

Diplomarbeit

**Molekulargenetische Untersuchungen im ABO-System
unter besonderer Berücksichtigung des Allels O⁵ [O52]**

eingereicht von

Zink Katharina

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und

Transfusionsmedizin

unter der Anleitung von

ao. Univ. - Prof. Dr. med. univ. Thomas Wagner, MSc.

Mag.^a rer. nat. Dr.ⁱⁿ Eva-Maria Matzhold

Graz, den 27. April 2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 27. April 2017

Katharina Zink eh

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern, Prof. Dr. med. Thomas Wagner und Dr. Eva-Maria Matzhold, bedanken. Ich habe, dank ihnen, während dieser Arbeit viel Neues gelernt, zu dem ich sonst keinen Zugang gehabt hätte. Auf Rückfragen bekam ich allzeit schnelle und hilfreiche Antworten. Ganz besonders möchte ich mich für ihr Verständnis für die Verzögerungen in der Fertigstellung der Arbeit und ihre Gelassenheit bedanken. Der Endspurt, den sie um meinetwillen hingelegt haben, kam einem Kraftakt gleich. Danke!

Ein großer Dank geht auch an Silvia Sorantin und ihr Laborteam, für ihre unermüdliche Hilfe bei jeglichen praktischen Tätigkeiten. Die angenehme Stimmung im Labor erleichterte mir die Arbeit ungemein und ohne ihre Unterstützung wäre diese Studie nicht zustande gekommen.

Mein Dank gilt im Besonderen meinen Eltern, Edeltraud Zink und Hans-Christian Winter, sowie meinem Partner, Martin Calineata, die mich ohne Unterlass mit ihrem Optimismus moralisch unterstützt haben und mir eine große Hilfe in technischen und schriftstellerischen Belangen waren. Ihr Rückhalt gibt mir die Zuversicht, die für mich notwendig ist, um neue Herausforderungen zu wagen.

Zusammenfassung

Einleitung: Die ABO-Blutgruppe (BG) wird über Gene am Chromosom 9, durch die dort codierten Enzyme gesteuert. Diese sind Glykosyltransferasen, die, sofern funktionsfähig, entweder Galactose (BG B) oder N-Acetylgalactosamin (BG A) an eine Vorläufersubstanz H binden. Die Veränderung eines einzelnen Nukleotids in einem Gen kann zur Inaktivierung des codierten Enzyms führen. Die meisten O-Allele des ABO-Gens sind durch die Deletion c.261delG im Exon 6 bedingt, welche zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stoppcodon nach der Aminosäure 117 führt. Abgesehen davon besitzt das O¹-Allel die gleiche Nukleinsäuresequenz wie das A¹-Allel. Nicht-deletionale O-Allele stellen eine Herausforderung für die molekularbiologische BG-Bestimmung dar. SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Screening Methoden suchen nach bekannten Mutationen, können aber Neumutationen an anderen Positionen einer Gensequenz nicht detektieren. Das O⁵-Allel trägt die Nukleotid-Substitution c.322C>T (p.Gln108Stop) im Exon 6 des ABO Gens, die zu einem Abbruch der Proteinsynthese nach der Aminosäure 107 führt. Das resultierende Protein besitzt keine ABO-Transferaseaktivität und kann kein A-Antigen ausbilden. Träger dieses Allels mit dem Genotyp OO oder BO sollten folglich regelmäßig Anti-A Antikörper bilden. Dies ist bei Trägern des O⁵-Allels nicht der Fall. Ziel der Studie war es, einen Zusammenhang zwischen der auffälligen Serologie und dem O⁵-Allel zu finden, sowie die Häufigkeit des Allels in der steirischen Bevölkerung zu bestimmen.

Methodik: 220 zufällig gewählte Proben aus dem steirischen Blutspenderpool wurden serologisch auf ihre Blutgruppe getestet. Aus den unauffälligen Proben wurde die DNA extrahiert und mittels SNP Screening PCR auf die O⁵-Mutation getestet. Das ABO-Gen, der bei der Testung mitgeführten Positivkontrolle, wurde mittels Longrange PCR amplifiziert und durch eine Sequenzanalyse nach Sanger auf die Präsenz der O⁵-Mutation überprüft.

Des Weiteren wurden 14 bereits entdeckte O⁵-Spenden auf geographische oder familiäre Zusammenhänge mithilfe dokumentierter Daten der Software ePROGESA untersucht.

Ergebnisse: Von den 220 Proben, wurden 94 Proben der BG A, 33 der BG B, 9 der BG AB und 81 der BG O zugeordnet, was der ABO Blutgruppenverteilung in der europäischen Bevölkerung entspricht. Drei Proben konnten serologisch nicht näher bestimmt werden. Unter den Proben befand sich kein O⁵-Allel. Die Sequenzierung der Positivkontrolle ergab den Genotyp O²⁻¹/O⁵ [O03/O52]. Aus der Verbreitung der bekannten O⁵-Spenden in der Steiermark konnten keine besonderen Schlüsse gezogen werden.

Diskussion: Die Ergebnisse zeigen, dass das O⁵-Allel, mit einer Frequenz kleiner 0,22 %, in der steirischen Bevölkerung nur sehr selten vorhanden ist.

Da keine O⁵-positiven Spender unter dem Pool der serologisch unauffälligen Spender entdeckt wurden, wird die Hypothese unterstützt, dass ein Zusammenhang zwischen dem O⁵-Allel und der auffälligen Serologie besteht. Allerdings kann aufgrund der zu geringen Probenmenge keine signifikante Aussage getroffen werden. Die Untersuchung der bekannten O⁵-Spender deutet auf eine eher zufällige Verteilung in der Steiermark hin. Eine regionale Häufung konnte nicht beobachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte O⁵-SNP Screening PCR kann nun zur ABO-Genotypisierung serologisch auffälliger Proben an der Grazer Blutbank angewendet werden.

Abstract

Background: The ABO blood group is regulated by genes on chromosome 9 and the enzymes that they encode. These are glycosyltransferases which bind galactose (blood group B) or N-acetylgalactosamin (blood group A) on the precursor substance H. The exchange of a single nucleotide in the ABO gene can lead to the inactivation of the encoded enzyme. Most O alleles carry the deletion c.261delG in exon 6 resulting in a frameshift and a stop codon after amino acid 117. Apart from that the O¹ allele has the same nucleic acid sequence as the consensus A¹ allele. Nondeletional O alleles are a challenge for the molecular genetic identification of blood groups. Commonly used genotyping methods screen for known gene variants but cannot detect new mutations on other nucleotide positions of the ABO gene sequence. The O⁵ allele carries the nucleotide substitution c.322C>T (p.Gln108Ter) in exon 6, which leads to a stop codon that halts translation after amino acid 107. In this truncated protein the enzymatic site for transferase activity is missing. Carriers of the O⁵ allele with the genotype OO or BO should therefore produce anti-A antibodies, which is not the case. The aim of the study was to determine, if there is a connection between the absences of anti-A antibodies and the O⁵ allele, as well as to determine the frequency of the allele in the Styrian population.

Material and methods: 220 randomly chosen blood samples of the Styrian blood donor pool were serologically tested for their ABO blood group. The DNA was extracted and analyzed via SNP (single nucleotide polymorphism) Screening PCR for the O⁵ mutation. We amplified the ABO gene of the positive control of the former Screening via Longrange PCR and performed Sanger sequencing. Furthermore we searched the database with the ePROGESA software for familial or geographic connections between the thus far detected O⁵ carriers.

Results: Out of the 220 analyzed samples, 94 were blood group A, 33 were B, 9 were AB and 81 were blood group O, which is according to the blood group distribution in the European population. Three samples were not clearly assigned to a blood group serologically. There was no O⁵ allele found. The sequencing of the positive control led to the genotype O²⁻¹/O⁵ [O03/O52]. The distribution of the other O⁵ individuals in Styria did not produce any conclusions on familial or geographical connections.

Conclusion: The results show, that the O⁵ allele is very rare in the Styrian population, with a frequency below 0,22 %. The fact that we didn't find O⁵ positive samples supports the hypothesis, that the O⁵ allele is indeed responsible for the absence of anti-A antibodies. Nevertheless, since the frequency of the allele is not known, it is impossible to state a

significant conclusion. The investigations on the other O⁵ individuals indicate a rather random distribution in Styria as there was no regional accumulation found.

