gewebezellen vor. Bei einem Teil der Bevölkerung können sie als lösliche Glykoproteine im Serum und anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Sekretoren).

Es sind fünf Hauptallele beschrieben: A1, A2, B, 01 und 02, ebenso existieren zahlreiche Varianten und Untergruppen. Insgesamt sind bislang 26 Allele identifiziert [Hallensleben et al.; 1999].

Die jeweiligen Merkmale (Antigene) des AB0-Blutgruppensystems werden durch endständige Zuckerreste der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen und Glykolipiden an der Oberfläche von Zellen definiert. Spezifische Glykosyltransferasen katalysieren diese Modifikationen. Die antigenen Eigenschaften werden also nicht direkt durch ein A-, B- oder 0-Gen, sondern durch die genetisch festgelegte Präsenz und Aktivität der Glykosyltransferasen bestimmt.

Die Übertragung des Substrates N-Acetyl-Galactosamin durch die A- und Galactose durch die B-Transferase führt zu den Blutgruppenmerkmalen A bzw.

B. Besitzt ein Individuum beide Transferasen, gehört es der Blutgruppe AB an, besitzt es weder A- noch B-Transferase, gehört es zur Blutgruppe 0.

Im Gegensatz zum Rhesus-System sind die AB0-Blutgruppen durch sogenannte „natürliche“ reguläre Antikörper (Isoagglutinine) definiert. Diese richten sich gegen diejenigen erblichen Blutgruppenantigene A bzw. B, welche dem jeweiligen Individuum selbst fehlen. Individuen mit Blutgruppe AB besitzen keine Isoagglutinine, diejenigen mit Blutgruppe 0 beide. Es wird diskutiert, daß sie nach der Besiedelung des Darmes mit Bakterien gebildet werden, welche den AB-Blutgruppen ähnliche Oberflächenantigene tragen. Die AB0-Blutgruppenantigene und die entsprechenden Isoagglutinine sind in der Regel erst nach den ersten beiden Lebensjahren vollständig ausgeprägt.

Die Gene für die A- und B-Transferasen liegen auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9 q34) [Ferguson-Smith et al.; 1976]. Sie bestehen aus sieben Exons mit 1062 Basenpaaren. Die Gensequenzen der einzelnen Allele unterscheiden sich nur durch wenige Basensubstitutionen bzw. Deletionen [Yamamoto et al.; 1990], welche auf Exon 6 und 7 liegen [Olsson, Chester; 1995].

Die Gensequenzen der A- und B-Transferasen unterscheiden sich in sieben Positionen, die mit dem Austausch von vier der insgesamt 353 Aminosäuren einhergehen [Yamamoto, Hakomori; 1990].

Die Allele A1 und A2 unterscheiden sich in zwei Nukleotiden: einer Substitution an Position 467 und einer Deletion an Position 1059. Letztere führt durch Verschiebung des Leserasters zu einer um 21 Aminosäuren längeren Transferase [Yamamoto et al.; 1992]. Die Enzymaktivität dieser A2-Transferase ist fünf- bis zehnmal schwächer als die der A1-Transferase. Die Antigendichte der Erythrozyten von A2-Individuen liegt im Vergleich mit A1-Individuen bei weniger als 20 Prozent [Schachter, Michaels; 1971].

Die meisten Personen mit der Blutgruppe 0 besitzen das 01-Allel, dessen Sequenz weitestgehend dem A1-Allel entspricht [Yamamoto et al.; 1990]. Eine Deletion des Nukleotids an Position 261 führt jedoch bei 01-Individuen zu einem Stopcodon. Theoretisch ist die Expression eines Proteins mit nur 118 Aminosäuren ohne Glykosyltransferase-Aktivität möglich. Bislang wurde ein entsprechendes Protein jedoch nicht identifiziert [Müller et al.; 2001].

	Exon 6		Exon 7								
	261	297	467	526	657	703	796	802	803	930	1060
A1	G	A	C	C	C	G	C	G	G	G	C
A2			T								–
B		G		G	T	A	A		C	A	
01	–										
02		G		G				A			

Tabelle 4: AB0-Sequenzunterschiede. Die Unterschiede beziehen sich jeweils auf die Sequenz des A1-Allels. [modifiziert nach Gassner et al.; 1996]

1.7 Morbus haemolyticus neonatorum

1.7.1 Krankheitsbild

Der Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) ist eine immunhämolytische Anämie bei Feten und Neugeborenen. Er wird durch irreguläre erythrozytäre, plazentagängige Antikörper der Mutter hervorgerufen. Auslöser ist eine Blutgruppenunverträglichkeit zwischen Mutter und Kind. Meist liegt eine Inkompatibilität im Rhesussystem vor: das Kind ist RhD-positiv und die Mutter RhD-negativ. Auch c- und AB0-, seltener C-, E- oder andere Inkompatibilitäten

können zu leichteren Fällen des Krankheitsbildes führen [Le Van Kim et al.; 1994].

Zu einer Sensibilisierung der Mutter kann es während Schwangerschaft und Entbindung infolge fetomaternaler Transfusionen kommen. Weitere Ursachen für eine Immunisierung können Bluttransfusionen mit inkompatiblen Blut, Aborte und Schwangerschaftsabbrüche sein.

Eine zweite Antigenexposition löst die Bildung plazentagängiger IgG-Antikörper bei der Mutter aus. Diese können zu zytolytischer Erythrozytenzerstörung führen und das Krankheitsbild des Morbus haemolyticus neonatorum in unterschiedlicher Ausprägung von einer einfachen Neugeborenenanämie bis zum Hydrops universalis congenitus verursachen. Das durch die Hämolyse freigesetzte Bilirubin wird vor allem im Bereich der Stammganglien gespeichert (Kernikterus) [Riede, Schaefer; 1993]. Der Hydrops fetalis manifestiert sich in 50% der Fälle vor der 34. Schwangerschaftswoche [Bowman; 1998].

1.7.2 Häufigkeit

Die Anti-D-Prophylaxe hat das Auftreten irregulärer erythrozytärer Antikörper infolge Rhesus-Inkompatibilität in der westlichen Welt reduziert. In der Bundesrepublik Deutschland treten pro Jahr ca. 100-200 pränatal behandlungspflichtige Fälle auf [Crombach et al.; 1995]. In den USA fand sich 1991 eine Inzidenz des MHN von 10,6 Fällen auf 10000 Geburten [Chávez et al.; 1991].

In Großbritannien wird eine Sensibilisierung von 1-2% der RhD-negativen Frauen beschrieben, dort sterben durchschnittlich 50 Neugeborene im Jahr an den Folgen eines MHN [Urbaniak; 1998].

Trotz guter intrauteriner Therapiemöglichkeiten mit einer Überlebensrate von 75-90% stellt der Morbus haemolyticus neonatorum noch immer eine schwerwiegende Schwangerschaftskomplikation dar [Crombach et al.; 1995].

1.7.3 Diagnostik

Bei jeder Schwangeren sollte möglichst früh die ABO-Blutgruppenzugehörigkeit und der Rh-Faktor D bestimmt und ein Antikörpersuchtest mit Testzellen, die die Antigene D, C, c, E, e, Kell, Fy und S tragen, durchgeführt werden. Die Antikörpersuche erfolgt mittels des indirekten Antiglobulintests (Coombs-Test). Bei Nachweis von Antikörpern sollte deren Spezifität und Titerhöhe aus derselben Blutprobe bestimmt werden. Liegt der anti-D-Titer über 1:8, ist eine engmaschige Überwachung der Schwangerschaft erforderlich.

Ein zweiter Antikörpersuchtest ist bei allen Schwangeren in der 24.-27. SSW durchzuführen.

Der Antikörpertiter erfaßt jedoch nicht das Ausmaß der Sensibilisierung und das Hämolyserisiko. Hierfür können spektrophotometrische Untersuchungen des Fruchtwassers auf bilirubinoide Farbstoffe durchgeführt werden. Wiederholte Amniozentesen zeigen den Verlauf der Bilirubinkonzentration im Fruchtwasser und lassen mögliche Verschlechterungen des kindlichen Zustandes erkennen. In Abhängigkeit von Anamnese und Ultraschallbefund wird die erste Amniozentese durchgeführt. Wurde in einer früheren Schwangerschaft bereits eine Rhesus-Sensibilisierung diagnostiziert, führt man die erste Fruchtwasseruntersuchung in der 20.-22. Woche durch. Bei unbelasteter Anamnese, niedrigem Antikörpertiter und normalem Sonografiebefund wird sie in der Regel in der 28. SSW vorgenommen. Sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen nicht eindeutig interpretierbar, besteht die Gefahr, die Mutter eines RhD-negativen Feten vielen unnötigen, invasiven und risikoreichen Untersuchungen auszusetzen [Lighten et al.; 1995].

Regelmäßig durchgeführte Ultraschalluntersuchungen stellen ein weiteres diagnostisches Hilfsmittel dar. Aszites, Hydrothorax und beginnende Ödembildung geben Hinweise auf eine mäßige bis schwere Anämie mit beginnender Herzinsuffizienz. Als Folge der kompensatorischen

extramedullären Blutbildung entwickelt sich eine Hepatosplenomegalie [Martius et al.; 1996].

Die pränatale Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors erfolgte bislang durch Abnahme von Nabelschnurblut aus der fetalen Umbilikalvene. Neben serologischen Blutgruppen- und Hämoglobinbestimmungen können mit dem direkten Coombs-Test an fetale Erythrozyten gebundene Antikörper bestimmt werden. Die Nabelschnurpunktion kann ab der 18.-20. Schwangerschaftswoche erfolgen, die Abortrate beträgt 1-3% [Ghidini et al.; 1993]. Eine fetomaternale Transfusion tritt dabei in bis zu 40 % auf. Sie kann die mütterliche Immunisierung boostern und sekundär den Schweregrad der fetalen Anämie verstärken [Nicolini et al.; 1988].

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde erstmals Anfang der 90er Jahre zur Bestimmung der fetalen Blutgruppe eingesetzt [Bennett et al.; 1993]. Fetale DNA wird aus Fruchtwasser isoliert und mittels PCR zur Bestimmung des kindlichen Rhesusfaktors amplifiziert. Eine Amniozentese kann ab der 14.-16. Schwangerschaftswoche erfolgen. Die Abortrate liegt bei 0,3-1% und das Risiko der fetomaternalen Transfusion bei 2-3% [Bowman, Pollock; 1985]. Die Durchführung in früheren Schwangerschaftswochen ist ebenfalls beschrieben [Hanson et al.; 1992]. Für die Isolation fetaler DNA benötigt man nur 1-2 ml Fruchtwasser, für Karyotypisierungen müssen größere Mengen gewonnen werden.

Die Gewinnung von kindlichem Material ist auch mittels Chorionzottenbiopsie möglich. Es sind fetomaternale Hämorrhagien von bis zu 50% beschrieben, die zum Ansteigen des Antikörper-Titers und somit zu einem erhöhten Schwangerschaftsrisiko führen können [Warren et al.; 1985].

1.7.4 Therapie

Bei gesicherter fetaler Hämolyse bieten sich zwei therapeutische Alternativen: die intrauterine Transfusion oder die vorzeitige Entbindung. Faktoren wie der Gesamtzustand des Feten, Gestationsalter und Reifezustand der Lungen beeinflussen diese Entscheidung. Die intrauterine Transfusion mit ihren Gefahren muß gegen die extrauterine Morbidität und Mortalität infolge der Frühgeburtlichkeit abgewogen werden.

Das Risiko der intrauterinen Transfusion variiert stark und hängt von der Ausgangssituation des Feten sowie von Erfahrung und Routine des jeweiligen Zentrums ab. Sie ist ab der 22. Schwangerschaftswoche durchführbar [Martius et al.; 1996]. Früher wurden Erythrozytenkonzentrat-Injektionen in den Intraperitonealraum des Feten vorgenommen. Die ultraschallgesteuerte intravasale Transfusion in die Nabelschnurvene hat dieses Verfahren mittlerweile abgelöst. Die Transfusion muß bis zur Entbindung in der Regel mehrfach wiederholt werden, abhängig vom Hämoglobin-Wert des Kindes.

1.7.5 Prophylaxe

RhD-negativen Schwangeren wird in der 28.-30. Schwangerschaftswoche eine Standarddosis von 300 µg Anti-D-Immunglobulin injiziert, um bis zur Geburt eine Sensibilisierung der Mutter zu verhindern. Die Gabe erfolgt nur, wenn keine Anti-D-Antikörper nachweisbar sind. Das Datum der präpartalen Anti-D-Prophylaxe ist im Mutterpaß zu vermerken.

Nach der Geburt wird bei jedem Kind einer RhD-negativen Mutter der Rh-Faktor D unter Beachtung der Ergebnisse des direkten Coombstests bestimmt. Bei einem RhD-positiven Kind ist post partum eine weitere Standarddosis von 300 µg Anti-D-Immunglobulin innerhalb von 72 Stunden zu applizieren. 20 µg Anti-D sollen die Einschwemmung von 1 ml RhD-positivem Blut neutralisieren [Martius et al., 1996]. Die Gabe erfolgt auch dann, wenn nach der Geburt schwach

reagierende RhD-Antikörper bei der Mutter gefunden worden sind oder der direkte Coombstest beim Kind schwach positiv ist. Hierdurch soll ein schneller Abbau der in den mütterlichen Kreislauf übergetretenen RhD-positiven Erythrozyten bewirkt werden, um die Bildung von RhD-Antikörpern bei der Mutter zu verhindern.

RhD-negativen Frauen sollte nach einer Fehlgeburt bzw. einem Schwangerschaftsabbruch ebenfalls so bald wie möglich, spätestens nach 72 Stunden, Anti-D-Immunglobulin injiziert werden [Bundesausschuß der Ärzte und Krankenkassen: Mutterschaftsrichtlinien; 1999].

1.8 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die klinische Anwendbarkeit von RhD-Polymerasekettenreaktionen (PCR) in der Pränataldiagnostik zu untersuchen.

Für die DNA-Extraktion aus Fruchtwasser wurden vier verschiedene Methoden verwandt und bezüglich ihrer Durchführung und Ergebnisqualität verglichen.

Die Genotypisierung aller Fruchtwasserproben erfolgte mit zwei verschiedenen RhD-PCR-Methoden. Hierbei wurden verschiedene Polymorphismen des *RHD*-Gens untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse der PCR-Methoden erfolgte in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und ihre Anwendbarkeit. Die klinisch relevante Gruppe der RhD-negativen Mütter wurde in der Auswertung besonders berücksichtigt.

Bei diskrepanten Ergebnissen der beiden Methoden wurde eine dritte RhD-PCR durchgeführt.

Um eine eventuelle Kontamination des Amniozentese-punktats mit mütterlichen Zellen zu untersuchen, wurden alle Proben, bei denen die AB0-Blutgruppen von Mutter und Kind differierten, mit einer AB0-PCR untersucht.

Es sollte beurteilt werden, ob der Einsatz von PCR-Methoden in der klinischen Routine eine sinnvolle Ergänzung oder gar Alternative zu den bisher gängigen diagnostischen Methoden darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für diese Studie wurden 252 Fruchtwasserproben untersucht. Die Proben wurden mittels Amniozentese zwischen der 15. und 36. Schwangerschaftswoche (Median 16. SSW) im Rahmen der Pränataldiagnostik an der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen. Das Probenvolumen betrug zwischen 0,3 und 7 ml.

2.2 DNA-Isolationsmethoden

2.2.1 Erhitzen auf 90 °C

In einem Wärmeblock wurden 1-1,5 ml Fruchtwasser 60 min bei 90 ° C erhitzt. Die Hitze zerstört die zellulären Strukturen. Die fetale DNA konnte ohne weitere Arbeitsschritte in der PCR eingesetzt werden. Die Aufbewahrung erfolgte bei –20 °C.

2.2.2 Phenol-Extraktion

Die Fruchtwasserproben mit einem Volumen von 2 ml wurden 10 min mit 8160 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS gelöst. Eine 5minütige Zentrifugation mit 2040 x g folgte. Anschließend wurde das Pellet drei mal mit je 1 ml PBS gewaschen und 5 min mit 2040 x g zentrifugiert.

Nach Zugabe von 1 ml NLB (1 ml Tris 1M pH 8,3; 8 ml NaCl 5M; 400 µl EDTA 0,5M pH 8,0 ad 100 ml Aq. dest.) erfolgte eine 5minütige Zentrifugation mit 735 x g. Der Überstand wurde abgenommen und 325 µl NLB, 25 µl SDS und 63 µl Proteinase K zugefügt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurden 400 µl Phenol hinzupipettiert und die Probe 4 min mit 8160 x g zentrifugiert. Die organische Schicht wurde verworfen.

Durch Zugabe von 1500 µl Ethanol absolut und 80 µl Natriumacetat erfolgte eine Ethanol-Fällung. Nach 20minütiger Lagerung bei –20 °C wurde die Probe 20 min mit 7400 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 1000 µl 75%igem Ethanol erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nach Abnahme des Überstandes wurde die DNA in 200 µl TE-Puffer (1 ml Tris 1M pH 8,3; 20 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 ad 100 ml Aq. dest.; pH-Einstellung auf 8,0) gelöst und 2 Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

Die Aufbewahrung erfolgte bei –20 °C.

2.2.3 Kit „Extra Gene“ (Firma BAG, Lich)

Das Kit „Extra Gene“ ist gebrauchsfertig erwerbbar und zur Isolation genomischer DNA aus EDTA- und Citrat-Blut geeignet. Durch Abwandlung der vorgegebenen Isolationsschritte ist es zur Isolation fetaler DNA aus Fruchtwasser geeignet.

Es wurden 2 ml Fruchtwasser verwendet. Beim Einsatz von geringeren Probenmengen wurde das Restvolumen mit Aq. dest. aufgefüllt. Der erste Arbeitsschritt, die Lyse der Erythrozyten, entfiel. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend der Arbeitsanleitung. Die gewonnene DNA wurde in Aq. dest. gelöst und konnte unmittelbar nach der Isolierung in der PCR eingesetzt werden.

Die Aufbewahrung erfolgte bei –20 °C.

2.2.4 „QIAamp® Blood and Tissue Kit“ (Fa. Quiagen, Hilden)

Das „QIAamp® Blood and Tissue Kit“ ist zur Isolation genomischer DNA aus Blut und anderen menschlichen und tierischen Gewebe geeignet.

Es wurden 200 µl Fruchtwasser verwendet. Beim Einsatz von geringeren Probenmengen wurde das Restvolumen mit Aq. dest. aufgefüllt. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß der Anleitung des „QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit“-Handbuches. Die gewonnene DNA wurde in einem Fertigpuffer oder in Aq. dest. gelöst und konnte direkt in der PCR eingesetzt werden.

Die Aufbewahrung erfolgte bei –20 °C.

2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Im Photometer wurde die Konzentration der isolierten DNA bei der Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Berechnung des DNA-Gehaltes erfolgte nach folgender Formel:

Absorption bei 260 nm $\times$ 50 $\times$ Verdünnung der Probe = DNA-Menge in µg/ml.

2.4 RhD-Polymerasekettenreaktionen

2.4.1 Methode 1

2.4.1.1 Überblick

Mit dieser Polymerasekettenreaktion können zwei nicht überlappende Abschnitte des *RHD*-Genes amplifiziert werden. Es werden vier Primer verwendet.

Mittels des ersten Primerpaares wird auf dem 7. Exon des *RHCE*- und des *RHD*-Gens ein 136 Bp langes Fragment amplifiziert.

Mit dem zweiten Primerpaar wird eine 186 Bp lange Region amplifiziert, die für das *RHD*-Gen spezifisch ist. Primer 4 kann nur am 3'-Ende des 10. *RHD*-Exons binden, jedoch nicht an der korrespondierenden Stelle des *RHCE*-Gens.

Bei RhD-positiven Individuen sind zwei DNA-Fragmente nachweisbar, bei RhD-negativen Individuen nur ein Fragment. Die aus beiden Genen vervielfältigte 136 Bp-Region dient als interne PCR-Kontrolle [Bennett et al; 1993].

2.4.1.2 Primer

Primer 1 - sense 5' 941 - TGT GTT GTA ACC GAG T- 956 3'

Primer 2 - antisense 5' 1073 - ACA TGC CAT TGC CG - 1062 3'

Primer 3 - sense 5' 1252 - TAA GCA AAA GCA TCC AA - 1268 3'

Primer 4 - antisense 5' 1437 - ATG GTG AGA TTC TCC T - 1422 3'

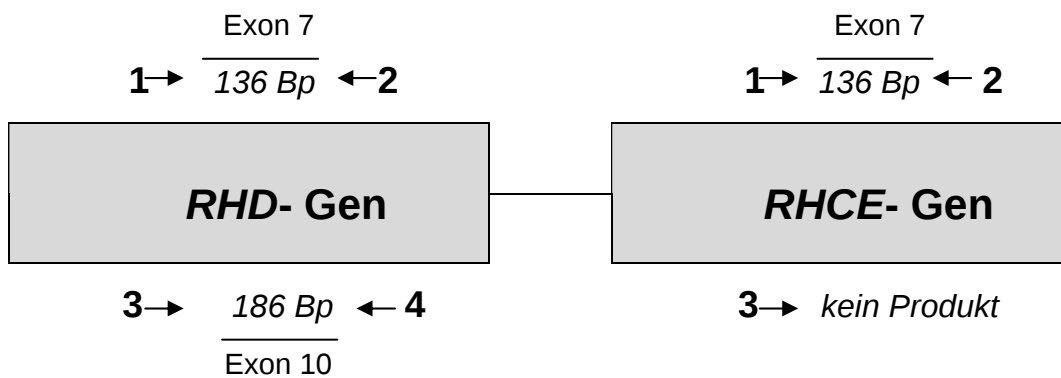


Abbildung 3: Methode 1 - Primerbindung beim RhD-positiven Individuum.

Primer 1 und 2 amplifizieren ein 136 Bp langes Produkt des *RHD*- und des *RHCE* Gens. Dieses Produkt dient als interne Kontrolle, es muß in jeder Probe nachweisbar sein. Primer 3 und 4 amplifizieren ein 186 Bp großes Produkt nur beim RhD-positiven Individuum.

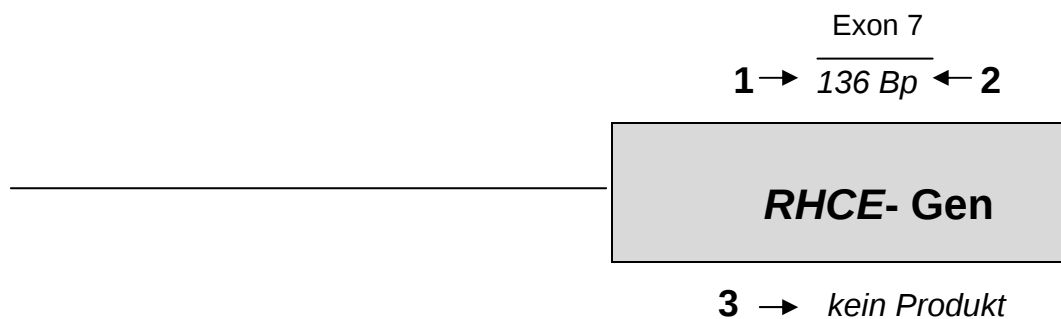


Abbildung 4: Methode 1 - Primerbindung beim RhD-negativen Individuum.

Beim RhD-negativen Individuum wird ausschließlich das 136 Bp lange Segment amplifiziert.

2.4.1.3 PCR-Ansatz und Reaktionszyklen

Für eine einzelne Reaktion wurden 1 µg genomische DNA, 20 pmol jedes der vier Primer, 50 mM dNTP und 2 U Taq Polymerase in einem Puffer mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂ im Gesamtvolumen von 50 µl benötigt [modifiziert nach Bennett et al.; 1993]. Als Kontrolle wurden in jedem Versuchsansatz eine RhD-positive und eine -negative DNA, sowie eine Leerprobe mit Aq. dest. mitgeführt.

	Temperatur	Dauer
30 x		
<i>Denaturierung</i>	92 °C	1 min
<i>Primer-Bindung</i>	49 °C	1 min
<i>Primer-Synthese</i>	72 °C	1 min

Tabelle 5: Methode 1 - Reaktionszyklen. Die Denaturierung der DNA erfolgt bei 92°C für die Dauer einer Minute. Eine einminütige Primer-Bindung bei 49°C und eine einminütige Synthese bei 72°C folgen. Es werden 30 Zyklen durchgeführt. Abschließend folgt eine Synthesephase von 9 min bei 72 °C [nach Bennett et al.; 1993].

2.4.2 Methode 2

2.4.2.1 Überblick

Das *RHD*-Gen unterscheidet sich vom *RHCE*-Gen durch eine 600 Bp-lange Deletion zwischen Exon 4 und 5. Auf diesem Sequenzunterschied basiert eine von Arce entwickelte RhD-PCR-Methode [Arce et al.; 1993], die später modifiziert wurde [Simsek et al.; 1995].

Ein Primerpaar amplifiziert die Region zwischen Exon 4 und 5. Das Reaktionsprodukt des *RHD*-Gens hat eine Länge von 600 Bp, das des *RHCE*-Gen von 1200 Bp. Bei RhD-positiven Individuen werden zwei, bei RhD-negativen nur ein DNA-Fragment amplifiziert.

Das Amplifikat des *RHCE*-Gens dient als interne Reaktionskontrolle.

2.4.2.2 Primer

<i>Primer 5</i> - sense	5' 607 -ACG ATA CCC AGT TTG TCT- 624 3'
<i>Primer 6</i> - antisense	5' 768 -TGA CCC TGA GAT GGC TGT- 751 3'

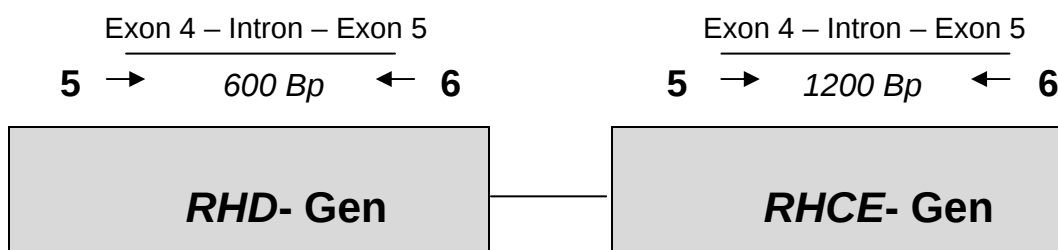


Abbildung 5: Methode 2 - Primerbindung beim RhD-positiven Individuum.

Die Primer 5 und 6 amplifizieren beim *RHD*-Gen ein 600 Bp langes, beim *RHCE*-Gen ein 1200 Bp langes Segment.

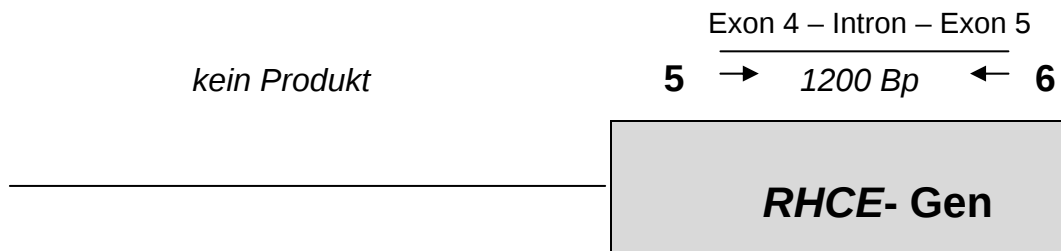


Abbildung 6: Methode 2 - Primerbindung beim RhD-negativen Individuum.

Beim RhD-negativen Individuum wird nur das 1200 Bp amplifiziert, das 600 Bp lange Segment des *RHD*-Gens fehlt.

2.4.2.3 PCR-Ansatz und Reaktionszyklen

Für jede einzelne Reaktion wurden 1 µg genomische DNA, 20 pmol jedes der vier Primer, 50 mM dNTP und 2 U Taq Polymerase in einem Puffer mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂ im Gesamtvolumen von 50 µl benötigt [modifiziert nach Simsek et al.; 1995]. Als Kontrolle wurden in jedem Versuchsansatz eine RhD-positive und eine -negative DNA, sowie eine Leerprobe mit Aq. dest. mitgeführt.

	Temperatur	Dauer
35 x		
<i>Denaturierung</i>	95 °C	1,0 min
<i>Primer-Bindung</i>	55 °C	1,5 min
<i>Primer-Synthese</i>	72 °C	2,5 min

Tabelle 6: Methode 2 - Reaktionszyklen. In 35 Zyklen erfolgt je eine einminütige Denaturierung bei 95°C, eine anderthalbminütige Primerbindungsphase bei 55°C und eine zweieinhalbminütige Synthese bei 72°C. Eine initiale Denaturierung von 5 min bei 95°C und eine abschließende Synthese von 9 min bei 72°C erfolgen zusätzlich [nach Simsek et al.; 1995].

2.4.3 Methode 3

2.4.3.1 Überblick

Durch den Einsatz von 8 Primerpaaren (16 Primer) wird bei dieser sequenzspezifischen PCR die Existenz von 8 der 10 Exons des *RHD*-Gens nachgewiesen [Gassner et al.; 1997]. Die Amplifikation der RhD-spezifischen Exons erfolgt aufgrund der Sequenzunterschiede des *RHD*- und des *RHCE*-Gens. In Exon 1 und 8 finden sich keine Unterschiede.

Reaktion	1	2	3	4	5	6	7	8
Exon	2	3	4	5	6	7	9	10
spezifisch für	D/C	D	D	D	D	D	D	D
Nukleotid	201 307	383	602	676 787	916	1048	1193	1255
Produktlänge (Bp)	148	113	122	157	132	122	83	147

Tabelle 7: Methode 3 – einzelne Reaktionen der RhD-PCR.

[modifiziert nach Gassner et al.; 1997]

2.4.3.2 Primer

Die Namensgebung der Primer erfolgte nach dem zu amplifizierenden Exon und dem jeweiligen Nukleotid.

Zusätzlich wurde in jeder Reaktion als interne PCR-Kontrolle eine konservierte Sequenz des Genlokus des humanen Wachstumshormones (GH = growth hormone) amplifiziert.

Primer-Sequenzen in Introns sind als Kleinbuchstaben dargestellt.