The established O⁵ SNP Screening PCR may now be used for ABO genotyping of serologically conspicuous samples.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
1.1 Blut	1
1.1.1 Erythrozyten	1
1.1.2 Die Erythrozytenmembran und ihre Bestandteile	2
1.2 Glykokonjugate	3
1.2.1 Glykolipide	3
1.2.2 Glykoproteine	4
1.2.3 Biosynthese von Glykokonjugaten	5
1.2.4 Regulation der Kettenstruktur	6
1.3 Das ABO-System	6
1.3.1 Antikörper gegen Blutgruppenantigene	7
1.3.2 ABO-Nomenklatur	8
1.3.3 Genetische Basis der ABH-Blutgruppen	10
1.3.4 Molekulare Struktur der A-, B-, H-Antigene	22
1.4 Methoden der Blutgruppenbestimmung	26
1.4.1 Serologische Blutgruppenbestimmung	26
1.4.2 Molekulargenetische Methoden	31
1.5 Ziel der Studie	35
2 Methoden	36
2.1 Serologische Blutgruppenbestimmung	36
2.1.1 Humane (Polyklonale) Blutgruppenbestimmung	36
2.1.2 Monoklonale Blutgruppenbestimmung	37
2.1.3 Serumgegenprobe	39
2.2 DNA-Isolierung	39
2.2.1 Durchführung	41
2.2.2 Spektrophotometrie	41
2.3 SNP Screening auf die O ⁵ -Mutation [O52]	42
2.3.1 Primer und Kontrollen	42
2.3.2 Zusammensetzung der Mastermixe	43
2.3.3 Thermocycler Protokoll Veriti™	44
2.3.4 Gelelektrophorese	45
2.4 Charakterisierung der Positivkontrolle	46
2.4.1 Genomische Longrange PCR	46
2.4.2 Sequenzierung nach Sanger	49
2.5 Suche nach einem Zusammenhang zwischen O ⁵ -positiven Spendern	52
3 Ergebnisse	53
3.1 Serologische Blutgruppenbestimmung	53
3.2 DNA-Konzentration und -Qualität	53
3.3 SNP-Screening	53
3.4 Sequenzierung der Positivkontrolle	58
3.5 Analyse der ePROGESA Daten	60
4 Diskussion	61

5 Literaturverzeichnis 64

Glossar und Abkürzungen

A – Adenin

AHG – Antihumanglobulin

Ala – Alanin

Arg – Arginin

ASP – Allele Specific Polymorphism

bp – Basenpaare

BG – Blutgruppe

bzw. – beziehungsweise

C – Cytosin

c. – Nukleotidaustausch in der mRNA (coding sequence)

ca. – cirka

DAT – Direkter Antiglobulintest

dATP – Desoxyadenosintriphosphat

dCTP – Desoxycytidintriphosphat

ddNTP – Didesoxyribonukleosidtriphosphat

dGTP – Desoxyguanosintriphosphat

DNA – Desoxyribonukleinsäure

dNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat

dTTP – Desoxythymidintriphosphat

EDTA – Ethylendiamintetraacetat

etc. – et cetera

Fuc – L-Fucose

Fy^a/Fy^b – Duffy a/b

G – Guanin

Gal – D-Galactose

Glc – D-Glucose

GlcNAc – N-Acetyl-D-Glucosamin

Gly – Glycin

GTA – Glykosyltransferase A

GTB – Glykosyltransferase B

IAT – Indirekter Antiglobulintest

i.d.R. – in der Regel

kb – Kilobasen (1000 Basenpaare)

Leu – Leucin
Man – D-Mannose
Met – Methionin
min – Minuten
nc – noncoding
NeuAc – N-Acetyl-D-Neuraminsäure
nt. – Nukleotid
p. – Aminosäureaustausch im Protein
PCR – Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pro – Prolin
RhD – Rhesus D
ROI – Region of Interest
sek – Sekunden
Ser – Serin
SNP – Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single nucleotide polymorphism)
T – Thymin
u.a. – unter anderem
UDP – Uridindiphosphat
v.a. – vor allem
z.B. – zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SERUMELEKTROPHEROGRAMM EINES GESUNDEN PROBANDEN.	1
ABBILDUNG 2: STRUKTUREN DER MONOSACCHARIDE IN GLYKOKONJUGATEN	3
ABBILDUNG 3: CHEMISCHE STRUKTUR VON CERAMID UND SPHINGOSIN	4
ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUR VON GLYKOSPHINGOLIPIDEN.....	4
ABBILDUNG 5: KERNSTRUKTUR DER N-GLYKOSIDISCH GEBUNDENEN OLIGOSACCHARIDKETTEN AUF GLYKOPROTEINEN.	5
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ABO-GENS.	11
ABBILDUNG 7: EINE EINZIGE DELETION IN DER CODIERENDEN SEQUENZ VON A ¹ KANN ZU EINEM O ¹ ODER A ² FÜHREN.	12
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER GLYKOSYLTRANSFERASE	13
ABBILDUNG 9: DREIDIMENSIONALES MODELL EINER GLYKOSYLTRANSFERASE.	14
ABBILDUNG 10: MODELL DER O ₂ -TRANSFERASE.....	17
ABBILDUNG 11: SEROLOGIE UND SSP-PCR EINER WEITEREN O ⁵ -SPENDE.	20
ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VERSCHIEDENER ALLELE MIT VERÄNDERTER LÄNGE DES LESERAHMENS	21
ABBILDUNG 13: SCHEMATISCHER AUFBAU DER MONOSACCHARIDSTRUKTUR DER ABO- ANTIGENE	23
ABBILDUNG 14: NEOLACTOTETRAOSYLCERAMID UND DIE TYP 2 ABH-SUBSTANZEN.....	24
ABBILDUNG 15: TYP 3 UND TYP 4 GLYKOLIPIDE	25
ABBILDUNG 16: MODELL EINES POLYGLYCOSYLCERAMIDS.....	25
ABBILDUNG 17: IMMUNGLOBULINE IGG UND IGM	29
ABBILDUNG 18: ANTIHUMANGLOBULIN BINDET AN IGG UND FÜHRT ZU EINER SICHTBAREN AGGLUTINATION	30
ABBILDUNG 19: GELKARTE MIT POS. UND NEG. AGGLUTINATIONSREAKTION.....	31
ABBILDUNG 20: ALGORITHMUS FÜR DIE BESTIMMUNG UNGEWÖHNLICHER BLUTGRUPPEN.	32
ABBILDUNG 21: SEQUENZIERUNGS-ZYKLUS NACH DER SANGER-METHODE	34
ABBILDUNG 22: ELEKTROPHEROGRAMM EINER KAPILLARELEKTROPHORESE UND UMWANDLUNG DER FLUORESZENZSIGNALE IN DIGITALE DATEN.	34
ABBILDUNG 23: ABLAUF DER DNA-ISOLIERUNG	40
ABBILDUNG 24: QIAGEN-KASSETTE.....	41
ABBILDUNG 25: REPRÄSENTATIVES BILD EINER GELELEKTROPHORESE.....	46
ABBILDUNG 26: AUSSCHNITT AUS DEM ELEKTROPHEROGRAMM DER POSITIVKONTROLLE.....	60

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: AUSZUG AUS DER LISTE DER BLUTGRUPPENSYSTEME DER ISBT: ABO UND H.....	8
TABELLE 2: AUFLISTUNG EINER AUSWAHL AN VERSCHIEDENEN ABO-ALLELEN	9
TABELLE 3: HÄUFIGKEIT DER ABO-PHÄNOTYPEN IN DEUTSCHLAND	11
TABELLE 4: AGGLUTINATIONSMUSTER DER POLYKLONALEN BLUTGRUPPENBESTIMMUNG	37
TABELLE 5: AGGLUTINATIONSMUSTER DER MONOKLONALEN BLUTGRUPPENBESTIMMUNG	38
TABELLE 6: AGGLUTINATIONSMUSTER DER SERUMGEGENPROBE	39
TABELLE 7: PRIMERSEQUENZEN FÜR DAS SNP-SCREENING.....	42
TABELLE 8: PRIMERSEQUENZEN FÜR DIE INTERNE KONTROLLE	43
TABELLE 9: PROTOKOLL FÜR DIE ZUSAMMENSETZUNG DER MASTERMIXE DES SNP SCREENINGS	44
TABELLE 10: PROTOKOLL FÜR DAS SNP SCREENING IM THERMOCYCLER.....	44
TABELLE 11: PRIMERSEQUENZEN FÜR DIE LONGRANGE-PCR DES ABO-GENS	47
TABELLE 12: PROTOKOLL FÜR DIE ANRICHTUNG DES MASTERMIXES DER LONGRANGE PCR ..	48
TABELLE 13: THERMOCYCLERPROFIL FÜR DIE AMPLIFIKATION DES ABO-GENS.....	48
TABELLE 14: LISTE DER 28 SEQUENZIER-PRIMER FÜR DIE SEQUENZANALYSE DAS ABO-GENS	50
TABELLE 15: PROTOKOLL FÜR DEN MASTERMIX DER SEQUENZIERUNG DER POSITIVKONTROLLE	51
TABELLE 16: THERMOCYCLERPROFIL FÜR DIE SEQUENZIERANSÄTZE.....	51
TABELLE 17: BLUTGRUPPENVERTEILUNG DER 220 PROBEN	53
TABELLE 18: AUFLISTUNG DER EINZELNEN PROBEN UND IHRER MESSWERTE	54
TABELLE 19: AUFLISTUNG DER DETEKTIERTEN SNP'S IN DER POSITIVKONTROLLE MIT DEM O ⁵ - SPEZIFISCHEN SNP IN EXON 6	59