Exon 2

Primer 2-201 5' -GCT TGG GCT TCC TCA CCT CG- 3'

Primer 2-307 5' -CAG TGT GAT GAC CAC CTT CCC AGA- 3'

Exon 3

Primer 3-383 5' -TTG TCG GTG CTG ATC TCA GTG GA- 3'

Primer 3-451 5' -ACT GAT GAC CAT CCT CAG GTT GCC- 3'

Exon 4

Primer 4-527 5' -ACA TGA TGC ACA TCT ACG TGT TCG C- 3'

Primer 4-602 5' -CAG ACA AAC TGG GTA TCG TTG CTG- 3'

Exon 5

Primer 5-676 5' -ATG TTC TGG CCA AGT GTC AAC TCT G- 3'

Primer 5-787 5' -ctg ctc acC TTG CTG ATC TTC CC- 3'

Exon 6

Primer 6-826 5' -TTA TGT GCA CAG TGC GGT GTT GG- 3'

Primer 6-916 5' -CAG GTA CTT GGC TCC CCC GAC- 3'

Exon 7

Primer 7-967 5' -GTT GTA ACC GAG TGC TGG GGA TTC- 3'

Primer 7-1048 5' -TGC CGG CTC CGA CGG TAT C- 3'

Exon 9

Primer 9-1168 5' -tat gca ttt aaa cag GTT TGC TCC TAA ATC- 3'

Primer 9-1193 5' -AGA AAA CTT GGT CAT CAA AAT ATT TAG CCT-3

Exon 10

Primer 10-1255 5' -TCC TCA TTT GGC TGT TGG ATT TTA AG- 3'

Primer 10-1358 5' -CAG TGC CTG CGC GAA CAT TG- 3'

GH 1 (5580) 5' -TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A- 3'
 GH 2 (5967) 5' -CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC- 3'

2.4.3.3 PCR-Ansatz und Reaktionszyklen

Für die Genotypisierung einer DNA-Probe wurden 8 Reaktionsansätze mit je einem Primerpaar, GH1 und 2 benötigt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl für jeden Ansatz, bestehend aus 0,2 µg genomischer DNA, 0,2 µM jedes Primers, 200 µM dNTP und 0,4 U Taq Polymerase in einem Puffer aus 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 µg/ml Kresolrot, 1,5 mM MgCl₂ und Glycerin (5%) [modifiziert nach Gassner et al.; 1997]. Als interne Kontrolle wurde in jedem Versuchsansatz eine RhD-positive und eine RhD-negative Probe, sowie eine Leerprobe mit Aq. dest. mitgeführt.

	Temperatur	Dauer
10 x		
<i>Denaturierung</i>	94 °C	10 sec
<i>Primer-Bindung</i>	65 °C	60 sec
20 x		
<i>Denaturierung</i>	94 °C	30 sec
<i>Primer-Bindung</i>	61 °C	60 sec
<i>Primer-Synthese</i>	72 °C	30 sec

Tabelle 8: Reaktionszyklen Methode 3. Zu Beginn erfolgt eine zweiminütige Denaturierung bei 94°C. Die ersten zehn Zyklen bestehen aus einer Denaturierung von 10 Sekunden bei 94°C und einer einminütigen Primerbindung bei 65°C. Die folgenden 20 Zyklen beinhalten eine 30sekündige Denaturierung bei 94°C, eine einminütige Primerbindung bei 61°C und eine 30sekündige Synthese bei 72°C [Gassner et al.; 1997].

2.5 AB0-PCR: Methode 4

2.5.1 Überblick

Die Genotypisierung der wichtigsten Allele des AB0-Systems erfolgt bei dieser Methode durch die Verwendung von sequenzspezifischen Primern. A1 und A2, B, sowie 01 und 02 können differenziert werden [Gassner et al.; 1996].

Acht PCR-Ansätze ermöglichen den Nachweis der genannten AB0-Allele in jeder hetero- und homozygoten Kombination.

2.5.2 Primer

Die Benennung der Oligonukleotide erfolgte nach der Position ihres 3'-Endes auf der cDNA-Sequenz, dem zu amplifizierenden Allel und der Laufrichtung (s = sense, as = antisense). Der erste Primer jeder Gruppe ist nicht spezifisch („all“). Er wird in zwei unterschiedlichen Reaktionen mit je einem der zwei allelspezifischen Primer eingesetzt.

Zusätzlich wurde in jeder Reaktion als interne PCR-Kontrolle eine konservierte Sequenz des Genlokus des humanen Wachstumshormones (GH = growth hormone) amplifiziert.

Allel 01

345-all-as	5' -aTa Tat ATG GCA AAC ACA GTT AAC CCA ATG- 3'
261-01-s	5' -tTa aGT GGA AGG ATG TCC TCG TcG <u>TA</u> - 3'
261-non01-s	5' -Ta aGT GGA AGG ATG TCC TCG TcG <u>TG</u> - 3'

Allel 02

649-all-s 5' -aGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'
 802-02-as 5' -tC GAC CCC CCG AAG AAg CT- 3'
 802-non02-as 5' -C GAC CCC CCG AAG AAg CC- 3'

Allel B

649-all-s 5' -aGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'
 803-B-as 5' -atC GAC CCC CCG AAG AgC G- 3'
 803-nonB-as 5' -CC GAC CCC CCG AAG AgC C- 3'

Allel A2

1191-all-as 5' -ggG TGT GAT TTG AGG TGG GGA C- 3'
 1059-A2-s 5' -gAG GCG GTC CGG AAg CG- 3'
 1060-nonA2-s 5' -gAG GCG GTC CGG AAC aCG- 3'

GH 1 (5580)-s 5' -TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A- 3'
 GH 2 (5967)-as 5' -CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC- 3'

2.5.3 PCR-Ansatz und Reaktionszyklen

Für die Genotypisierung einer DNA-Probe wurden 8 Reaktionsansätze mit je einem Primerpaar, GH1 und 2 benötigt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl für jeden Ansatz, bestehend aus 0,2 µg genomischer DNA, 0,2 µM jedes Primers, 200 µM dNTP und 0,4 U Taq Polymerase in einem Puffer aus 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 µg/ml Kresolrot, 1,5 mM MgCl₂ und Glycerin (5%) [modifiziert nach Gassner et al.; 1996]. Als interne Kontrolle wurde je eine Probe mit bekanntem AB0-Genotyp, sowie eine Leerprobe mit Aq. dest. mitgeführt.

	Temperatur	Dauer
5 x		
<i>Denaturierung</i>	95 °C	30 sec
<i>Primer-Bindung</i>	61 °C	150 sec
<i>Primer-Synthese</i>	72 °C	15 sec
30 x		
<i>Denaturierung</i>	95 °C	30 sec
<i>Primer-Bindung</i>	64 °C	60 sec
<i>Primer-Synthese</i>	72 °C	15 sec

Tabelle 9: Reaktionszyklen Methode 4. Nach einer initialen Denaturierung von 120 Sekunden bei 95°C folgen fünf Zyklen mit je einer halben Minute Denaturierung bei 95°C, einer zweieinhalbminütigen Primer-Bindung bei 61°C und einer 15sekündigen Synthese bei 72°C. Anschließend folgen 30 Zyklen mit je einer Denaturierung von 30 Sekunden bei 95°C, einer einminütigen Bindung bei 64°C und einer Synthese von 15 Sekunden bei 72°C [nach Gassner et al.; 1996].

2.5.4 Auswertung der PCR-Produkte

Zur Bestimmung der AB0-Zugehörigkeit ist eine Auswertung der amplifizierten Fragmente notwendig. Es werden spezifische (01, 02, B und A2) und unspezifische Banden (non01, non02, nonB, nonA2) amplifiziert. A1 wird als Ausschlußreaktion bestimmt.

Je nach Kombination können die genannten Allele in jeder homo- und heterozygoten Kombination nachgewiesen werden.

	01	non 01	02	non 02	B	non B	A2	non A2
01	+			+		+		+
02		+	+			+		+
B		+		+	+			+
A2		+		+		+	+	
A1		+		+		+		+

Tabelle 10: AB0-PCR: Auswertung der PCR-Produkte [modifiziert nach Gassner et al.; 1996].

2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Reaktionsprodukte erfolgte mittels Elektrophorese in einem 2%igen Agarose-Gel. Zur Herstellung des Gels wurden 0,4 g Agarose und 20 ml TBE-Puffer (54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0 ad 1l Aq. dest.) in einem Reaktionsgefäß aufgekocht.

Nach Abkühlung auf etwa 70 °C erfolgte die Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid.

Das Gel wurde in die vorbereitete Gelkammer eingefüllt. Die Gelmatrix erkaltet und polymerisiert innerhalb von 20 Minuten. Nach Entfernen der Kämme aus dem Gel wurde das Gel in die Gelkammer und den darin vorhandenen Laufpuffer eingelegt. Die PCR-Proben wurden einzeln aufgetragen.

Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese mit 100 Volt. Anschließend wurde das Gel auf den UV-Betrachter transferiert und die Ergebnisse mit einer Polaroid-Schwarz-Weiß-Sofortbildkamera dokumentiert.

2.7 Serologie

Der RhD-Phänotyp der am Universitätsklinikum Gießen geborenen Kinder wurde postpartal im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin mit polyklonalen und monoklonalen Anti-D Antiseren aus Nabelschnurblut bestimmt. Bei drei Kindern erfolgte die Untersuchung der RhD-Zugehörigkeit aufgrund des Verdachts einer RhD-Inkompatibilität bereits während der Schwangerschaft aus Nabelschnurblut.

Zur Erfassung der serologischen Blutgruppenergebnisse der nicht am Universitätsklinikum Gießen geborenen Kinder wurden die Mütter bzw. die betreffenden Kliniken kurz nach errechnetem Geburtstermin angeschrieben und um Mitteilung der kindlichen Blutgruppe gebeten (siehe Abbildung 15, Anhang).

2.8 Statistik

Die Auswertung von Sensitivität, Spezifität und der Vorhersagewerte erfolgte mittels Berechnungen nach Erstellen einer Vierfeldertafel.

Die Sensitivität bezeichnet den Anteil der serologisch RhD-positiv bestimmten Proben, der mittels PCR als RhD-positiv genotypisiert werden konnte. Die Spezifität bezeichnet den Anteil der serologisch RhD-negativ bestimmten Proben, der mittels PCR als RhD-negativ genotypisiert wurde.

Die Wahrscheinlichkeit, mit der eine als RhD-positiv genotypisierte Probe serologisch auch RhD-positiv bestimmt wurde, bezeichnet man als Vorhersagewert für RhD-positiv. Die Wahrscheinlichkeit, mit der eine als RhD-negativ genotypisierte Probe serologisch RhD-negativ bestimmt wurde, ist der Vorhersagewert für RhD-negative Proben.

Alle Werte werden in Prozentzahlen angegeben und sind aus der folgenden Vierfeldertafel zu berechnen.

	PCR-Ergebnisse		Summe Σ
	RhD-positiv	Rhd-negativ	
Serologie			
RhD-positiv	a	b	a+b
RhD-negativ	c	d	c+d
Summe Σ	a+c	b+d	n = a+b+c+d

Tabelle 11: Vierfeldertafel: Gegenüberstellung der serologischen Ergebnisse und PCR-Ergebnisse zur Berechnung der statistischen Werte.

Sensitivität $\frac{a}{a + b}$	Spezifität $\frac{d}{c + d}$
Vorhersagewert für RhD-positiv $\frac{a}{a + c}$	Vorhersagewert für RhD-negativ $\frac{d}{b + d}$

Abbildung 7: Berechnung der statistischen Werte

3 Ergebnisse

3.1 Überblick

Es wurden 252 Fruchtwasserproben untersucht. Acht Schwangerschaften wurden aufgrund einer Trisomie 21 unterbrochen. Eine Frau erlitt in der 26. Schwangerschaftswoche eine Fehlgeburt, ein weiteres Kind verstarb postpartal. Bei 114 der geborenen Kinder war es möglich, das serologisch bestimmte Blutgruppenergebnis zu erfahren. In 34 Fällen blieben trotz wiederholtem Anschreiben die Anfragen unbeantwortet. In den übrigen 94 Fällen fand bei den Neugeborenen keine Blutgruppenbestimmung statt.

Die Ergebnisse wurden nur anhand der 114 Proben ausgewertet. Die übrigen 138 Proben wurden in der statistischen Berechnung nicht berücksichtigt.

3.2 DNA - Isolationsmethoden

Nach Extraktion durch Erhitzen konnte in allen Fällen DNA isoliert werden. Die amplifizierten Fragmente auf dem Agarosegel waren spezifisch, die Banden aber in allen Fällen sehr schwach.

Bei der DNA-Extraktion mittels Phenol war in der photometrischen Konzentrationsbestimmung bei einem großen Prozentsatz keine DNA ausmeßbar. Bei drei Proben war mit keiner PCR-Methode eine Genotypisierung möglich. Bei den anderen Proben war die Durchführung der PCR möglich, zum Teil erst nach mehrfachen Wiederholungen.

Unter Verwendung der gebrauchsfertigen Kits wurde aus allen Fruchtwasserproben DNA isoliert. Die PCR war ebenfalls in fast allen Fällen im

ersten Versuch erfolgreich. Die Ergebnisse waren bezüglich der Darstellbarkeit der Banden auf dem Agarosegel gut auszuwerten. Unterschiede in der Qualität der beiden Kits zeigten sich nicht.

3.3 Ergebnisse der Genotypisierungen

Nr.	Serologie Kind	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Serologie Mutter
1	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
2	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
3	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
4	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
7	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	0 RhD neg
10	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
15	0 RhD neg	RhD neg	RhD pos	RhD neg	-	0 RhD pos
18	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
19	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
21	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
25	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
27	A RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	A RhD neg
30	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
34	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
35	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
37	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
40	0 RhD neg	RhD neg	RhD pos	RhD neg	-	0 RhD pos
41	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	0101	A RhD neg
42	AB RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	AB RhD pos
47	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
49	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
50	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
51	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0101	A RhD pos
59	0 RhD neg	RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0 RhD pos
61	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	B RhD pos
62	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A201	0 RhD pos

Nr.	Serologie Kind	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Serologie Mutter
65	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
68	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
69	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
75	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD neg
76	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD neg
80	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
85	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
86	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
91	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	0 RhD neg
92	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD neg
93	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0101	B RhD pos
97	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0101	B RhD pos
98	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
101	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
102	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
103	AB RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A1B	A RhD pos
104	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD neg
108	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	0 RhD neg
109	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
111	0 RhD neg	RhD pos	RhD pos	RhD pos	A101	A RhD pos
112	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	0 RhD pos
114	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
116	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
117	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
118	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
119	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
120	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
121	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
122	AB RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	A RhD pos
123	A RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	A101	0 RhD pos
125	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD neg
126	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
127	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
128	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	B RhD pos
130	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0101	A RhD pos
134	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
137	A RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	A101	0 RhD neg
142	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
143	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos

Nr.	Serologie Kind	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Serologie Mutter
144	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
145	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD neg
147	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0101	A RhD pos
148	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	B01	0 RhD pos
150	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	B01	0 RhD pos
154	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
158	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
159	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
161	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
164	0 RhD neg	RhD neg	RhD pos	RhD neg	-	0 RhD neg
165	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
167	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD neg
168	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD neg
174	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
175	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
179	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	0 RhD pos
180	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
191	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
192	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD neg
195	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
197	A RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	A RhD neg
198	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
202	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
203	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
204	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
205	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	B RhD pos
206	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	A RhD pos
208	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
209	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD neg
210	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	0 RhD neg
211	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
212	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
216	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
224	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
225	B RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	B RhD pos
228	A RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	A RhD neg
229	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
231	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
232	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A101	A RhD neg

Nr.	Serologie Kind	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Serologie Mutter
235	0 RhD neg	RhD neg	RhD neg	-	-	0 RhD neg
240	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
244	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A RhD neg
247	A RhD neg	RhD neg	RhD neg		-	A RhD neg
251	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
252	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	A RhD pos
254	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	-	0 RhD pos
255	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos		-	0 RhD neg
256	0 RhD pos	RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	0 RhD neg
257	A RhD pos	RhD pos	RhD pos	RhD pos	-	A RhD neg
Σ114						

Tabelle 12: Ergebnisse aller PCR-Methoden. Abgebildet sind alle 114 Proben, bei denen die postpartale serologische Blutgruppenbestimmung des Kindes vorlag. Alle Proben wurden mit Methode 1 und 2 genotypisiert, einige zusätzlich mit Methode 3 oder 4.

3.4 Methode 1

3.4.1 Genotypisierung

Ausgehend von der Gesamtzahl von 114 Proben, wurden 98 Proben mit Methode 1 als RhD-positiv und 16 Proben als RhD-negativ genotypisiert.

In der serologischen Bestimmung wurden 96 dieser 114 Proben RhD-positiv und 18 RhD-negativ bestimmt.