1 Einleitung

1.1 Blut

Blut macht in etwa 7 – 8 % des menschlichen Körpergewichts aus bzw. beträgt bei einem gesunden Erwachsenen ca. 4 – 6 l. Man unterscheidet einen zellulären und einen plasmatischen Anteil.

Der zelluläre Anteil bildet sich aus Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. In Bezug auf das ABO-Blutgruppensystem, sind vor allem Erstere von Relevanz.

Als Blutplasma wird der zellfreie Anteil des Blutes bezeichnet. Dieser setzt sich aus Wasser, Elektrolyten, Proteinen und anderen niedermolekularen organischen Substanzen zusammen. Unter den Plasmaproteinen findet man u.a. die Fraktion der γ -Globuline, welche auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Diese Immunglobuline sind es, die in Form von Antikörpern, körperfremde bzw. vermeintlich körperfremde Strukturen erkennen und für das Abwehrsystem sichtbar machen (1).

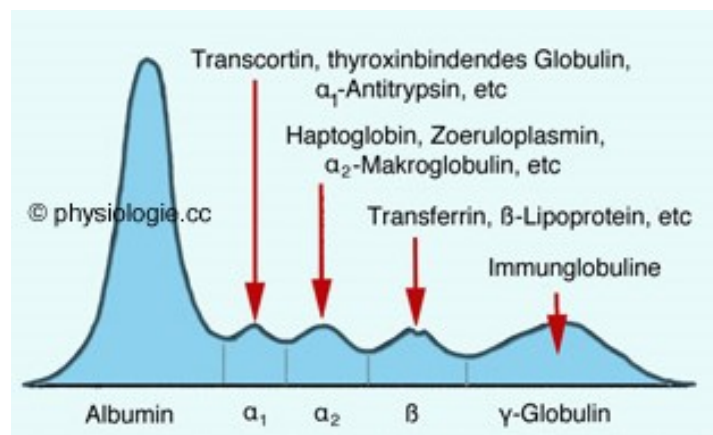


Abbildung 1: Serumelektropherogramm eines gesunden Probanden; elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine und Unterteilung in Albumin und die Globuline α_1 , α_2 , β und γ (2).

1.1.1 Erythrozyten

Als Sauerstofftransporter haben Erythrozyten eine lebenswichtige Funktion. Bei einem ausgeprägten Mangel kann es deshalb erforderlich werden, diese durch Fremderthrozytenkonzentrate zu ersetzen. Dabei muss besonders auf die Immunogenität von Erythrozyten geachtet werden. Deren Membran ist von verschiedenen Proteinen durchdrungen, die die Kommunikation und Interaktion mit dem Zellumfeld ermöglichen.

Jeder Membranbestandteil besitzt eine spezifische Protein- oder Glykoproteinstruktur, die durch genetisch bedingte Polymorphismen von Individuum zu Individuum variieren kann. Diese Polymorphismen können sich in Form eines Tausches einer einzigen Aminosäure (z.B. Fy^a und Fy^b) oder eines Zuckermoleküls (z.B. ABO) darstellen oder so ausgeprägt sein, dass ein ganzes Makromolekül fehlt (z.B. Rhesus D negativ).

Somit existieren auf den Erythrozyten eine Vielzahl immunogener Strukturen, sogenannter Antigene, die man verschiedenen Blutgruppensystemen wie ABO, Rhesus, Kell etc. zuordnet (3).

1.1.2 Die Erythrozytenmembran und ihre Bestandteile

Die Zellmembran stellt nicht nur eine Grenze zwischen Plasma und extrazellulärem Raum dar, sondern spielt eine essentielle Rolle in der Regulation von Zellfunktionen. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht und reguliert durch aktiven und passiven Transport die Durchlässigkeit für Elektrolyte und andere Moleküle. Zusätzlich fungiert sie als Schaltpult, das Information aus dem Extrazellulärraum in intrazellulär aktive Nachrichten umwandelt. Um diese Funktionen aufrecht zu erhalten, sind zahlreiche Enzyme, Transportproteine und Rezeptoren in die Membran eingebaut. Deren Proteinstrukturen und Glykokonjugate auf der Zellmembran wirken als Antigene, die Bindungsstellen für verschiedene Antikörper und Lektine darstellen, so auch für die ABO-Blutgruppe (4).

Die meisten Membranproteine liegen in glykosylierter Form vor, indem durch ein Enzym Kohlenhydrate an die Amino- (N-Glykosylierung) oder an die Hydroxygruppe (O-Glykosylierung) von Proteinen gebunden wird. Bei der N-Glykosylierung werden Oligosaccharide an die Aminosäure Asparagin gebunden, während bei der O-Glykosylierung kleinere Glykane, v.a. Tetrasaccharide, an Serin oder Threonin geheftet werden (5).

Der Anionen Austauscher 1 ist ein intrinsisches Protein, das für den Anionenaustausch von Chlorid und Bikarbonat verantwortlich ist. Er trägt über N-glykosidische Bindung ein Oligosaccharid (N-Glykan), welches das ABH-Antigen trägt. Der Glucosetransporter GLUT1, der für den Transport von Monosacchariden und Nukleosiden durch die Membran zuständig ist, trägt ebenso ABH-Determinanten (4, 6).

1.2 Glykokonjugate

Die Erythrozytenoberfläche ist durch Glykokonjugate stark glykosyliert. Die antigene Wirkung der Erythrozyten basiert hauptsächlich auf solchen spezifischen Kohlenhydratketten und Proteinstrukturen. Glykokonjugate sind komplexe Moleküle, die entweder aus Kohlenhydrat und Lipiden (Glykolipide) oder aus Kohlenhydrat und Proteinen (Glykoproteine) bestehen.

Der Kohlenhydratanteil der blutgruppenspezifischen Glykokonjugate besteht aus:

D-Galactose (Gal), D-Glucose (Glc), D-Mannose (Man), N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), L-Fucose (Fuc) und N-Acetyl-D-Neuraminsäure (NeuAc) (4).

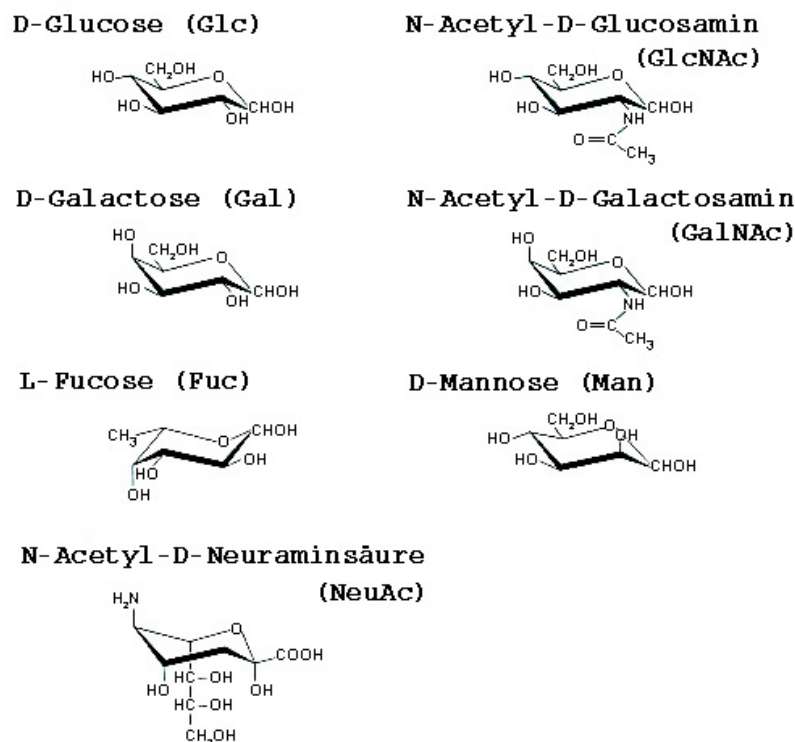


Abbildung 2: Strukturen der Monosaccharide, die in Glykokonjugaten vorkommen (abgeändert von 4)

1.2.1 Glykolipide

Im Hinblick auf Blutgruppenantigene sind v.a. jene Glykosphingolipide von Interesse, deren Oligosaccharidkette aus einem Ceramid-Rest entsteht. Ceramide sind N-acyl-Derivate von Sphingosin, ein Amino-Alkohol mit einer langen ungesättigten Kohlenstoffkette. Die Oligosaccharideinheit ist kovalent an die Hydroxygruppe von C1 des Sphingosinrests gebunden.

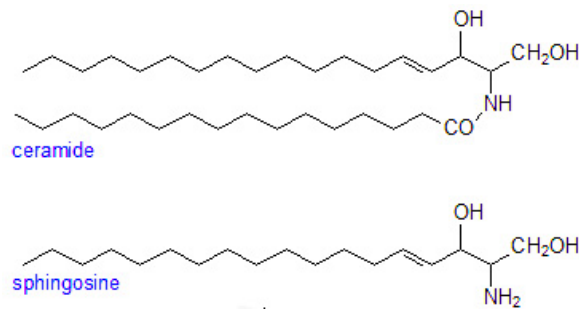
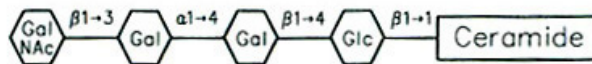


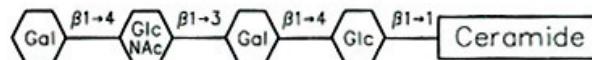
Abbildung 3: Chemische Struktur von Ceramid und Sphingosin (abgeändert von 7)

Der Kohlenhydrat-Teil der Glykosphingolipide ist sehr unterschiedlich. Es werden 7 Oligosaccharideinheiten aufgrund ihrer ersten 3 bzw. 4 Monosaccharidreste unterschieden: globo, isoglobo, muco, lacto, neolacto, ganglio und gala-Ketten. Diese Grundketten können durch weitere N-Acetyllaktosamin-Einheiten (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc) zu komplexen, verzweigten Oligosaccharidketten erweitert werden. Die Erythrozytenmembran enthält Glykosphingolipide der globo-, ganglio- und neolacto-Serie, die meist kurze Oligosaccharidketten aus 5 – 10 Monosacchariden tragen. Sie bilden die Vorläufersubstanz für ABH-Antigene auf Glykosphingolipiden (4).

Globo series



Neolacto series



Ganglio series

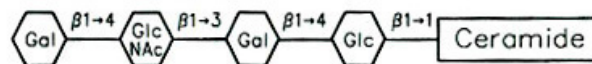


Abbildung 4: Chemische Struktur von Glykosphingolipiden der Erythrozytenmembran (abgeändert von 4).

1.2.2 Glykoproteine

Glykoproteine sind Polypeptide mit kovalent gebundenen Oligosaccharidketten. Diese können über N-glykosidische oder O-glykosidische Bindung an das Protein gebunden sein. N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidgruppen findet man v.a. auf Glykoproteinen von Zellmembranen und Serum. Sie sind über β -N-Acetylglucosamin an die Aminogruppe

eines Asparaginrests gebunden. Die charakteristische Aminosäure-Sequenz an der Bindungsstelle der Oligosaccharidketten ist Asparagin-X-Threonin/Serin. X kann jede Aminosäure außer Prolin und Asparaginsäure darstellen. Alle an Asparagin gebundenen Kohlenhydratketten zeigen die Kernstruktur $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. An die Kernstruktur können weitere Mannose- und N-Acetylglucosamin-Ketten gebunden sein.

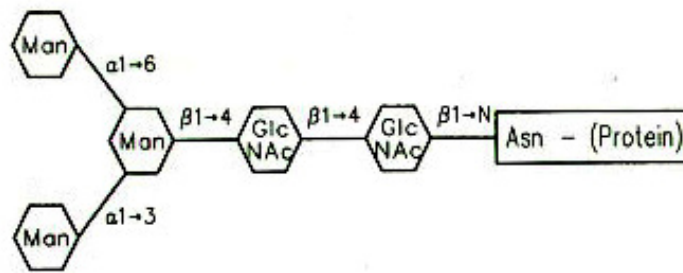


Abbildung 5: Kernstruktur der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten auf Glykoproteinen. An die Mannose der Kernstruktur sind weitere Mannose- oder N-Acetylglucosamin-Ketten gebunden (abgeändert aus 4).

O-glykosidisch gebundene Oligosaccharidketten kommen häufig in Sekreten der exokrinen Drüsen, schleimproduzierenden Zellen und pathologischen Zysten vor und sind eher selten in Membranglykoproteinen. Die Kohlenhydratkette ist über N-Acetylneuraminsäure an die Hydroxygruppe von Serin- oder Threonin eines Proteins gebunden. Die Größe des Oligosaccharids reicht von einem einzelnen N-Acetylglucosaminylrest zu hochkomplexen Ketten aus Galactose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure. Im Gegensatz zu den N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden tragen die O-glykosidisch gebundenen Ketten keine Mannose (4).

1.2.3 Biosynthese von Glykokonjugaten

Glykosyltransferasen sind Enzyme, die Monosaccharidreste an Proteine, Lipide oder Kohlenhydratketten anhängen und sind auch für die Produktion der ABO-Antigene zuständig. Als Donor dienen die Zuckernukleotide UDP-Galactose, UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-N-Acetylglucosamin, GDP-Mannose, GDP-Fucose und CMP-N-Acetylneuraminsäure. Die Funktion der Glykosyltransferasen ist von der Anwesenheit von zweifach positiv geladenen Metallionen abhängig, wie z.B. Mg^{2+} oder Mn^{2+} . Das Glykosylierungsmuster ist abhängig von der Art der Glykosyltransferasen. Sie werden durch transkriptionelle und translationelle Mechanismen reguliert, sowie durch deren

Organisation innerhalb der Membran des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats, wo die Biosynthese der Oligosaccharide stattfindet. Deshalb können die gleichen Glykosyltransferasen unterschiedliche Oligosaccharidketten, in Hinsicht auf ihre Länge und ihre Anzahl, sowie Positionierung der Verzweigungen, produzieren (4).

1.2.4 Regulation der Kettenstruktur

Drei Faktoren bestimmen die Sequenz und Konfiguration einer Kohlenhydratkette:

1. Substratspezifität der Enzyme: Glykosyltransferasen sind sehr spezifisch für das zu transferierende Monosaccharid, seine anomere Konfiguration und seine Position am Glycosylakzeptor. Zum Beispiel ist die α 1,2-Fucosyltransferase, die durch das H-Gen codiert wird, sehr sensibel für die Konformation des Akzeptors. Die Aktivität ist bei Typ II Ketten deutlich höher als bei Typ I Ketten (s. Kap. 1.3.4). Des Weiteren können A- und B-Glykosyltransferasen nur an einen Akzeptor mit H-Determinante binden (s. Kap. 1.3.3).
2. Konkurrenz zwischen den Transferasen: Oftmals konkurrieren mehrere Enzyme um das gleiche Akzeptorsubstrat. In diesem Fall bestimmt die Enzymaktivität das Glykosylierungsmuster einer Zelle.
3. Zelluläre Expression spezifischer Glykosyltransferasen: Während der Embryonalentwicklung oder auch in der Onkogenese sind spezifische Glykosyltransferasen aktiv, die sonst nicht im Menschen vorkommen. Ebenso variiert die Expression bestimmter Glykosyltransferasen mit der Zellart (4).