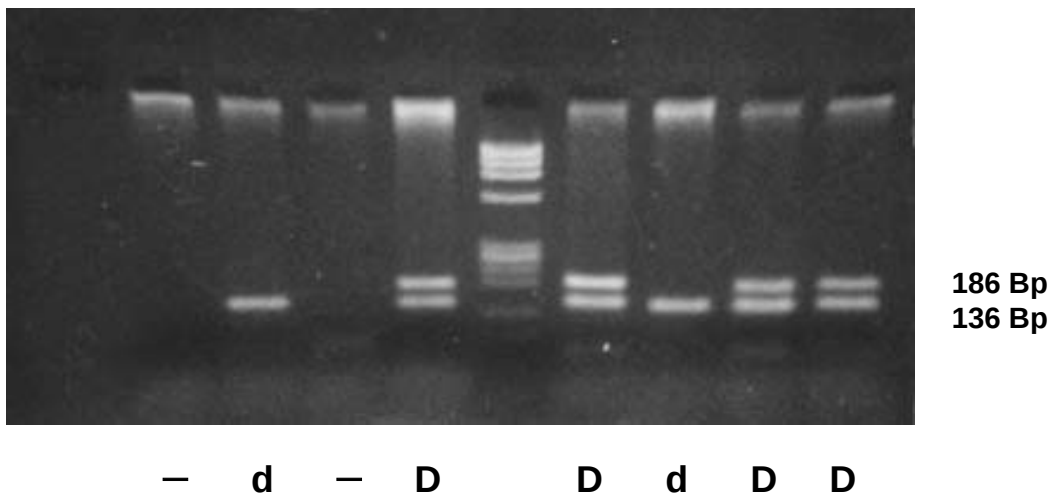


Abbildung 8: Methode 1 - Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel.

D bezeichnet eine RhD-positive, d eine RhD-negative Probe. Die obere Bande stellt das Reaktionsprodukt des *RHD*-Gens (186 Bp), die untere das des *RHCE*-Gens dar (136 Bp). Bei der ersten und dritten Probe hat keine Amplifikation stattgefunden.

3.4.2 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte

Für Methode 1 wurde eine Sensitivität von 100% bestimmt, d.h. alle serologisch RhD-positiven Proben wurden als RhD-positiv genotypisiert. Die Spezifität liegt bei 88,9%, da 2 serologisch RhD-negative Proben als RhD-positiv genotypisiert wurden.

Der Vorhersagewert für eine RhD-positive Probe liegt bei 98%, für eine RhD-negative Probe bei 100%.

	PCR-Ergebnisse		Summe Σ
	RhD-positiv	Rhd-negativ	
Serologie			
RhD-positiv	96	0	96
RhD-negativ	2	16	18
Summe Σ	98	16	114

Tabelle 13: Methode 1 - Ergebnisse. Serologische Blutgruppenergebnisse und Ergebnisse der Genotypisierung, dargestellt als Vierfeldertafel.

3.4.3 Gruppe der RhD-negativen Mütter

27 Mütter waren RhD-negativ. In der postpartalen serologischen Blutgruppenbestimmung ihrer Kinder fand sich in 15 Fällen ein RhD-positives und in 12 Fällen ein RhD-negatives Ergebnis.

Die Genotypisierung mit Methode 1 zeigte in allen Fällen ein übereinstimmendes Ergebnis.

Für Sensitivität, Spezifität und die Vorhersagewerte für ein RhD-positives und -negatives Ergebnis ergeben sich Werte von jeweils 100%.

	PCR-Ergebnisse		Summe Σ
	RhD-positiv	Rhd-negativ	
Serologie			
RhD-positiv	15	0	15
RhD-negativ	0	12	12
Summe Σ	15	12	27

Tabelle 14: Methode 1 - Ergebnisse bei RhD-negativen Mütter. Ergebnisse der Serologie und Genotypisierung, dargestellt als Vierfeldertafel.

3.5 Methode 2

3.5.1 Genotypisierung

Mit Methode 2 wurden 101 Proben als RhD-positiv und 13 Proben als RhD-negativ genotypisiert. Serologisch waren, wie bereits beschrieben, 96 Proben RhD-positiv und 18 RhD-negativ bestimmt worden.

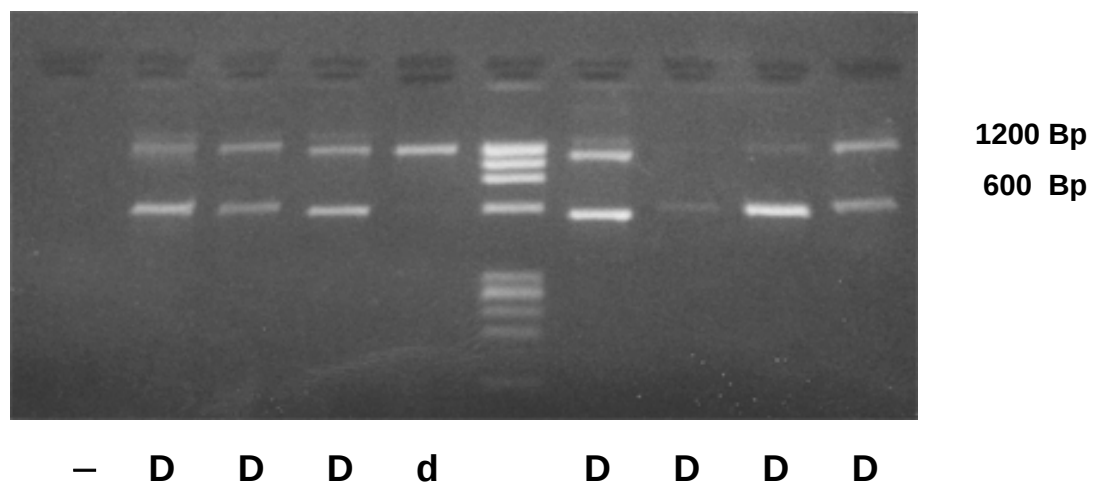


Abbildung 9: Methode 2 - Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel.

D bezeichnet eine RhD-positive, d eine -negative Probe. Das Reaktionsprodukt des *RHD*-Gens hat eine Länge von 600 Bp, das des *RHCE*-Gens eine Länge von 1200 Bp. Ist nur das 600 Bp-Fragment zu sehen, wird die Probe ebenfalls als RhD-positiv bewertet. Bei der ersten Probe hat keine Amplifikation stattgefunden.

3.5.2 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte

Für Methode 2 lassen sich die Sensitivität von 100%, Spezifität von 72,2%, und die Vorhersagewerte von 95,1% für eine RhD-positive und 100% für eine RhD-negative Probe bestimmen.

	PCR-Ergebnisse		Summe Σ
	RhD-positiv	Rhd-negativ	
Serologie			
RhD-positiv	96	0	96
RhD-negativ	5	13	18
Summe Σ	101	13	114

Tabelle 15: Methode 2 - Ergebnisse. Genotypisierungen und serologische Blutgruppenergebnisse, dargestellt als Vierfeldertafel.

3.5.3 Gruppe der RhD-negativen Mütter

In der Gruppe der RhD-negativen Mütter fand sich in 26 von 27 Fällen eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der serologischen Blutgruppenbestimmung der Kinder und der Genotypisierung mit Methode 2.

Bei einer Probe (Nr.164) fanden sich diskrepante Ergebnisse. Diese Probe war serologisch RhD-negativ bestimmt worden und zeigte in der Genotypisierung ein RhD-positives Ergebnis.

	PCR-Ergebnisse		Summe Σ
	RhD-positiv	Rhd-negativ	
Serologie			
RhD-positiv	15	0	15
RhD-negativ	1	11	12
Summe Σ	16	11	27

Tabelle 16: Methode 2 - Ergebnisse bei RhD-negativen Müttern. Serologie und Genotypisierung mit Methode 2, dargestellt als Vierfeldertafel.

Für Methode 2 ergibt sich in der Gruppe der RhD-negativen Mütter eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 91,7%. Der Vorhersagewert beträgt 93,8% für eine RhD-positive Probe und 100% für eine RhD-negative Probe.

3.6 Diskrepante PCR-Ergebnisse

Die Ergebnisse der Genotypisierungen der beiden RhD-PCR-Methoden zeigten im Vergleich mit den serologischen Blutgruppenbestimmungen in 109 Fällen eine komplette Übereinstimmung (95,6%). In fünf Fällen fanden sich Diskrepanzen. Hierbei handelt es sich in allen Fällen um falsch-positive Typisierungen (siehe Tabelle 17).

Zwei dieser fünf Proben (Nr. 59 und 111) zeigten in der Genotypisierung sowohl mit Methode 1 als auch mit Methode 2 ein falsch-positives Ergebnis.

Die übrigen drei Proben (Nr. 15, 40 und 164) zeigten mit Methode 1 ein RhD-negatives, zur Serologie konkordantes, Ergebnis. Nur für Methode 2 lagen falsch-positive Bestimmungen vor. Hierbei war das 1200 Bp-Fragment deutlich schwächer ausgeprägt als das 600 Bp-Fragment.

Alle fünf Proben wurden weiterführend mit Methode 3 genotypisiert.

Vier weitere Proben, die aufgrund fehlender postpartaler Blutgruppenbestimmung nicht in die statistische Auswertung aufgenommen werden konnten, zeigten ebenfalls Diskrepanzen in der Genotypisierung. Diese Proben wurden alle mit Methode 1 als RhD-negativ und mit Methode 2 als RhD-positiv genotypisiert. Das 600 Bp-Fragment war auch hier deutlich schwächer als das 1200 Bp-Fragment. Die Proben wurden weiterführend mit Methode 3 genotypisiert.

3.7 Methode 3

Die Proben, die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Genotypisierung und der Serologie bzw. zwischen den Genotypisierungen aufwiesen, wurden zusätzlich mit Methode 3 untersucht.

Probe Nr. 59 und Nr. 111 wurden mit der sequenzspezifischen PCR als RhD-positiv genotypisiert, alle Exons des *RHD*-Gens wurden nachgewiesen. Probe Nr. 15, Nr. 40 und Nr. 164 wurden in wiederholten Versuchen als RhD-negativ bestimmt. Kein Exon des *RHD*-Gens konnte amplifiziert werden.

Die vier Proben, deren serologisches Blutgruppenbestimmung nicht vorlag, zeigten sich mit Methode 3 ebenfalls als RhD-negativ.

Probe	Serologie Kind	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Blutgruppe Mutter
Nr. 15	0 RhD neg	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	0 RhD pos
Nr. 40	0 RhD neg	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	0 RhD pos
Nr. 59	0 RhD neg	<i>RhD pos</i>	<i>RhD pos</i>	<i>RhD pos</i>	0 RhD pos
Nr. 111	0 RhD neg	<i>RhD pos</i>	<i>RhD pos</i>	<i>RhD pos</i>	A RhD pos
Nr. 164	0 RhD neg	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	0 RhD neg
Nr. 155	?	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	A RhD pos
Nr. 181	?	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	0 RhD pos
Nr. 184	?	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	A RhD neg
Nr. 201	?	RhD neg	<i>RhD pos</i>	RhD neg	0 RhD pos

Tabelle 17: Proben mit diskrepanten PCR-Ergebnissen. Gegenüberstellung von Serologie und Genotypisierungen durch die verschiedenen PCR-Methoden.

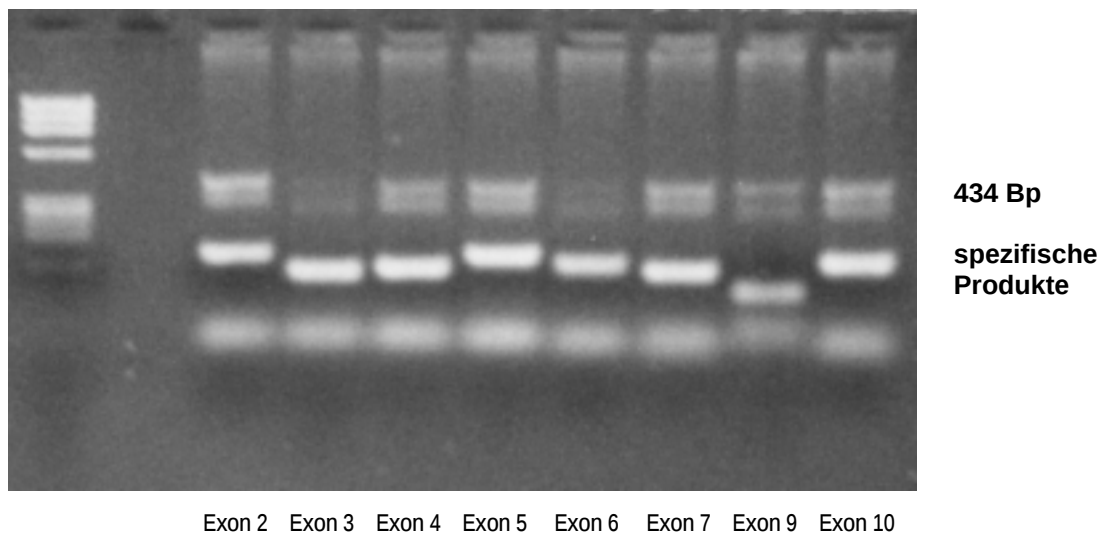


Abbildung 10: Methode 3 - Reaktionsprodukte bei RhD-positivem Individuum.

Bei Existenz eines normal ausgeprägten *RHD*-Gens werden 8 der 10 Exons amplifiziert. Bei positiver Reaktion sind die GH-Banden (434 Bp) nur schwach ausgeprägt, beim RhD-negativen Individuum werden nur die GH-Banden amplifiziert. Darstellung auf einem Agarosegel.

3.8 Methode 4

Bei unterschiedlicher AB0-Serologie von Mutter und Kind wurde zusätzlich eine Genotypisierung mit Methode 4 durchgeführt. In 28 Fällen waren mütterliche und kindliche Blutgruppe nicht identisch. Es konnte jedoch nur in 24 Fällen eine AB0-Genotypisierung durchgeführt werden, da die DNA der übrigen vier Proben schon während der RhD-Genotypisierungen verbraucht worden war.

Die AB0-Genotypisierung konnte in drei Fällen (12,5%) eine Kontamination durch mütterliches Material nachweisen. In sechs Fällen (25%) wurde die Verunreinigung durch mütterliche Zellen ausgeschlossen. Die Beurteilung der übrigen 15 Genotypisierungen war aufgrund der Blutgruppenkonstellationen von Mutter und Kind nicht möglich. Es konnte nicht sicher differenziert werden, ob allein fetales Material oder auch maternale Zellen amplifiziert wurden.

Probe	Blutgruppe Kind	Blutgruppe Mutter	Genotypisierung Fruchtwasser
10	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
18	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
35	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
41	0 RhD neg	A RhD neg	0101 ¹⁾
51	0 RhD pos	A RhD pos	0101 ¹⁾
62	A RhD pos	0 RhD pos	A201 ³⁾
65	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
80	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
93	0 RhD pos	B RhD pos	0101 ¹⁾
97	0 RhD pos	B RhD pos	0101 ¹⁾
103	AB RhD pos	A RhD pos	A1B ³⁾

Probe	Blutgruppe Kind	Blutgruppe Mutter	Genotypisierung Fruchtwasser
111	0 RhD neg	A RhD pos	A101 ²⁾
122	AB RhD pos	A RhD pos	A101 ³⁾
123	A RhD neg	0 RhD pos	A101 ³⁾
130	0 RhD pos	A RhD pos	0101 ¹⁾
137	A RhD neg	0 RhD neg	A101 ³⁾
143	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
147	0 RhD pos	A RhD pos	0101 ¹⁾
148	B RhD pos	0 RhD pos	B01 ³⁾
150	B RhD pos	0 RhD pos	B01 ³⁾
159	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
179	A RhD pos	0 RhD pos	A101 ³⁾
206	0 RhD pos	A RhD pos	A101 ²⁾
232	0 RhD pos	A RhD neg	A101 ²⁾

Tabelle 18: Ergebnisse der AB0-Genotypisierung. Die untersuchten Proben unterscheiden sich hinsichtlich der AB0-Blutgruppe von Mutter und Kind.

¹⁾ keine Kontamination durch mütterliches Gewebe

²⁾ Kontamination durch mütterliches Gewebe

³⁾ Kontamination durch mütterliches Gewebe nicht ausgeschlossen

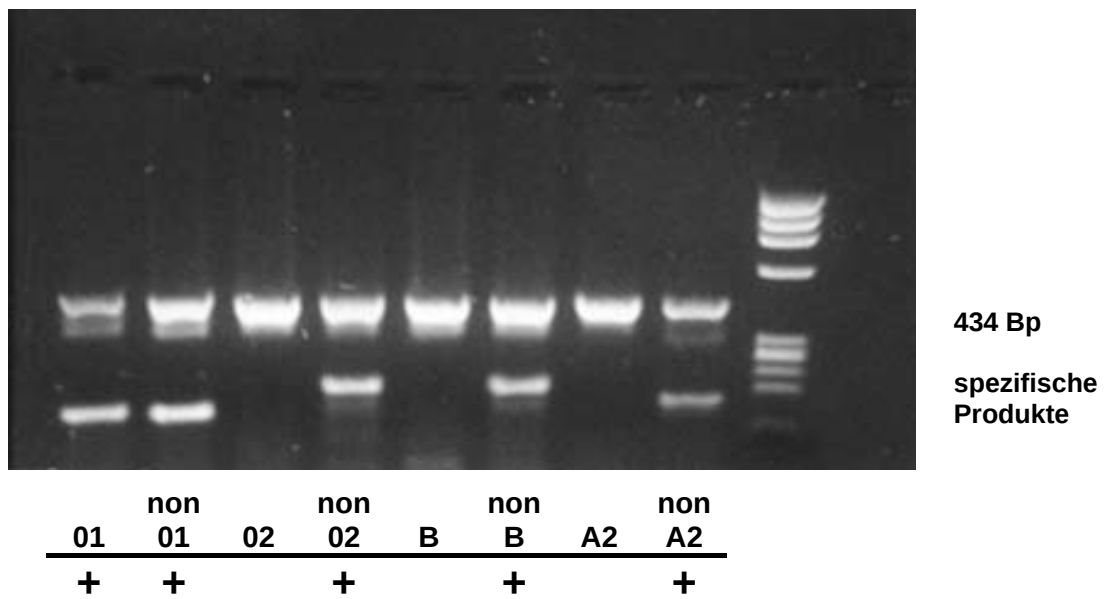


Abbildung 11: Blutgruppe A101. Spezifische Banden und Kontrollbanden (GH) als Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel.

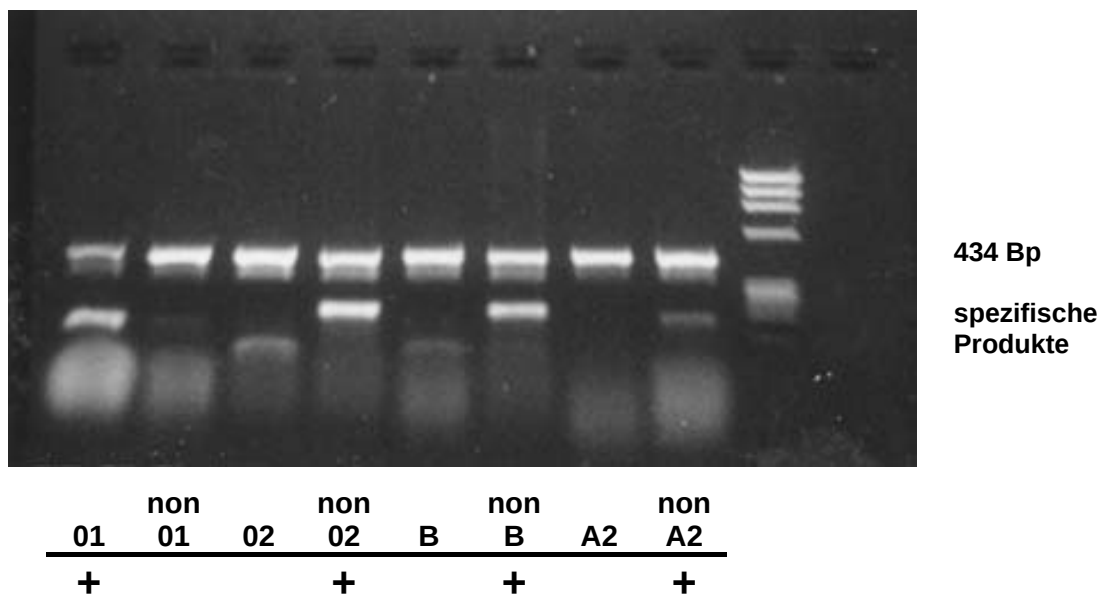


Abbildung 12: Blutgruppe 0101. Spezifische Banden und Kontrollbanden (GH) als Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel.

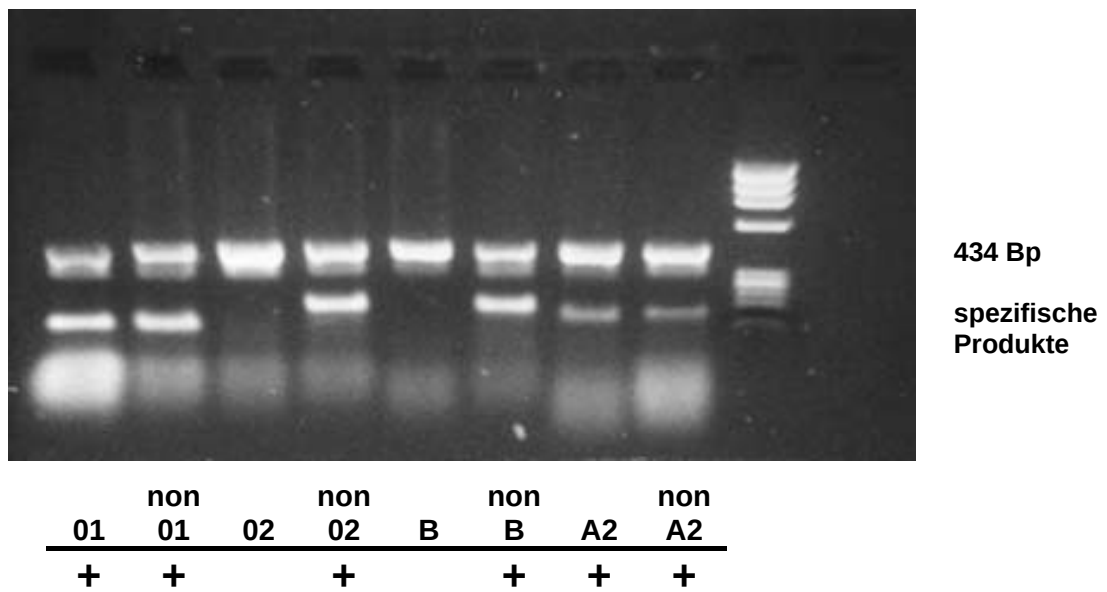


Abbildung 13: Blutgruppe A201. Spezifische Banden und Kontrollbanden (GH) als Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel.

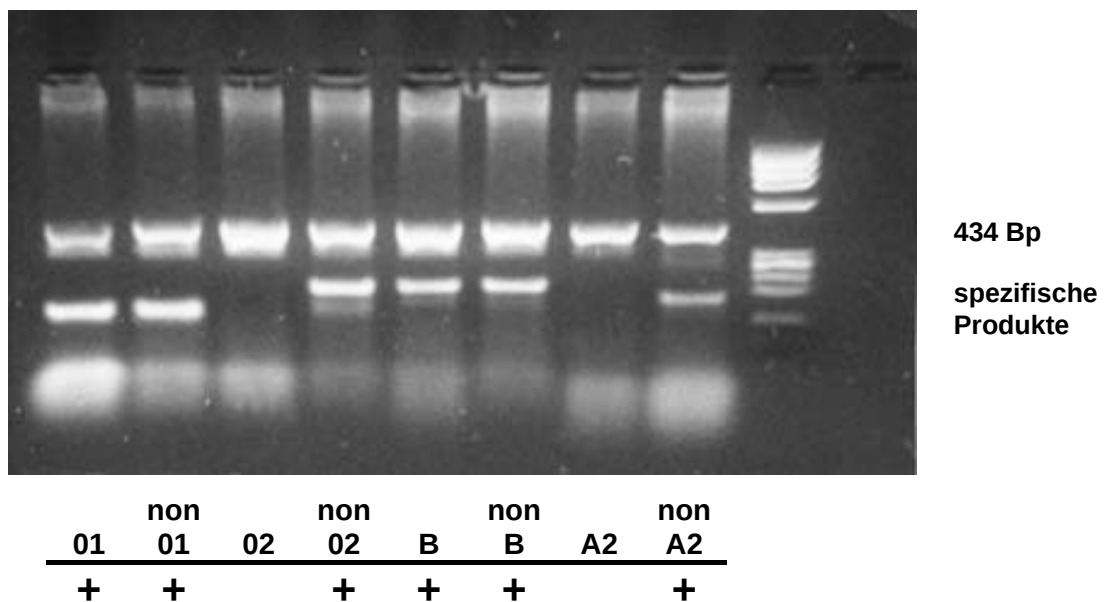


Abbildung 14: Blutgruppe B01. Spezifische Banden und Kontrollbanden (GH) als Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel.

4 Diskussion

4.1 Methoden

Die Isolation der fetalen DNA aus Fruchtwasser wurde mit vier Methoden durchgeführt. Von diesen Methoden ist in der klinischen Routine nur die Anwendung der beiden DNA-Extraktionskits sinnvoll.

Das Erhitzen der Proben auf 90°C bietet den Vorteil einer schnellen und einfachen Durchführung. Trotzdem sollte diese Methode wegen der schlechten Bandenqualität in der klinischen Routinediagnostik nicht zum Einsatz kommen. Bei der Auswertung kann es aufgrund der schwachen Darstellung spezifischer PCR-Produkte zu einer Verwechslung mit unspezifisch amplifizierten Fragmenten kommen.

Die durch Phenolextraktion isolierte DNA war mit den verschiedenen PCR-Methoden nur schwer zu amplifizieren. Bei drei Proben war die Genotypisierung nicht möglich. Bei anderen Proben mußte die DNA mehrmals in die PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Zum Teil war ein Ergebnis erst nach Verdünnung der fetalen DNA mit Aq. dest. zu erhalten. In Spuren vorhandenes Phenol stört die Polymerasekettenreaktion, weshalb absolut exaktes und sorgfältiges Arbeiten notwendig ist. Doch auch wegen des nicht unbeträchtlichen Arbeitsaufwandes ist diese Extraktionsmethode in der Routinediagnostik nicht sinnvoll.

Die Ergebnisse der beiden DNA-Extraktionskits waren konstant zuverlässig. Es gab keine Qualitätsunterschiede. In der klinischen Anwendung sollte dem „QIAamp® Blood and Tissue Kit“ gegenüber dem Kit „Extra Gene“ der Vorzug gegeben werden, da geringere Probenmengen benötigt werden und die Isolationsdauer kürzer ist.

Auch beim Einsatz von sehr geringen Probenvolumina zur DNA-Extraktion zeigten die Amplifikationen stets konstante Ergebnisse. Aufgrund der Möglichkeit, sehr kleine Volumina zuverlässig verarbeiten zu können, ist die Möglichkeit gegeben, diese Methoden auch unter anderen Zielsetzungen, z. B. zur Spurenaufarbeitung in der Rechtsmedizin, einzusetzen.

4.2 Ergebnisse

114 Fruchtwasserproben wurden mit zwei verschiedenen RhD-PCR-Methoden genotypisiert. Für beide Methoden lag die Sensitivität bei 100%, d. h. alle serologisch RhD-positiven Proben wurden auch mittels PCR als RhD-positiv bestimmt.

Methode 1 zeigte eine Spezifität von 88,9%, für Methode 2 lag die Spezifität nur bei 72,2%. Der Prozentsatz der falsch-positiv bestimmten RhD-negativen Proben lag für Methode 1 bei 11,1% und bei 27,8% für Methode 2.

In zwei Fällen (Probe Nr. 59 und 111) zeigten Methode 1 und 2 übereinstimmend falsch-positive Genotypisierungen. Die RhD-positiven Ergebnisse wurden durch Methode 3 bestätigt. Bei beiden Proben wurden alle RhD-Exons amplifiziert, was auf eine vollständige Existenz des *RHD*-Gens schließen läßt. Man muß von einer Kontamination der Fruchtwasserproben durch maternale Zellen ausgehen, da die Mütter der beiden Kinder RhD-positiv waren. Die AB0-Genotypisierung der Fruchtwasserprobe Nr. 111 ergab die Allele A101. Serologisch wurde für das Kind die Blutgruppe 0 bestimmt, die Mutter hatte Blutgruppe A. Dies bestätigte den Verdacht einer Kontamination der Fruchtwasserprobe durch mütterliche Zellen. Es wurde das RhD-positive Material der Mutter amplifiziert.

Mutter und Kind der Probe Nr. 59 gehören beide der Blutgruppe 0 an, so daß keine weitere AB0-Genotypisierung durchgeführt werden konnte.

Drei andere Proben (Nr. 15, 40 und 164) zeigten Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der einzelnen PCR-Methoden. Es fanden sich RhD-negative Ergebnisse für Methode 1 und –positive Ergebnisse für Methode 2, wobei das 600 Bp-Fragment deutlich schwächer ausgeprägt war als bei anderen RhD-positiven Proben. Die Ergebnisse der Serologie waren bei allen Proben RhD-negativ.

Bei der Genotypisierung mit Methode 3 waren bei keiner der Proben Sequenzen des *RHD*-Gens nachweisbar. Die RhD-Typisierung war auch bei Wiederholung eindeutig negativ. Eine RhD-Untergruppe kann damit ausgeschlossen werden.

Eine Kontamination der Primer oder anderer Inhaltsstoffe des Reaktionsansatzes wurde durch das Mitführen von internen Wasserkontrollen mit großer Sicherheit ausgeschlossen.

Da das Entstehen des Fragments durch Primerbindung im *RHCE*-Gen unwahrscheinlich ist, findet sich keine plausible Erklärung für diese Befunde. Ähnliche Ergebnisse wurden für Methode 2 bereits früher beschrieben [Yankowitz et al.; 1995]. Im Rahmen einer Untersuchung fanden sich bei serologisch RhD-negativen Blutspendern schwach ausgeprägte 600 Bp-Fragmente. Sie wurden als RhD-positiv gewertet. Eine differenzierte Untersuchung fand nicht statt. Eine weitere Aufklärung kann nur durch eine Sequenzierung der jeweiligen *RHD*-Gene erfolgen.

4.3 Klinische Anwendung von RhD-PCR-Methoden

Seitdem Anfang der 90er Jahre PCR-Methoden zur RhD-Genotypisierung entwickelt wurden, gibt es zahlreiche Studien über deren klinische Anwendung. Es finden sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität, auch für die in dieser Studie angewandten Methoden.

Während einige Arbeiten vollständige Konkordanz zwischen Genotypisierung und serologischer Blutgruppenbestimmung zeigen (siehe Anhang, Tabelle 19), finden sich ebenso zahlreiche Fehltypisierungen.

Für Methode 1 sind falsch-negative Genotypisierungen beschrieben [Lighten et al.; 1995]. Diese Technik wurde bereits in der Pränataldiagnostik eingesetzt. Bei der Untersuchung des Fruchtwassers von 135 RhD-negativen schwangeren Frauen kam es zu zwei falsch-negativen Bestimmungen. Ein Fetus starb in utero in der 28. Schwangerschaftswoche an den Folgen eines schweren Hydrops, der andere litt an einer leichten Form des MHN und mußte postnatal transfundiert werden.

Zu drei weiteren falsch-negativen Bestimmungen durch Methode 1 kam es bei der Genotypisierung von RhD-Untergruppen [Simsek et al.; 1995].