1.3 Das ABO-System

Im Jahr 1900 erkannte Karl Landsteiner, dass „Blutserum von normalen Menschen rothe Blutkörperchen anderer gesunder Individuen zu verklumpen im Stande ist“. Diesen Vorgang bezeichnet er als Isoagglutination und nahm an, dass es sich um drei verschiedene Agglutinine handelt, die er als A, B und C (heute Blutgruppe O) bezeichnete (8). Zwei Jahre später entdeckten seine Kollegen Sturli und von Decastello eine vierte Blutgruppe, heute als AB bekannt. Diese Entdeckung ist der Ursprung des Begriffs „Blutgruppe“ und brachte Landsteiner 1930 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin ein (9). Seitdem wurden 35 weitere Blutgruppensysteme entdeckt mit über 300 Antigenen (10). Jedes Blutgruppensystem repräsentiert entweder ein einzelnes Gen oder eine Gruppe von zwei oder drei, auf dem Chromosom, eng beieinander liegender Gene (5).

Das ABO-System ist die bedeutendste Blutgruppe und klinisch das wichtigste Antigenesystem für Transfusionen und Organtransplantation. Es wird durch die Antigene A und B geprägt, entweder in Kombination (Phänotyp AB), einzeln (Phänotyp A oder B) oder durch ihre Abwesenheit (Phänotyp O).

Fehlen alle Antigene eines Blutgruppensystems, so spricht man von einem Null-Phänotyp. Dies kann in gewissen Blutgruppensystemen z.B. zu Resistenzen gegen Malariaerreger oder zu Erkrankungen, wie hämolytische Anämie, führen (3). Unter Trägern der Blutgruppe O häufen sich z.B. Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts wie *Ulcus ventriculi*, Gastritis, *Colitis ulcerosa* und *Duodenitis* (11).

Das ABO-Gen besteht aus multiplen Allelen. Derzeit sind insgesamt 381 bekannt (Stand Februar 2017) (12). Sie codieren für Glykosyltransferasen, die entweder N-Acetylgalactosamin (Antigen A) oder D-Galactose (Antigen B) an die Vorläufersubstanz H binden bzw. im Falle der BG O nicht funktionell sind.

1.3.1 Antikörper gegen Blutgruppenantigene

Blutgruppen sind Antigene und definitionsgemäß kann ein Molekül nur ein Antigen sein, wenn es von Antikörpern (oder T-Zell Rezeptoren) erkannt wird. Die meisten Blutgruppen-Antikörper sind in einem Individuum nicht natürlich vorhanden, sondern werden erst nach Immunisierung durch allogene Transfusion von Erythrozyten oder in der Schwangerschaft, durch fetomaternalen Transfusion, gebildet (5).

Diese sogenannten Alloantikörper sind folglich Antikörper gegen ein körperfremdes Blutgruppenantigen, die durch Primärexposition gebildet werden. Es handelt sich hauptsächlich um Antikörper der IgG-Klasse. Im Bezug auf die Auslösung schwerwiegender Reaktionen, sind v.a. die gegen Rhesus-, Kell-, Kidd- und Duffy-Antigene gerichteten Antikörper erwähnenswert (3).

Im Unterschied dazu findet die Bildung der Antikörper Anti-A und Anti-B im ersten Lebensjahr statt. In der Natur liegen Kohlenhydratstrukturen vor, die den Antigenen A und B ähneln, z.B. auf humansymbiotischen Bakterien (13). Trägt also ein Neugeborenes diese Antigene nicht, wird sein Immunsystem obligat die jeweiligen Antikörper im Plasma ausbilden. Dies beginnt ca. ab dem 3. Lebensmonat und erreicht zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr den Titer von erwachsenen Menschen (5).

Diese natürlichen Alloantikörper bezeichnet man als Isoagglutinine. Sie sind überwiegend vom IgM-Typ, aber auch IgG und IgA, und lösen bei inkompatibler Transfusion eine sofortige intravasale Hämolyse der fehltransfundierten Erythrozyten aus. Dabei werden

zahlreiche Zytokine (z.B. IL-1, TNF, IL-6, IL-8) freigesetzt, die wesentlich den klinischen Verlauf prägen. Dieser kann bei akuten Hämolysen mit Nierenversagen, Schock, Verbrauchskoagulopathie und in 10% mit dem Tod einhergehen (3). Fehlende Antikörper können auf eine schwache Untergruppe von A oder B, auf Blutchimären, Hypogammaglobulinämie oder sogar auf hohes Alter zurückzuführen sein.

IgG-Antikörper durchdringen aufgrund ihres geringen Durchmessers die Plazentaschranke und können eine Hämolyse im fetalen Blutkreislauf auslösen. Dies trifft vor allem auf das Antigen K des Kell-Systems und auf die Rhesusblutgruppe zu, weshalb heutzutage eine Anti-D-Prophylaxe bei Rhesus-negativen Müttern in der Schwangerschaft durchgeführt wird. In ausgesprochen seltenen Fällen können auch die IgG-Antikörper des ABO-Systems einen Morbus haemolyticus neonatorum verursachen, vornehmlich bei Müttern der BG O. Fetale Erythrozyten haben eine geringere Dichte an A- und B-Antigenen und lösliche A/B-Antigene im Fetus können die maternalen Antikörper neutralisieren. Des Weiteren ist vermutlich das Komplementsystem im Fetus nicht ausreichend ausgebildet, was eine Erklärung für die Seltenheit solcher fetomaternalen ABO-Inkompatibilitätsreaktionen sein könnte (5).

1.3.2 ABO-Nomenklatur

Das ABO-System wurde als erstes der derzeit 36 Blutgruppensysteme entdeckt, weshalb es die Nummerierung 001 von der International Society of Blood Transfusion (ISBT) erhielt. Das Blutgruppensystem H trägt die Nummer 018.

Tabelle 1: Auszug aus der Liste der Blutgruppensysteme der ISBT: ABO und H (10)

Nummer	Name	Zahl der Antigene	Gen	Chromosom
001	ABO	4 (A, B, AB, A1)	ABO	9
018	H	1 (H)	FUT1	19

Eine aktuelle Liste der bereits bekannten Allele und ihrer Sequenzen ist in der „Blood Group Antigen Gene Mutation (BGMUT) Database“ zu finden (12) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systems_alleles&system=abo). Sie ist Bestandteil der dbRBC (database Red Blood Cells) des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Deren Terminologie ist zwar inoffiziell, wird aber häufig genutzt. Eine Auswahl der in dieser Arbeit beschriebenen Allele befindet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Auflistung einer Auswahl an verschiedenen ABO-Allelen. Es sind nur SNPs angeführt, die zu einem Aminosäureaustausch führen.

Phänotyp	ISBT	dbRBC	traditionelle Bezeichnung	Exon	Nukleotid	Aminosäure-Austausch
A ₁	ABO*A1.01	A101	A ¹	-	-	-
A ₂	ABO*A2.01	A201	A ²	7 7	c.467C>T c.1061delC	p.Pro156Leu p.354fs [^]
B	ABO*B.01	B101	B	7 7 7 7	c.526C>G c.703G>A c.796C>A c.803G>C	p.Arg176Gly p.Gly235Ser p.Leu266Met p.Gly268Ala
O	ABO*O.01.01	O01	O ¹	6	c.261delG	p.88fs118Stop
O	ABO*O.01.02	O02	O ^{1v}	3 4 5 6	c.106G>T c.188G>A c.220C>T c.261delG	p.Val36Phe p.Arg63His p.Pro74Ser p.88fs118Stop
O?	ABO*O.02.01	O03	O ²⁻¹	2 5 7 7	c.53G>T c.220C>T c.526C>G c.802G>A	p.Arg18Leu p.Pro74Ser p.Arg176Gly p.Gly268Arg
A _{weak}	ABO*AW.08	Aw08	O ²⁻⁴	5 7 7 7	c.220C>T c.488C>T c.526C>G c.802G>A	p.Pro74Ser p.Thr163Met p.Arg176Gly p.Gly268Arg
O?	ABO*O.05	O52	O ⁵	6	c.322C>T	p.Gln108Stop

In dieser Arbeit werden die Allele in der traditionellen Schreibweise benannt, aber mit der Terminologie der dbRBC in eckigen Klammern, z.B. A¹ [A101] oder O^{1v} [O02]. Die Verwendung von tief- und hochgestellten Indexen muss beachtet werden. So bedeutet A1 das Antigen, A₁ den Phänotyp und A¹ das Allel (14).

Das A¹-Allel dient als ABO-Referenzsequenz. Jegliche Veränderung in der Nukleinsäuresequenz bzw. Allelvarianten werden im Vergleich zum A¹-Allel dargestellt.