Die Gefahr der falsch-positiven Bestimmung besteht beim Haplotypen Cde^s (bei Schwarzen). Diese Individuen besitzen die Exons 1, 2, teilweise 3 und 8-10 des *RHD*-Gens, exprimieren jedoch kein RhD-Protein. Durch die Amplifikation von Exon 10 besteht die Gefahr einer falsch-positiven Bestimmung [Avent, 1997b].

Auch für Methode 2 sind Fehltypisierungen beschrieben. Bei der Genotypisierung von 765 Blutproben fanden sich 7 falsch-positive und 2 falsch-negative Bestimmungen [Yankowitz et al.; 1995]. Im Vergleich mit drei anderen RhD-PCR-Methoden (darunter auch Methode 1) sind für Methode 2 schlechtere Sensitivitäts- und Spezifitätsergebnisse beschrieben. Bei D^{VI}-Varianten kann es zu falsch-negativen Typisierungen kommen [Aubin et al.; 1997].

PCR-Methoden, die nur einzelne Regionen im *RHD*- bzw. *RHCE*-Gen amplifizieren, wurden zu Beginn der RhD-Genotypisierung entwickelt. Zu dieser Gruppe gehören neben den hier genannten auch Methoden, die Exon 7 amplifizieren [Wolter et al.; 1993]. Sie sind in der klinischen Diagnostik nur dann anwendbar, wenn bei RhD-negativen Individuen das *RHD*-Gen vollständig deletiert ist. Um das Risiko falsch-positiver und falsch-negativer Genotypisierungen zu minimieren, sollten folglich mindestens zwei PCR-Methoden mit verschiedenen Primerbindungsstellen angewandt werden. Bei der Untersuchung eines einzelnen Polymorphismus zeigen sich bei RhD-Genotypisierung einer Studienpopulation unselektierter Proben kaukasischer Individuen in 99,5% korrekte Ergebnisse. Die Untersuchung eines zweiten Polymorphismus erhöht diesen Wert auf 99,9% [Flegel et al.; 1998].

Die Untersuchung verschiedener Polymorphismen kann durch separate Methoden oder als Multiplex-PCR, bei der die unterschiedlichen Polymorphismen in einem Reaktionsansatz getestet werden, erfolgen. Voraussetzung für die Durchführung ist, daß die Amplifikation verschiedener Genabschnitte unter denselben Reaktionsbedingungen stattfinden kann. Anfänglich wurden Multiplex-Systeme angewandt, bei denen die Amplifikation von Intron 4 mit Exon 10 kombiniert wurde [Spence et al.; 1995 und Pope et al.; 1995]. Neuere Multiplex-PCR-Methoden ermöglichen die Darstellung mehrerer Exons des *RHD*-Gens in einem Reaktionsansatz [Maaskant-van Wijk et al.; 1998]. Bei geringen Mengen an DNA ist dies ein bedeutender Vorteil. Auch bezüglich der Kosten und des Zeitaufwandes bietet die Multiplex-PCR Vorzüge gegenüber der Durchführung von Einzelansätzen.

Methode 3 stellt mit acht sequenzspezifischen Reaktionen die einzelnen Exons des *RHD*-Gens dar und ermöglicht somit die Bestimmung von RhD-Untergruppen.

Die Häufigkeit falsch-negativer Ergebnisse, z.B. bei Individuen mit partieller D-Zugehörigkeit, wird durch Multiplex-PCR-Methoden bzw. sequenzspezifische Amplifikation der Exons des *RHD*-Gens deutlich minimiert. Jedoch ist keine

dieser Methoden in der Lage, falsch-positive Befunde bei phänotypisch RhD-negativen Individuen mit intaktem, aber dysfunktionellem, *RHD*-Gen (z.B. *RHD* Ψ) zu vermeiden [Avent et al; 2000]. Bei Populationen, in denen diese Individuen gehäuft vorkommen, ist die RhD-PCR nur eingeschränkt anwendbar. Für die Erkennung von *RHD* Ψ wurde eine spezielle PCR entwickelt [Singleton et al.; 2000].

4.4 PCR bei RhD-Untergruppen

Bei RhD-Untergruppen sind Diskrepanzen zwischen dem serologischen Phänotyp und den Ergebnissen der Genotypisierung zu erwarten. Serologisch RhD-positive Proben können mittels PCR als RhD-negativ bestimmt werden und umgekehrt. Auch bei Rh_{null}-Individuen, welche serologisch keine Reaktionen mit Anti-D zeigen, wird ein RhD-positiver Genotyp gefunden. Solche Personen besitzen ein scheinbar intaktes *RHD*-Gen, das entsprechende Protein wird jedoch nicht exprimiert.

In der Pränataldiagnostik besteht im Falle der falsch-negativen Genotypisierung einer RhD-Untergruppe des Kindes die Gefahr einer Immunisierung der Mutter. Trotz Amplifikation unterschiedlicher Polymorphismen mit mehreren PCR-Ansätzen werden Veränderungen im nicht untersuchten *RHD*-Gen-Abschnitt nicht erfaßt. Nur die Darstellung jedes einzelnen Exons kann die strukturellen Veränderungen des *RHD*-Gens aufzeigen.

Da RhD-Varianten in der kaukasischen Bevölkerung selten sind, muß die Frage nach dem routinemäßigen Einsatz von sequenzspezifischen PCR-Methoden wie z. B. Methode 3 kritisch gestellt werden. Obwohl die PCR selbst schnell durchführbar ist, müssen der große Aufwand in der Vorbereitung und die hohen

Materialkosten berücksichtigt werden. Eine solche Methode kann nicht in jedem Labor zum Einsatz kommen.

Die Ergebnisse der meisten Publikationen zeigen keine Notwendigkeit für die routinemäßige Durchführung einer solchen Methode, da phänotypisch RhD-negative Individuen, die ein *RHD*-Gen besitzen, bei Kaukasiern selten sind. Die RhD-Genotypisierungen können in dieser Bevölkerungsgruppe als verlässlich betrachtet werden [Avent; 1997].

Die Ergebnisse der meisten europäischen und nordamerikanischen Studien an Kaukasiern sind jedoch nicht auf Personen anderer Abstammung zu übertragen. Die ethnische Zugehörigkeit von Vater und Mutter muß in der pränatalen Diagnostik berücksichtigt werden. Es wird sogar empfohlen, eine Genotypisierung beider Eltern vorzunehmen [Avent; 1998]. Bei Untersuchungen von Nicht-Kaukasiern muß die Indikation für eine weitergehende RhD-Genotypisierung streng gestellt werden [Aubin et al.; 1997]. In der pränatalen Diagnostik ist in diesen Fällen die routinemäßige Durchführung von Methode 3 sinnvoll, da jede Region des *RHD*-Gens strukturell verändert sein kann.

Die aufgrund ihrer Häufigkeit relevantesten RhD-Untergruppen Rh D^{VI} und D^{IV} werden bei der Amplifikation von Exon 4 / Intron 4 und Exon 7 am häufigsten richtig genotypisiert [Flegel et al.; 1998].

Am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen fiel in der serologischen Routineuntersuchung eine Blutprobe durch nicht eindeutige Rhesus-Bestimmung auf, woraufhin eine Untersuchung mit einem RhD-Panel folgte. Hierbei handelt es sich um einen Test mit monoklonalen Antikörpern der Gruppen IgM und IgG, der einzelne RhD-Epitope erkennen kann. Als Ergebnis zeigten die Testreihen nur eine einzige positive Reaktion. Dies spricht für die Existenz eines einzigen RhD-Epitopes.

Bei der Genotypisierung mit Methode 1 und 2 wurde die Probe jeweils als RhD-negativ bestimmt. Bei der Untersuchung mit Methode 3 konnte das fünfte Exon des *RHD*-Gens amplifiziert werden. Bei ausschließlicher Existenz des fünften

Exons ist die Probe als Rh33 einzuordnen, verursacht durch unpaares Crossing-over zwischen dem *RHCE*- und *RHD*-Gen. Da es sich um ein partielles *RHD*-Gen handelt, müssen die Ergebnisse von Methode 1 und 2 als falsch-negative Genotypisierung gewertet werden.

4.5 Bedeutung bei RhD-negativen Müttern

Für RhD-negative Schwangere mit Rhesus-Inkompatibilität infolge von anti-D-Antikörpern und heterozygot RhD-positivem Partner ist die pränatale Bestimmung des fetalen RhD-Faktors von besonderer klinischer Bedeutung. Ist das Kind RhD-negativ, so kann die weitere invasive Diagnostik vermieden werden. Im Falle eines RhD-positiven Feten kann man bei frühzeitiger zuverlässiger Kenntnis der Blutgruppe die Risikoschwangerschaft optimal betreuen.

Bei einer Genotypisierung kann es nur bei RhD-negativen Schwangeren zu keiner Ergebnisverfälschung durch maternale Kontamination kommen. Ausgenommen hiervon ist eine fehlerhafte Punktion, bei der die mütterlichen Zellen derart überwiegen, daß keine fetale DNA amplifiziert werden kann.

In dieser Studie waren 27 Mütter RhD-negativ. Für Methode 1 zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung mit der serologischen Blutgruppenbestimmung. Bei Methode 2 wurde eine serologisch RhD-negative Probe falsch-positiv genotypisiert. Es handelt sich hierbei um Probe Nr. 164, die, wie bereits beschrieben, mit Methode 3 eindeutig als RhD-negativ genotypisiert werden konnte.

Die Ergebnisauswertung in dieser klinisch relevanten Gruppe zeigt deutlich bessere Werte als in der Gesamtgruppe. Hier liegen für Methode 1 eine Sensitivität und Spezifität von je 100% vor, für Methode 2 eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 91,7%.

4.6 Kontamination des Amniozentese-punktats durch maternale Zellen

Bei korrekter Durchführung von Amniozentese bzw. Chorionzottenpunktion sollte das gewonnene Material frei von mütterlichen Zellen sein. Durch Verschleppung von maternalen kernhaltigen Zellen sind die Ergebnisse der Rh-Genotypisierung bei unterschiedlicher Rhesus-Zugehörigkeit von Mutter und Kind in Frage gestellt.

In dieser Studie bestand eine weitestgehende Übereinstimmung bezüglich RhD zwischen Mutter und Kind. Eine AB0-Bestimmung wurde bei den in Frage kommenden Proben durchgeführt.

Bei einem Anteil von 12,5% lag eine Kontamination der Proben durch mütterliche Zellen vor. Bei 25% war keine Kontamination nachzuweisen, bei den übrigen Proben konnte keine definitive Aussage getroffen werden.

Bei direktem diagnostischen Einsatz (ohne kulturelle Bebrütung) konnte in vorangegangenen Studien ein hoher Anteil mütterlicher Zellen im Fruchtwasser nachgewiesen werden. Bei anteriorer Plazentalage fanden sich in fünfzig Prozent der Fälle mehr als 20% mütterliche Zellen im Fruchtwasser, bei blutiger Punktion teilweise mehr als 50% [Nuß et al.; 1993]. Bei posteriorer Plazentalage scheint der Anteil geringer zu sein. Nach Kultivierung und Anzüchtung der fetalen Zellen werden weniger maternale Zellen nachgewiesen, da diese absterben [Bui et al.; 1984]. Der Grad der Kontamination steigt mit dem Gestationsalter an [Carelli et al.; 1992].

Für den Einsatz der pränatalen RhD-Genotypisierung ist die Durchführung der Amniozentese durch einen erfahrenen Gynäkologen wichtig, um das Risiko einer blutigen Punktion und den damit verbundenen hohen Anteil von kernhaltigen mütterlichen Zellen im Punktat zu verringern.

4.7 Neue Ansätze in der pränatalen RhD-Diagnostik

Ziel neuerer Studien ist es, in Zukunft peripheres Blut der Mutter zur Isolierung fetaler DNA zu verwenden. Hierbei wird versucht, fetale Zellen aus mütterlichem Blut oder Plasma zu isolieren und zu untersuchen [Lo et al.; 1993 u. a.]. Auch die Möglichkeit, kindliche Zellen aus Zervixabstrichen zu isolieren, wurde untersucht [Adinolfi et al.; 1995]. Der Vorteil dieser nicht-invasiven Methoden wird in der fehlenden Immunisierung gesehen. Das gewonnene kindliche Material ist jedoch im Verhältnis zu den mütterlichen Zellen nur in sehr geringen Mengen vorhanden.

Zellen, die für die non-invasive Diagnostik verwandt werden, sind Lymphozyten, kernhaltige Erythrozyten und Trophoblasten. Fetale Lymphozyten können jedoch über Jahre im mütterlichen Blut existieren [Schroder et al.; 1974 und Bianchi et al.; 1996]. Es ist theoretisch denkbar, daß die Amplifikation von fetalen Zellen aus früheren Schwangerschaften zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Die Isolation von kernhaltigen fetalen Erythrozyten aus mütterlichen Blut liefert zuverlässigere Ergebnisse, da diese in der Regel nicht im Blut von Erwachsenen vorkommen. Durch den Nachweis von fetalem Hämoglobin können die kernhaltigen Erythrozyten der Mutter oder dem Kind zugeordnet werden [Simpson et al.; 1995]. Allerdings sind kernhaltige Erythrozyten bei gesteigerter Erythropoese, also auch in der Schwangerschaft, prozentual häufiger im peripheren Blut zu finden. Gerade die im ersten Schwangerschafts-Trimenon im mütterlichen Blut nachweisbaren kernhaltigen Erythrozyten scheinen zum Großteil maternalen Ursprungs zu sein [Slunga-Tallberg et al.; 1995]. Ebenso können fetale Hämoglobinketten in Ausnahmefällen auch bei Erwachsenen existieren.

Fetale Trophoblasten kommen nur in geringer Zahl im mütterlichen Blut vor. Ihre Lebensdauer dort ist kurz, da sie in den Mikrokapillaren der mütterlichen Lunge lysiert werden [Avent et al; 2000]. Lo et al. [1998] beschäftigten sich mit fetalen Trophoblasten, die aus mütterlichem Plasma isoliert wurden. Mit dieser Methode ist das Risiko einer Fehlbestimmung im ersten Schwangerschafts-

Trimenon erhöht, erst ab dem zweiten Trimenon werden die Ergebnisse als verlässlich beschrieben.

Auch die Genotypisierung fetaler mRNA scheint möglich [Hamlington et al.; 1997]. Die Ergebnisse sind sensitiver als die zuvor beschriebenen, der Prozentsatz falsch-negativer Bestimmungen in der Frühschwangerschaft ist jedoch hoch [Cunningham et al.; 1999; Al-Mufti et al.; 1998].

Der direkte Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Plasma soll als weitere Methode etabliert werden. Die Menge fetaler DNA im mütterlichen Kreislauf bei schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen und bei Trisomie 21 ist erhöht, die Halbwertszeit nach der Entbindung jedoch insgesamt sehr kurz [Lo; 2000].

Die Ergebnisse der Studien über die Isolation fetaler DNA aus peripherem mütterlichem Blut sind sehr uneinheitlich. Der Prozentsatz falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse ist zum Teil sehr hoch [Lo et al; 1993]. Eine mangelnde Anreicherung fetaler Zellen kann zu falsch-negativen Ergebnissen der PCR führen. Für ein eindeutiges Ergebnis muß die Amplifikation mindestens zweimal erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit diskrepanter Ergebnisse ist dabei hoch.

Dem durchaus positiven Tenor der meisten Studien [z.B. Geifman-Holzman et al.; 1996 und Sekizawa et al.; 1996] stehen falsch-positive Fehltypisierungen von RhD-negativen Feten von 50% gegenüber [Dinh et al.; 1995].

Nur das Mitführen einer internen Kontrolle gewährleistet zuverlässige Ergebnisse. Als interne Kontrolle müssen fetale Allele amplifiziert werden, ohne deren Nachweis keine RhD-Amplifikation als verlässlich betrachtet werden kann. Bislang existiert ausschließlich ein Primer-Set spezifisch für das Y-Chromosom, das zumindest bei Schwangerschaften mit einem männlichen Fetus verlässlich erscheint [Avent et al.; 2000].

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse und der fehlenden Kontrollen scheint der routinemäßige Einsatz nicht-invasiver Methoden in der Pränataldiagnostik bislang nicht sinnvoll.

4.8 Pränataler Einsatz von AB0-PCR-Methoden

Die AB0-PCR-Methode wurde in dieser Studie angewandt, um die Möglichkeit einer Kontaminationen des Fruchtwassers mit mütterlichen Zellen zu überprüfen.

Generell ist die AB0-Genotypisierung in der pränatalen Diagnostik jedoch von untergeordneter Bedeutung. Das Krankheitsbild des Morbus haemolyticus neonatorum wird nur selten durch AB0-Inkompatibilität ausgelöst. Nur in einem derartigen Verdachtsfall ist der Nachweis des kindlichen AB0-Genotyps sinnvoll.

Der Nachweis der AB0-Gene ist jedoch bei eingeschränkter Aussagekraft serologischer Untersuchungen hilfreich, z. B. bei Neugeborenen mit unvollständiger AB0-Antigenexpression. Auch nach AB0-differenter Knochenmarkstransplantation oder nach massiven Transfusionen von Fremderythrozyten kann mit Hilfe der AB0-PCR der ursprüngliche Serotyp bestimmt werden.

5 Zusammenfassung

Die Rhesus-Blutgruppenantigene (C, c, E, e und D) werden von zwei Genen (*RHD* und *RHCE*) auf Chromosom 1 codiert. Das *RHD*-Gen läßt sich bei RhD-positiven Menschen durch eine Polymerasekettenreaktion amplifizieren.

Im Rahmen der Pränataldiagnostik kann nach Amniozentese die Bestimmung der kindlichen RhD-Zugehörigkeit aus fetaler DNA erfolgen. Die molekulargenetische RhD-Bestimmung aus Fruchtwasser ist jedoch im Vergleich zur Entnahme von Nabelschnurblut zur serologischen RhD-Typisierung weniger riskant für den Verlauf der Schwangerschaft und führt in einem geringeren Prozentsatz zu einer Immunisierung der Mutter.

Die DNA-Isolation sollte aufgrund der einfachen Handhabung und den konstant zuverlässigen Ergebnissen mit gebrauchsfertig erwerbbaaren Extraktionskits durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 252 Fruchtwasserproben mit zwei verschiedenen RhD-PCR-Methoden genotypisiert. In 114 Fällen lag postpartal der serologische RhD-Phänotyp des Kindes vor, so daß Sensitivität und Spezifität der beiden Methoden evaluiert werden konnte.

In 95,6% der Fälle waren die serologische und die molekulargenetische RhD-Typisierung identisch.

In zwei Fällen wurde das Kind einer RhD-positiven Mutter mit beiden Methoden falsch-positiv typisiert. Eine weitere RhD-PCR-Methode bestätigte das RhD-positive Ergebnis. Die Blutgruppenkonstellation von Mutter und Kind sowie Bestimmung der AB0-Blutgruppenantigene bestätigten die Vermutung einer Kontamination des Amniozentesematerials durch mütterliche Zellen.

In drei Fällen zeigten die beiden hier validierten PCR-Methoden diskrepante Ergebnisse. Bei der Genotypisierung durch eine dritte RhD-PCR-Methode wurden alle drei Proben übereinstimmend mit dem serologischen Ergebnis RhD-negativ typisiert. Durch Mehrfachbestimmungen wurde eine mögliche Kontamination der PCR-Ansätze mit RhD-positiver DNA mit großer Sicherheit ausgeschlossen. Die Ursache der unspezifischen Amplifikation bleibt unklar.

Lediglich durch eine Sequenzierung der jeweiligen *RHD*-Gene könnten Veränderungen der Genstrukturen ausgeschlossen werden.

Bei der Genotypisierung der Proben von 27 RhD-negativen Müttern wurden die Kinder bis auf eine Ausnahme korrekt mit beiden PCR-Methoden RhD-positiv bzw. RhD-negativ typisiert.

Durch den Einsatz mehrerer PCR-Methoden und unter Verwendung verschiedener Primer kann bei immunisierten RhD-negativen Müttern der Rhesus-Status des Kindes bereits früh in der Schwangerschaft zuverlässig bestimmt werden. Bei RhD-negativen Kindern kann anschließend auf eine risikoreiche Nabelschnurpunktion verzichtet werden. Bei RhD-positiven Kindern besteht die Möglichkeit, die Risikoschwangerschaft ab einem frühen Zeitpunkt optimal zu betreuen.

Die hier evaluierten Methoden zur pränatalen Rhesusdiagnostik durch PCR ergeben bei Kaukasiern zuverlässige Ergebnisse, sofern nach sorgfältig durchgeführter Amniozentese mindestens zwei verschiedene RhD-Methoden angewandt werden. Ausgenommen sind hiervon RhD-negative Phänotypen, die ein *RHD*-Gen besitzen, das nicht exprimiert wird. Bei Nicht-Kaukasiern müssen die Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden. Der Einsatz einer sequenzspezifischen Polymerasekettenreaktion oder die Auswahl anderer spezifischer Primer kann in diesen Fällen von Nutzen sein.

Der Einsatz einer ABO-PCR in der pränatalen Diagnostik erscheint aufgrund mangelnder Indikationen nicht sinnvoll. Diese Methode sollte nur dann zum Einsatz kommen, wenn die Aussagekraft serologischer Untersuchungen beeinträchtigt ist.

6 Literaturverzeichnis

Adinolfi M, Sherlock J, Kemp T, Carritt B, Southill P, Kingdom J, Rodeck C: Prenatal detection of fetal RhD DNA sequences in transcervical samples.
Lancet 1995; 345: 318-319

Agre P, Cartron JP: Molecular biology of the Rh antigens.
Blood 1991; 78: 551-563

Al-Mufti R, Howard C, Overton T, Holzgreve W, Gaenshirt D, Fisk NM, Bennett P: Detection of fetal messenger ribonucleic acid in maternal blood to determine fetal RhD status as a strategy for noninvasive prenatal diagnosis.
Am J Obstet Gynecol 1998; 179: 210-214

Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM: Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals.
Blood 1993; 82: 651-655

Aubin JT, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, Brossard Y, Cartron JP: Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification.
Br J Haematol 1997; 98: 356-364

Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJ, Anstee DJ: cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression.
Biochem J 1990; 271: 821-825

Avent ND, Butcher SK, Liu W, Mawby WJ, Mallinson G, Parsons SF, Anstee DJ, Tanner MJ: Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane.
J Biol Chem 1992; 267: 15134-15139

Avent ND, Liu W, Warner KM, Mawby WJ, Jones JW, Ridgwell K, Tanner MJ: Immunochemical analysis of the human erythrocyte Rh polypeptides.

J Biol Chem 1996; 271: 14233-14239

Avent ND: Prenatal determination of fetal Rh status using the PCR.

Biotest Bulletin 1997; 5: 429-438

Avent ND, Daniels GL, Martin PG, Green CA, Finning KM, Warner KM: Molecular investigation of the Rh C/c polymorphism.

Transfus Med 1997a; 7(suppl 1): 18

Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, Maddocks D, Urbaniak SJ: Evidence of genetic diversity underlying RhD⁻, weak D (D^u), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the *RHD* gene.

Blood 1997b; 89: 2568-2577

Avent ND, Liu W, Jones JW, Scott ML, Voak D, Pisacka M, Watt J, Fletcher A: Molecular analysis of Rh transcripts and polypeptides from individuals expressing the D^{VI} variant phenotype: an *RHD* gene deletion event does not generate all D^{VI}ccEe phenotypes.

Blood 1997c; 89: 1779-1786

Avent ND: Antenatal genotyping of the blood groups of the fetus.

Vox Sang 1998; 74 (Suppl 2): 365-374

Avent ND, Reid ME: The Rh blood group system: a review.

Blood 2000; 95: 375-387

Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothill PW: Prenatal determination of fetal blood group status.

Vox Sang 2000; 78 (suppl 2): 155-162

Ballas SK, Clark MR, Mohandas N, Colfer HF, Caswell MS, Bergren MO, Perkins HA, Shohet SB: Red cell membrane and cation deficiency in Rh-null syndrome.

Blood 1984; 63: 1046-1055

Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM, Path FR, Chérif-Zahar B, Fisk NM, Cartron JP: Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification.

N Eng J Med 1993; 329: 607-610

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum.

Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 705-708

Blunt T, Daniels G, Carritt B: Serotype switching in a partially deleted RHD gene.

Vox Sang 1994; 67: 397-401

Bowman JM, Pollock JM: Transplacental fetal hemorrhage after amniocentesis.

Obstet Gynecol 1985; 66: 749-754

Bowman JM: RhD hemolytic disease of the newborn.

N Engl J Med 1998; 339: 1775-1777

Brambati B, Anelli MC, Tului L, Colombo G: Fetal RhD typing by DNA amplification in chorionic villus sample.

Lancet 1994; 344: 959-960

Bui TH, Iselius L, Lindsten J: European collaborative study on prenatal diagnosis: mosaicism, pseudomosaicism and single abnormal cells in amniotic fluid cell cultures.

Prenat Diagn 1984; 4: 145-162

Bundesausschuß der Ärzte und Krankenkassen: Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“).

Bundesanzeiger 1999; 16: Dokumentnummer 212/20

Carelli MP, Gersen SL, McGuire N, Ward BE: Interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by FISH: assay success rates by gestational age (GA).

Am J Hum Genet 1992; 51: A254

Carritt B, Kemp TJ, Poulter M: Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled.

Hum Mol Genet 1997; 6: 843-850

Cartron JP: Defining the Rh blood group antigens. Biochemistry and molecular genetics.

Blood Rev 1994; 8: 199-212

Chávez GF, Mulinare J, Edmonds LD: Epidemiology of Rh hemolytic disease of the newborn in the United States.

JAMA 1991; 265: 3270-3274

Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, Salmon C, Cartron JP, Colin Y: Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide.

Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 6243-6247

Chérif-Zahar B, Mattéi MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y: Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3 - 1p36.1 by in situ hybridization.

Hum Genet 1991; 86: 398-400

Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, Raynal V, Cartron JP, Colin Y: Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promotor region.

Genomics 1994; 19: 68-74

Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP: Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis.

Blood 1991; 78: 2747-2752

Crombach G, Picard F, Beckmann MW, Niederacher D, Bender HG: Pränatale Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors in Amnionzellen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion.

Geburtshilfe Frauenheilkd 1995; 55: 577-579

Crombach G, Picard F, Beckmann M, Tutschek B, Bald R, Niederacher D: Fetal Rhesus D genotyping on amniocytes in alloimmunised pregnancies using fluorescence duplex polymerase chain reaction.

Br J Obstet Gynaecol 1997; 104: 15-19

Cunningham J, Yates Z, Hamlington J, Mason G, Mueller R, Miller D: Non-invasive RNA-based determination of fetal Rhesus D type: a prospective study based on 96 pregnancies.

Br J Obstet Gynaecol 1999; 106: 1023-1028

Dildy GA, Jackson GM, Ward K: Determination of fetal RhD status from uncultured amniocytes.

Obstet Gynecol 1996; 88: 207-210

Dinh T, Gupta P, Ruta A, Smith B, Jackson L, Wapner R: First and early second trimester determination of fetal Rh status using DNA isolated from maternal blood.

Am J Hum Genet 1995; 57: 1616

Eyers SA, Ridgwell K, Mawby WJ, Tanner MJ: Topology and organization of human Rh (Rhesus) blood group-related polypeptides.

J Biol Chem 1994; 269: 6417-6423

Ferguson-Smith MA, Aitken DA, Turleau C, de Grouchy J: Localisation of the human AB0: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34.

Hum Genet 1976; 34: 35-43

Fisher RA, cited by Race RR: An „incomplete“ antibody in human serum.

Nature 1944; 153: 771-772

Fisk RT, Foord AG: Observations on the Rh agglutinin of human blood.

Am J Clin Pathol 1942; 12: 545

Fisk NM, Bennett P, Warwick RM, Letsky EA, Welch R, Vaughan JI, Moore G: Clinical utility of fetal RhD typing in alloimmunized pregnancies by means of polymerase chain reaction on amniocytes or chorionic villi.

Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 50-54

Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C: Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice.

Transfus Med 1998; 8: 281-302

Flegel WA, Wagner FF: Molecular genetics of *RH*.

Vox Sang 2000; 78 (suppl 2): 109-115

Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönitzer W:

ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers.

Blood 1996; 88: 1852-1856

Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Müller TH, Wagner FF, Flegel WA, Schönitzer D: *RHD/CE* typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers.

Transfusion 1997; 37: 1020-1026

Geifman-Holtzman O, Bernstein IM, Berry SM, Holtzman EJ, Vadnais TJ, DeMaria MA, Bianchi DW: Fetal RhD genotyping in fetal cells flow sorted from maternal blood.

Am J Obstet Gynecol 1996; 174: 818-822

Ghidini A, Sepulveda W, Lockwood CJ, Romero R: Complications of fetal blood sampling.

Am J Obstet Gynecol 1993; 168: 1339-1344

Hallensleben M, Heuft HG, Blasczyk R: Molecular screening of the ABO-glycosyltransferase gene by primer walking.

Infusionsther Transfusionsmed 1999; 26 (suppl 1): 29

Hamlington J, Cunningham J, Mason G, Mueller R, Miller D: Prenatal detection of rhesus D genotype.

Lancet 1997; 349: 540

Hanson FW, Tennant F, Hune S, Brookhyser K: Early amniocentesis: outcome, risks, and technical problems at less than or equal to 12,8 weeks.

Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 1707-1711

Huang CH: Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens.

Curr Opin Hematol 1997; 4: 94-103

Huang CH, Reid ME, Chen Y, Novaretti M: Deletion of Arg229 in RhCE polypeptide alters expression of RhE and CE-associated Rh6.

Blood 1997; 90 (suppl 1): 272a

Huang CH, Liu PZ, Cheng JG: Molecular biology and genetics of the Rh blood group system.

Semin Hematol 2000; 37: 150-165

Kiparski S von, Northoff H, Flegel WA, Neumeister B: Rh blood group antigens-update.

Clin Lab 2000; 46: 17-22

Lacey PA, Caskey CR, Werner DJ, Moulds JJ: Fatal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh-positive D^u variant mother.

Transfusion 1983; 23: 91-94

Landsteiner K: Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe.

Zentralbl Bakteriol 1900; 27: 357-363

Landsteiner K, Wiener AS: An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood.

Proc Soc Exp Biol 1940; 43: 223

Legler TJ, Maas JH, Blaschke V, Malekan M, Ohto H, Lynen R, Bustami N, Schwartz DW, Mayr WR, Köhler M, Panzer S: *RHD* genotyping in weak D phenotypes by multiple polymerase chain reactions

Transfusion 1998; 38: 434-440

Le Van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron JP, Colin Y: Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10925-10929

Le Van Kim C, Mouro I, Brossard Y, Chavinié J, Cartron JP, Colin Y: PCR-based determination of Rhc and RhE status of fetuses at risk of Rhc and RhE haemolytic disease.

Br J Haematol 1994; 88: 193-195

Levine P, Stetson RE: An unusual case of intragroup agglutination.

J Am Med Assoc 1939; 113: 126-127

Levine P, Katzin EM, Burnham L: Isoimmunization in pregnancy, its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis.

J Am Med Assoc 1941; 116: 825-827

Lighten AD, Overton TG, Sepulveda W, Warwick RM, Fisk NM, Bennett PR: Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells.

Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 1182-1185

Liu W, Smythe JS, Scott ML, Jones JW, Voak D, Avent ND: Site-directed mutagenesis of the human D antigen: definition of D epitopes on the sixth external domain of the D protein expressed on K562 cells.