1.3.3 Genetische Basis der ABH-Blutgruppen

Das ABO-Gen liegt auf Chromosom 9q34.1 – 9q34.2 (15) und umspannt ca. 18 kb. Es besteht aus 7 Exons, von denen Exon 6 und 7 für die katalytische Domäne des Enzyms codieren. Sie umfassen 77 % der 1062 bp der codierenden Region. Ebenso wie das H-Gen, codiert das ABO-Gen nicht das eigentliche Antigen, sondern die Transferase, welche für die Bildung der Oligosaccharidstruktur zuständig ist (16, 17). Das H-Gen auf Chromosom 19q13.3 codiert für eine α 1,2-Fucosyltransferase, welche eine α -Fucose an das C2 einer terminalen β -Galactose bindet. Dieses H-Antigen bildet die Grundsubstanz für das A- und B-Antigen (s. Abbildung 13).

Das Produkt des A-Allels ist eine α 1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase, ein Polypeptid aus 354 Aminosäuren. Das Produkt des B-Allels ist eine α 1,3-Galactosyltransferase.

Durch Mutationen innerhalb des ABO-Gens gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher ABO-Allele, welche nicht direkt das Antigen, sondern die Aktivität und Expressionsmuster der Glykosyltransferasen verändern. Diese bestimmen in Folge die Art und die Quantität der jeweiligen Antigene (A, B oder H).

Zahlreiche Studien ergaben, dass eine große Vielfalt und ein hoher Grad an rekombinanter Aktivität im ABO-Gen herrschen. Die Mutationen in den Exons 6 und 7 haben die größte Auswirkung auf die Funktion der Transferasen, aber auch in den Exons 2 bis 5 wurden relevante Mutationen entdeckt, weshalb Typisierungsverfahren die gesamte codierende Region beinhalten sollten.

Durch die Analyse der Introns 2 bis 6 wurden gewisse hoch konservierte Sequenzmotive in den häufigsten ABO-Allelen erkannt, aus denen sich 5 phylogenetische Hauptlinien ableiten: A¹ [A101], B [B101], O¹ [O01], O^{1v} [O02] und O²⁻¹ [O03]. O²-ähnliche Allele zeigen eine Mosaik-Struktur, die größere Exon- und/oder Intron-Sequenzmotive der anderen 4 Allelgruppen enthält. Dies lässt vermuten, dass O²⁻¹ die jüngste der 5 Allelgruppen darstellt und sie durch Rekombination aus den anderen 4 Hauptlinien entstanden ist (18).

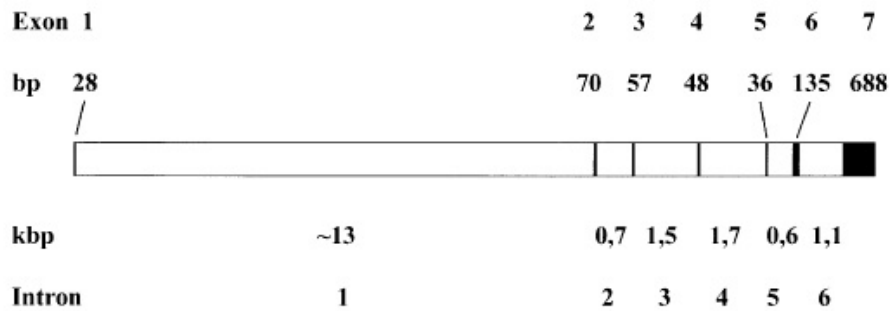


Abbildung 6: Schematische Darstellung des ABO-Gens. Die Exons (schwarz) und Introns (weiß) sind in ihrem Größenverhältnis dargestellt. Die Nukleotidanzahl der Exons und Introns ist angeführt (19).

1.3.3.1 Vererbung und Häufigkeit von ABO

Die Vererbung der ABO-Merkmale geschieht nach dem Mendel'schen Prinzip. Die Allele des ABO-Systems liegen auf dem langen Arm des Chromosoms 9 an der Position q34.1 – q34.2 (4, 15). Jeder Mensch bekommt im Normalfall zwei dieser Chromosomen weitergegeben, eines vom Vater, eines von der Mutter. Die Allele A und B werden kodominant vererbt, während O rezessiv ist.

Tabelle 3: Häufigkeit der ABO-Phänotypen in Deutschland (3)

Phänotyp (Erscheinungsbild)	Mögliche Genotypen	Häufigkeit in Deutschland
O	OO	41%
A	AA, AO	43%
B	BB, BO	11%
AB	AB	5%

Durch genetische Rekombination während der Meiose kann es am ABO-Lokus zu der Bildung intragenetischer Hybridallele kommen, also eines Allels, das Sequenzanteile zweier homologer Allele enthält. Dies basiert vermutlich auf der Existenz von zwei chi- (ähnlichen) Sequenzen am 3'-Ende des Intron 6. Chi-Sequenzen (5'-GCTGGTGG-3') und chi-ähnliche Sequenzen (5'-GCTGGCGG-3') sind Hotspots für die Entstehung von Strangbrüchen in der dsDNA. Tatsächlich scheint die Crossing-Over-Region der meisten Hybridallele im oder um das Intron 6 zu liegen (19).

1.3.3.2 Molekulare Mechanismen der Blutgruppenvielfalt

Die Vielfalt im menschlichen Genom basiert auf unterschiedlichen Mechanismen, wie z.B. fehlerhaftes Spleißen. Mit Abstand die häufigste Ursache sind sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs), Punktmutationen, die durch Nukleotidsubstitution, -deletion oder -insertion entstehen. Seit dem Beginn der Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden über 2 Millionen SNPs identifiziert. Sie kommen sowohl in codierenden als auch nicht-codierenden Abschnitten der DNA vor. Innerhalb der Exons unterscheidet man zwischen Missense- und Nonsense-Mutationen. Ungefähr zwei Drittel aller Blutgruppenantigene basieren auf Missense-SNPs, durch die es zu einer Aminosäure-Substitution kommt (20). Im ABO-Gen finden sich gehäuft Missense-Mutationen zwischen den Nukleotiden c.539 – 548, c.641 – 721, c.829 – 873 und c.965 – 1061, alle im Exon 7, die zu einer Verminderung der Transferaseaktivität führen. Die Aminosäuren in diesen Abschnitten sind vermutlich für die Bindung der Substrat- oder Akzeptormoleküle zuständig oder verändern die dreidimensionale Konformation des Proteins (19).

Nonsense Mutationen führen zu einem sofortigen Stoppcodon. Zwei unterschiedliche Deletionen in der A¹-Sequenz können entweder zu einem O- oder A₂-Allel führen (s. Abbildung 7). SNPs können neben den strukturellen, auch quantitative Veränderungen verursachen, indem sie die Anzahl der exprimierten Kopien auf der Erythrozytenmembran reduzieren. Innerhalb der Introns sind die Spleiß-Stellen kritisch für den Zusammenschluss der Exons. SNPs können dort zu einem Überspringen von Exons und Fehlern bei der Transkription führen (20).

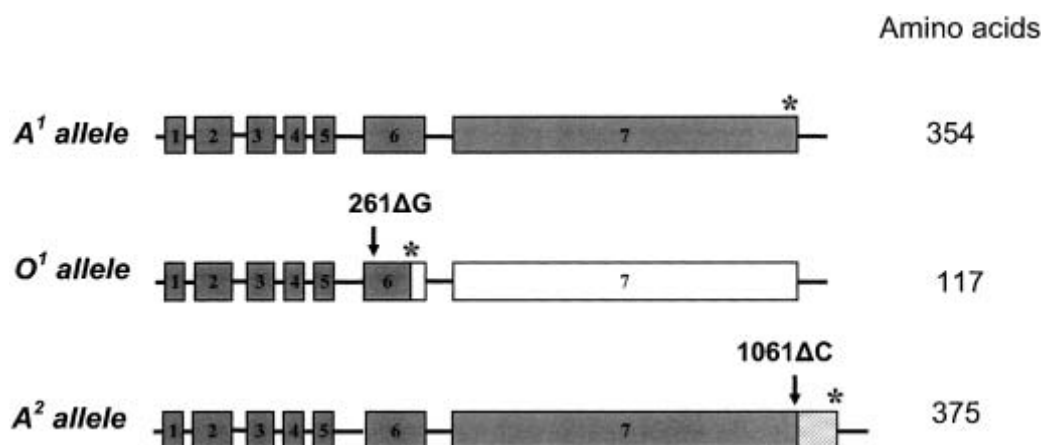


Abbildung 7: Eine einzige Deletion in der codierenden Sequenz von A¹ kann zu einem O¹ oder A₂ führen (20).

Die Vielzahl neuer ABO-Allele führte zur Entdeckung von Untergruppen und Varianten, die eine wesentlich verminderte bzw. gar keine nachweisbare ABH-Aktivität zeigen, aber trotzdem die jeweiligen Antikörper binden. Abgesehen von der Untergruppe A₂, die mit ca.

22 % aller BG A/AB-Individuen relativ häufig ist, treten einzelne ABH-Untergruppen eher sporadisch in Europa auf. Sie resultieren aus SNPs, Rekombination oder Genkonversion (4).

1.3.3.3 Glykosyltransferasen A und B

Die A- und B-Glykosyltransferasen kommen im Golgi-Apparat oder in löslicher Form im Plasma sowie in Körperflüssigkeiten vor. Sie bestehen aus einem kurzen N-terminalen Segment, einem hydrophoben transmembranären Abschnitt, einem kurzen Stamm-Segment und einer großen C-terminalen Domäne, in welcher die katalytisch aktive Region liegt. Letztere befindet sich im Lumen des Golgi-Apparats (s. Abbildung 8) (12, 17, 21).

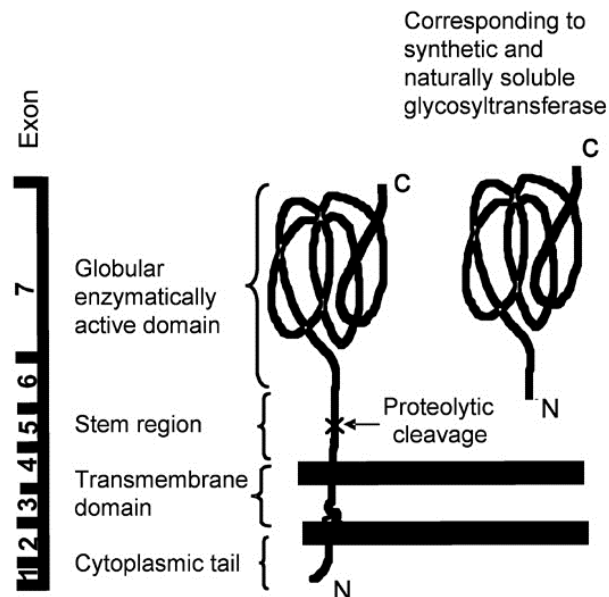


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Glykosyltransferase mit einem kurzen N-terminalen Segment, einem hydrophoben transmembranären Abschnitt, einem kurzen Stamm-Segment und einer großen C-terminalen Domäne (14).

Patenaude et al. zeigten durch die Darstellung der Kristallstruktur der Transferasen, dass der katalytische Abschnitt in zwei Domänen eingeteilt ist. Die N-terminale Domäne erkennt das Donorsubstrat (UDP-Gal oder UDP-GalNAc), während die C-terminale Domäne den Akzeptor bindet (22).

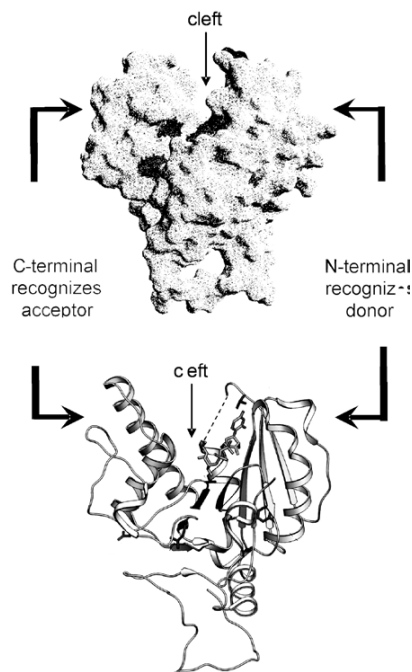


Abbildung 9: Dreidimensionales Modell einer Glykosyltransferase mit C-terminaler Domäne, die den Akzeptor bindet, und N-terminaler Domäne, welche das Donorsubstrat bindet (14).

Der Unterschied zwischen dem häufigsten B-Allel [B101] und dem häufigsten A-Allel A¹ [A101] liegt in 7 Nukleotidsubstitutionen, von denen vier zu einem Aminosäureaustausch führen: p.Arg176Gly, p.Gly235Ser, p.Leu266Met, p.Gly268Ala. Davon sind v.a. die Aminosäuren an Position 266 und 268 für die Substratspezifität und A- oder B-Transferaseaktivität relevant. Die A-Transferase (GTA) besitzt Leucin an Position 266 und Glycin an Position 268, während die B-Transferase (GTB) Methionin und Alanin an den jeweiligen Positionen trägt (23, 24).

Yamamoto et al. haben 1995 das Codon 268 des A- und B-Allels in vitro mutagenisiert und durch Substitutionen jede mögliche Aminosäurekombination an dieser Position konstruiert. Sie untersuchten die Aktivität und Spezifität der einzelnen Kombinationen. Der Aminosäureaustausch in der GTA zeigte bei Alanin, Serin und Cystein eine GTA- und GTB-Aktivität von unterschiedlicher Ausprägung und bei Asparagin und Threonin eine reine (schwache) GTB-Aktivität. Die BA-Konstruktion, also das Gerüst der GTB mit Glycin an Position 268, führt ebenfalls zur Expression beider Transferasen. Einige Konstrukte zeigten überhaupt keine Transferaseaktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäure an Position 268 sowohl für die Substratspezifität, als auch die Aktivität der Transferase verantwortlich ist. Auffällig ist, dass die GTA-Aktivität umgekehrt proportional zu der Größe der Seitenketten der Aminosäuren ist. Vermutlich weil größere Seitenketten zu sperrig sind und die Bindung von UDP-GalNAc im aktiven Teil der

Transferase verhindern (s. Abbildung 10). Ebenso finden sich bei GTB-Aktivität v.a. Aminosäuren mit kleinen Seitenketten. Auch an Position 266 haben die Ladungen der Seitenketten, sowie der Charakter der Aminosäure, Auswirkungen auf Aktivität und Substratspezifität der Transferasen (25).

Beide Transferasen sind hochspezifisch für das H-Antigen als Akzeptor. Die Enzyme reagieren ausschließlich mit Glykokonjugaten oder Oligosacchariden, welche die terminale Sequenz $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{X}$ tragen. Schon eine Änderung der Bindung der Fucose in $\alpha 1 \rightarrow 3$ oder $\alpha 1 \rightarrow 4$ verhindert die Akzeptorfunktion.

Die A- und B-Transferasen wurden in Knochenmark, Erythrozytenmembran, Serum, Glandula submaxillaris, Magen- und Darmmukosa, Lungengewebe, Ovarialzysten, Speichel, Milch und Urin nachgewiesen (4).

Die Allele des ABO-Gens werden je nach Phänotyp in verschiedene Untergruppen unterteilt. Die Menge an Antigen auf den Erythrozyten verhält sich je Phänotyp in folgender Reihenfolge: $A_1 > A_2 > A_3 > A_x > A_{el}$ und $B > B_3 > B_x > B_{el}$ (26).

- **A:**
 - A₁: A101 – A109
 - A₂: A201 – A223
 - A₃: A301 – A313
 - A_x: Ax01 – Ax28
 - A_w: Aw01 – Aw43
 - A_{el}: Ael01 – Ael12
 - **B:**
 - B: B101 – B121
 - B₃: B301 – B316
 - B_x: Bx01 – Bx13
 - B_{el}: Bel01 – Bel10
 - B_w: Bw01 – Bw40
 - **cis-AB:** schwache Expression von A- und B-Antigenen durch ein Allel;
cisAB01 – cisAB09
 - **B(A):** schwache Expression von A, normale Expression von B; B(A)01 – B(A)07
- (12)

1.3.3.4 Blutgruppe A1 und A2

Praktisch relevant ist eine Unterteilung von Antigen A in A1 und A2. Das häufigste A²-Allel [A201] hat im Vergleich zum A¹-Allel eine Nukleotidsubstitution c.467C>T (p.Pro156Leu) und eine Deletion c.1060delC kurz vor dem normalen Stoppcodon. Durch die folgende Leserasterverschiebung verlängert sich das Protein um 21 Aminosäuren und hat vermutlich deshalb eine geringere Enzymaktivität (27). Folglich haben A1-Erythrozyten eine deutlich höhere Antigendichte, mit ca. 1 Mio. Determinanten pro Erythrozyt, als A2-Erythrozyten mit ca. 300.000 Determinanten (28). Zusätzlich zu den Anti-A Antikörpern, die sowohl Antigen A1, wie auch A2 agglutinieren, existieren Anti-A1 Antikörper, die ausschließlich mit A1-Erythrozyten reagieren. Bei Raumtemperatur wurde das Anti-A1 in ca. 2 - 8 % der A2-Träger und 22 - 25 % der A2B-Träger entdeckt. Aus diesem Grund werden bei der Blutgruppenbestimmung A1- und A2-Testerythrozyten verwendet. Allerdings sind Transfusionsreaktionen extrem selten, da Anti-A1 ein Kälteantikörper ist, der bei Körpertemperatur meist inaktiv vorliegt (29).