Transfusion 1999; 39: 17-25

Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, Littlewood TJ, Fleming KA, Wainscoat JS: Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers.

Lancet 1993; 341: 1147-1148

Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS: Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma.

N Engl J Med 1998; 339: 1734-1738

Lo YM: Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications.

Clin Chem 2000; 46: 1903-1906

Lomas C, McColl K, Tippet P: Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D.

Transfus Med 1993; 3: 67-69

Maas JH, Legler TJ, Lynen R, Blaschke V, Ohto H, Köhler M: [Rh-D genotyping for exon 2, 5 and 7 of German and Japanese blood donors with sequence specific polymerase chain reaction].

Infusionsther Transfusionsmed 1997; 34: 203-209

Maaskant-van Wijk PA, Faas BH, de Ruijter JA, Overbeeke MA, von dem Borne AE, van Rhenen DJ, van der Schoot CE: Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD specific exons.

Transfusion 1998; 38: 1015-1021

Marini AM, Urrestarazu A, Beauwens R, André B: The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to NH_4^+ transporters.

Trends Biochem Sci 1997; 22: 460-461

Marini AM, Matassi G, Raynal V, André B, Cartron JP, Chérif-Zahar B: The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast.

Nat Genet 2000; 26: 341-344

Martius G, Breckwoldt M, Pfeleiderer A: Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York 1996; 144-149

Matassi G, Chérif-Zahar B, Raynal V, Rouger P, Cartron JP: Organization of the human *RH50A* gene (RHAG) and evolution of base composition of the RH gene family. Genomics 1998; 47: 286-293

Mayne K, Howell P, Woodward T, Sibley C, Lomas C, Tippet P: Rh immunization by the partial D antigen of category D^{Va}. Br J Haematol 1990; 76: 537-539

Moore S, Woodrow CF, McClelland DB: Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh_o(D), (c), (E) and Fy^a. Nature 1982; 295: 529-531

Mouro I, Colin Y, Chérif-Zahar B, Cartron JP, Le Van Kim C: Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. Nat Genet 1993; 5: 62-65

Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C, van Rhenen DJ, Le Pennec PY, Bailly P, Cartron JP, Colin Y: Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the D^{VI} category phenotype. Blood 1994; 83: 1129-1135

Müller TH, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R: Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik – Grundlagen und klinische Anwendungen. Dt Ärztebl 2001; 98: A 317-322

Nicolini U, Kochenour NK, Greco P, Letsky EA, Johnson RD, Contreras M, Rodeck CH: Consequences of feto-maternal haemorrhage after intrauterine transfusion. BMJ 1988; 297: 1379-1381

Nuß S, Brebaum D, Grond-Ginsbach C: Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique. Hum Genet 1994; 93: 121-124

Olsson ML, Chester MA: A rapid and simple AB0 genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the AB0 locus.

Vox Sang 1995; 69: 242-247

Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Kajii E: The *RHD* gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors.

J Clin Invest 1997; 100: 373-379

Okuda H, Suganuma H, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E: Sequence analysis of the spacer region between the *RHD* and *RHCE* genes.

Biochem Biophys Res Commun 1999; 263: 378-383

Pope J, Navarrete C, Warwick R, Contreras M: Multiplex PCR analysis of RhD gene.

Lancet 1995; 346: 375-376

Poulter M, Kemp TJ, Carritt B: DNA-based rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction.

Vox Sang 1996; 70: 164-168

Race RR: The Rh genotypes and Fisher's theory.

Blood 1948; 3: 27-42

Ridgwell K, Spurr NK, Laguda B, MacGeoch C, Avent ND, Tanner MJ: Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (rhesus) blood-group antigen expression.

Biochem J 1992; 287: 223-228

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie.

Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York 1993; 534-535

Rosenfield RE, Allen FH, Swisher SN, Kochwa S: A review of Rh serology and presentation of a new terminology.

Transfusion 1962; 2: 287-312

Rossiter JP, Blakemore KJ, Kickler TS, Kasch LM, Khouzami AN, Pressman EK, Sciscione AC, Kazazian HH: The use of polymerase chain reaction to determine fetal RhD status.

Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 1047-1051

Rouillac C, Gane P, Cartron J, Le Pennec PY, Cartron JP, Colin Y: Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D(D^u) and Rh C/e in R^N phenotypes.

Blood 1996; 87: 4853-4861

Salvignol I, Blancher A, Calvas P, Socha WW, Colin Y, Cartron JP, Ruffié J: Relationship between chimpanzee Rh-like genes and the R-C-E-F blood group system.

J Med Primatol 1993; 32: 19-28

Schachter H, Michaels MA: A quantitative difference in the activity of blood group A-specific N-acetylgalactosaminyltransferase in serum from A1 and A2 human subjects.

Biochem Biophys Res Commun 1971; 45: 1011-1018

Schroder J, Tiilikainen A, De la Chapelle A: Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery.

Transplantation 1974; 17: 346-454

Scott ML, Voak D, Jones JW, Avent ND, Liu W, Hughes-Jones N, Sonneborn HH: A structural model for 30 RhD epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes.

Transfus Clin Biol 1996; 3: 391-396

Scott ML, Voak D, Jones JW, Avent N, Hughes-Jones N, Sonneborn HH: A model for RhD - the relationship of 30 serologically defined epitopes to predicted structure.

Biotest Bull 1997; 5: 459-466

Scott ML, Voak D, Liu W, Jones JW, Avent ND: Epitopes on Rh proteins.

Vox Sang 2000; 78 (suppl 2): 117-120

Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, Sato T: Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood.

Obstet Gynecol 1996; 87: 501-505

Simpson JL, Lewis DE, Bischoff FZ, Elias S: Isolating fetal nucleated red blood cells from maternal blood: the Baylor experience-1995.

Prenat Diagn 1995; 15: 907-912

Simsek S, Bleeker PM, von dem Borne AE: Prenatal determination of fetal RhD type.

N Engl J Med 1994; 330: 795-796

Simsek S, Faas BH, Bleeker PM, Overbeeke MA, Cuijpers HA, van der Schoot CE, von dem Borne AE: Rapid RhD genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA.

Blood 1995; 85: 2975-2980

Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G: The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype.

Blood 2000; 95: 12-18

Slunga-Tallberg A, El-Rifai W, Keinänen M, Ylinen K, Kurki T, Klinger K, Ylikorkala O, Knuutila S: Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women.

Hum Genet 1995; 96: 53-57

Sonneborn HH, Voak D: A review of 50 years of the Rh blood group system.

Biotest Bull 1997; 5: 390

Spence WC, Maddalena A, Demers DB, Bick DP: Molecular analysis of the Rh locus in a person with the D^u phenotype.

Transfusion 1994; 34: 741-742

Spence WC, Maddalena A, Demers DB, Bick DP: Molecular analysis of the RhD genotype in fetuses at risk for RhD hemolytic disease.

Obstet Gynecol 1995; 85: 296-298

Steers F, Wallace M, Johnson P, Carrit B, Daniels G: Denaturing gradient gel electrophoresis: a novel method for determining Rh phenotype from genomic DNA.

Br J Haematol 1996; 94: 417-421

Sun CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT: *RHD* gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan.

Vox Sang 1998; 75: 52-57

Tills D, Kopec AC, Tills RE: The distribution of the human blood groups and other polymorphism.

Suppl 1. Oxford: Oxford University Press; 1983

Tippett P: A speculative model for the Rh blood groups.

Ann Hum Genet 1986; 50: 241-247

Tippett P: Subdivisions of the Rh(D) antigen.

Med Lab Sci 1988; 45:88

Tonn T, Westrup D, Seidl C, Kirchmaier CM, Seifried E: Sensitive determination of the RhD genotype in mixed samples using fluorescence-based polymerase chain reaction.

Vox Sang 1997; 72: 177-181

Urbaniak SJ, Robertson AE: A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen / thawed blood.

Transfusion 1981; 21: 64-69

Urbaniak SJ, Cochrane S, Armstrong-Fisher SS, Clark D: The identification of discrepancies between serological and genotypic assignment of rhD status using the polymerase chain reaction (PCR).

Transfusion 1995; 35 (Suppl 10S): 51

Urbaniak SJ: Statement from the consensus conference on anti-D prophylaxis.

Vox Sang 1998; 74: 127-128

Van den Veyver IB, Chong SS, Cota J, Bennett PR, Fisk NM, Handyside AH, Cartron JP, Le Van Kim C, Colin Y, Snabes MC, Moise KJ, Hughes MR: Single-cell analysis of the RhD blood type for use in preimplantation diagnosis in the prevention of severe hemolytic disease of the newborn.

Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 533-540

Van den Veyver IB, Subramanian SB, Hudson KM, Werch J, Moise KJ, Hughes MR: Prenatal diagnosis of the RhD fetal blood type on amniotic fluid by polymerase chain reaction.

Obstet Gynecol 1996; 87: 419-422

Vetten MP de, Agre P: The Rh polypeptide is a major fatty acid-acylated erythrocyte membrane protein.

J Biol Chem 1988; 263:18193-18196

Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA: Frequencies of the blood groups AB0, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in South-Western Germany.

Infusionsther Transfusionsmed 1995; 22: 285-290

Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features.

Blood 1998; 91: 2157-2168

Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Molecular basis of weak phenotypes.

Blood 1999; 93: 385-393

Warren RC, Butler J, Morsman JM, McKenzie C, Rodeck CH: Does chorionic villus sampling cause fetomaternal haemorrhage?

Lancet 1985; 1: 691

Westhoff CM, Silberstein LE, Sipherd B: Altered „e“ antigen expression associated with ¹⁶Cys in exon 1 of the RHce gene.

Transfusion 1998; 38 (suppl): 64S

Wiener AS: The Rh series of allelic genes.

Science 1944; 100: 595-597

Wolter LC, Hyland CA, Saul A: Rhesus D genotyping using polymerase chain reaction.

Blood 1993; 82: 1682-1683

Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S: Molecular genetic basis of the human histo-blood group AB0 system.

Nature 1990; 345: 229-233

Yamamoto F, Hakomori S: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A und B transferases is based on amino acid substitutions.

J Biol Chem 1990; 265: 19257-19262

Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S: Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal.

Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 366-374

Yankowitz J, Li S, Murray JC: Polymerase chain reaction determination of RhD blood type: An evaluation of accuracy.

Obstet Gynecol 1995; 86: 214-217

Zhu A, Haller S, Li H, Chaudhuri A, Blancher A, Suyama K: Use of RhD fusion protein expressed on K562 cell surface in the study of molecular basis for D antigenic epitopes.

J Biol Chem 1999; 274: 5731-5737

7 Anhang

7.1 Antwortbogen

<u>ANTWORTBOGEN</u> Wir bitten Sie, auf diesem Bogen die Blutgruppe Ihres Kindes anzukreuzen; Sie finden diese Angabe in Ihrem Mutterpaß auf Seite 11 oder Seite 27. ☐ A positiv ☐ A negativ ☐ B positiv ☐ B negativ ☐ AB positiv ☐ AB negativ ☐ O positiv ☐ O negativ Sollten Sie in Ihrem Mutterpaß andere oder keine Angaben finden, so bitten wir Sie, uns diese oder die Adresse der Klinik, in der Sie entbunden haben, sowie Namen und Geburtsdatum Ihres Kindes mitzuteilen. Wir danken Ihnen recht herzlich für Ihre Mithilfe und wünschen Ihnen und Ihrem Kind weiterhin alles Gute.

Abbildung 15: Antwortbogen mit Frage nach der Blutgruppe des Kindes, welcher nach errechnetem Geburtstermin an die Mütter versandt wurde.

7.2 Studien

Studie	untersuchter Polymorphismus		Proben (n)	Material	Fehlbestimmungen/ Ergebnisse
	Intron	Exon			
Lo et al. [1993]		10	21	mB	falsch positiv: 3 falsch negativ: 2
Arce et al. [1993]	4		8	B	0
Bennett et al. [1993]		10	15	FW	0
Wolter et al. [1993]		7	3	B	0
Fisk et al. [1994]		10	6	AF, CVS	0
Brambati et al. [1994]		10	51	CVS	0
Rossiter et al. [1994]	4		28	B, FW	0
Simsek et al. [1994]	4	10	200	B	falsch positiv: 3 falsch negativ: 2
Yankowitz et al. [1995]	4		765	B	falsch positiv: 7 falsch negativ: 2
v.d. Veyver et al. [1995]		7	100	B, AF, LB	falsch positiv: 1 falsch negativ: 1 nicht bestimmbar: 1
Lighten et al. [1995]		10	135	AF	falsch negativ: 2
Adinolfi et al. [1995]		10	12	TCC	falsch negativ: 2
Simsek et al. [1995]	4	7, 10	234	B	falsch positiv: 4 falsch negativ: 2
Spence et al. [1995]	4	10	50	AF, CVS	0
Pope et al. [1995]	4	10	63	AF, B	Fehlbestimmungen für RhD-Untergruppen

Studie	untersuchter Polymorphismus		Proben (n)	Material	Fehlbestimmungen/ Ergebnisse
	Intron	Exon			
Crombach et al. [1995]		7, 10	53	AF	0
Urbaniak et al. [1995]	4	10	408	B	falsch positiv: 8 falsch negativ: 11
Poulter et al. [1996]	2		105	B	0
v.d. Veyver et al. [1996]		7	108	AF	0
Sekizawa et al. [1996]		7	10	mB	0, nicht bestimmbar: 4
Dildy et al. [1996]		10	347	AF	falsch positiv: 1
Geifmann-Holtzman [1996]		10	19	mB	0, nicht bestimmbar: 3
Crombach et al. [1997]		7, 10	41	AF	0
Hamlington et al. [1997]		10	7	mB	0, nicht bestimmbar: 1
Tonn et al. [1997]		10	78	B	0
Maas et al. [1997]		2, 5, 7	207	B	0
Gassner et al. [1997]		2-7, 9, 10	354	B	Bestimmung von RhD- Untergruppen
Avent et al. [1997]	4	10	357	B	Fehlbestimmungen bei RhD-Untergruppen
Maaskant-van Wijk et al. [1998]		3-7, 9	119	B	0
Legler et al. [1998]		2, 5, 7	346	B	D weak-Individuen, keine Fehlbestimmungen
Lo et al. [1998]		10	57	mP	nicht bestimmbar: 2

Tabelle 19: Studien bezüglich der RhD-Genotypisierung.

Material: AF = Fruchtwasser, mB = mütterliches Blut, B = venöses Blut, CVS = Material aus Chorionzottenbiopsie, mP = mütterliches Plasma, LB = Lymphoblasten

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen danken, die das Entstehen dieser Arbeit gefördert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Bein für die Übernahme des Dissertationsthemas nach der Emeritierung von Prof. Dr. C. Mueller-Eckhardt.

Frau Dr. B. Rothe danke ich für die Einarbeitung, die gute Betreuung und freundliche Zusammenarbeit.

Des weiteren möchte ich Herrn PD Dr. Dr. M. Kirschbaum aus der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen danken, durch dessen Kooperation es möglich war, regelmäßig Fruchtwasserproben aus dem Amniozenteselabor zu erhalten.

Für die herzliche Aufnahme und das fröhliche Arbeitsklima im Labor danke ich Frau Heike Berghöfer und Frau Lida Röder.

9 Lebenslauf

Kerstin Schweidler

*17. 08. 1973 in Friedberg / Hessen

Schulbildung

1979 – 83	Geschwister-Scholl-Schule in Niddatal-Assenheim
1983 – 92	St. Lioba-Gymnasium in Bad Nauheim
05 / 1992	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1992-03/1999	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/1994	Ärztliche Vorprüfung
03/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ÄiP

11/1999 – 04/2001 in der Anästhesiologischen Abteilung am St. Josefs Hospital, Wiesbaden

Assistenzärztin

seit 05/2001 in der Anästhesiologischen Abteilung am St. Josefs Hospital, Wiesbaden