Es herrschte lange eine Debatte darüber, ob die Unterscheidung zwischen A₁ und A₂ auf qualitativen oder quantitativen Ursachen beruht. Wie oben beschrieben besteht ein klarer quantitativer Unterschied in der Antigendichte. Furukawa et al. entwickelten IgM-Hybridome, die an Epitope binden, die sowohl auf A1- wie auch A2-Determinanten vorhanden sind. Trotzdem konnten sie zwischen den A1- und A2-Erythrozyten unterscheiden, da die Hybridome nur mit Erythrozyten reagierten, die eine ausreichende A-Antigendichte zeigten (30).

Andererseits lässt die Existenz von Anti-A1 auch einen qualitativen Unterschied vermuten. Jeyakanthan et al. wiesen nach, dass A1- und A2-Erythrozyten die gleiche Anzahl an Typ 2, 3 und 4 Vorläufersubstanzen tragen. Die Typ 3 und 4 Substanzen auf A2-Erythrozyten werden aber nicht weiter mit α -GalNAc glykosyliert und liegen folglich als H Antigen vor. Somit wird das A-Antigen auf A2-Zellen fast ausschließlich von Typ 2 Ketten getragen (31). Auf A1-Erythrozyten sind keine H Determinanten mehr zu finden, was auf eine unterschiedliche Affinität der Transferasen gegenüber Typ 3 und 4 Vorläufersubstanzen hinweist. Dieses A Typ 3 Glykolipid ist vermutlich die qualitative Ursache für die Anti-A1 Antikörper (32, 33).

1.3.3.5 Das O-Allel

Die beiden häufigsten O-Allele O¹ [O01] und O^{1v} [O02] sind im Prinzip durch die Nukleotiddeletion im Exon 6 bedingt. An Position c.261 kommt es zu einer Deletion von G mit einer Verschiebung des Leserahmens. Daraus resultiert ein vorzeitiges Stoppcodon an den Nukleotiden c.352 – 354, was zu einer vorzeitigen Beendigung der Translation nach der Aminosäure 117 und zum Verlust des enzymatisch aktiven Anteils der Transferase führt. Abgesehen von dieser Deletion entspricht O¹ der Referenzsequenz A¹ (24, 34).

Das O^{1v}-Allel besitzt zusätzlich 9 Punktmutationen in den Exons 3 bis 7 und eine Vielzahl weiterer SNPs in seinen Introns (35). Alle Allele mit dem c.261delG-SNP gehören zu einer Familie von deletionalen O-Allelen, da sie die gleiche verkürzende Mutation tragen. Sie ist in rund 95 % aller O-Allele enthalten (36).

Beim selteneren O²⁻¹-Allel [O03] handelt es sich um ein nicht-deletionales O-Allel. Es besitzt 6 Substitutionen, von denen 4 zu einer Änderung der Proteinsequenz führen, nicht aber zu einem Translationsabbruch (c.53G>T [p.Arg18Leu], c.220C>T [p.Pro74Ser], c.526C>G [p.Arg176Gly] und c.802G>A [p.Gly268Arg]) (12). Der Austausch des ungeladenen Glycins durch das geladene Arginin an Position 268 ist verantwortlich für die Aufhebung der Enzymaktivität, indem es zu einer Änderung der Bindungsstelle für das Zuckermolekül kommt (25).

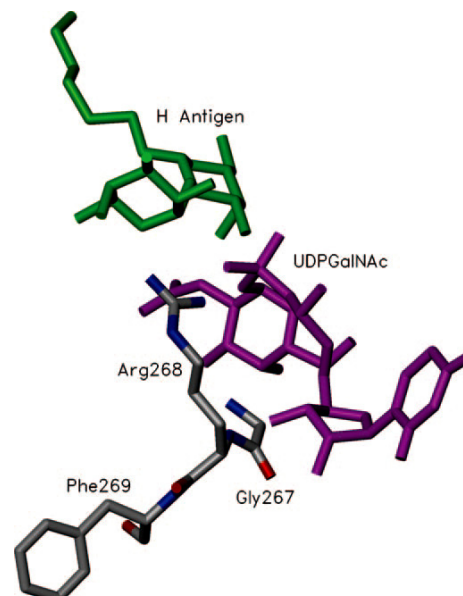


Abbildung 10: Dieses Modell der O₂-Transferase (grau) zeigt, wie die Seitenkette des Arginin (Arg268) den Zugang des UDP-GalNAc (magenta) zur aktiven Domäne des Enzyms blockiert (37).

Interessanterweise entsprechen die Substitutionen c.297A>G, c.526C>G und c.1096G>A auch dem Wildtyp B-Allel (38). Seltsam et al. untersuchten homo- und heterozygote Spender mit dem O²⁻¹-Allel oder dessen Variante O²⁻⁴ [Aw08] anhand hochsensibler Verfahren wie Adsorption/Elution oder durch monoklonale Anti-A Typisierung und erbrachten den Nachweis, dass diese Allele zu einer schwachen Expression von Antigen A fähig sind. In 80 % der Allelträger konnte eine schwache Anti-A Aktivität im Serum nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die synthetisierte Anzahl der A-Antigene innerhalb des gleichen Allels variiert und ab einer bestimmten Menge die Produktion von Anti-A inhibiert. Eine Erklärung für die Varianz wären weitere SNPs in regulierenden Abschnitten außerhalb der codierenden Sequenz des ABO-Gens oder epigenetische Faktoren, wie DNA-Methylierung, die Auswirkungen auf die Aktivität der Transferasen haben (36).

Die Untersuchung zweier israelischer Blutproben (Vater und Sohn) mit dem gleichen O²⁻¹-Allel ergab interessanterweise einen normalen O-Phänotyp des Vaters, aber einen A_{weak}-Phänotyp des Sohnes. Die Schwierigkeit, die O²⁻¹-ähnliche Allele darzustellen, besteht aus ihrer Zuordnung zu einer Blutgruppe, die in einer Grauzone zwischen Blutgruppe O und schwachen A-Untergruppen liegt. So wurden bereits mehrfach identische Allele als O und A_{weak} bezeichnet, je nachdem, welcher Phänotyp zum Vorschein trat (18, 38, 39). Abschließend sollte man erwähnen, dass in 19 untersuchten Fällen von O²⁻¹-Transfusionen, keine einzige hämolytische Reaktion beschrieben wurde. Von 6 Patienten waren ausführliche laborchemische Daten vorhanden und in allen kam es zu dem erwarteten Hämoglobinanstieg nach der Transfusion (38).

Die Tatsache, dass das Antigen O auf einem inaktivierten Gen beruht, stellt ein Problem für die Erstellung DNA-basierter Methoden zur ABO-Typisierung dar. Inaktivierende Mutationen, die einen O-Phänotyp verursachen, können an vielen Stellen der codierenden Region auf dem ABO-Gen erfolgen. Durch Insertionen, Deletionen oder Substitutionen einer einzigen Base, kann aus einem aktiven A₁-Phänotyp ein inaktiver O-Phänotyp entstehen. DNA-basierte Methoden haben eine hohe Sicherheit in der Erkennung bekannter O-Allele, aber könnten im Falle einer unbekannteren Neumutation ein O-Allel fälschlicherweise als A₁ klassifizieren und dadurch zu einer inkompatiblen Transfusion führen (40). Aus diesem Grund ist die Kombination von serologischen und molekularbiologischen Methoden in der Klinik auch heute noch essentiell.

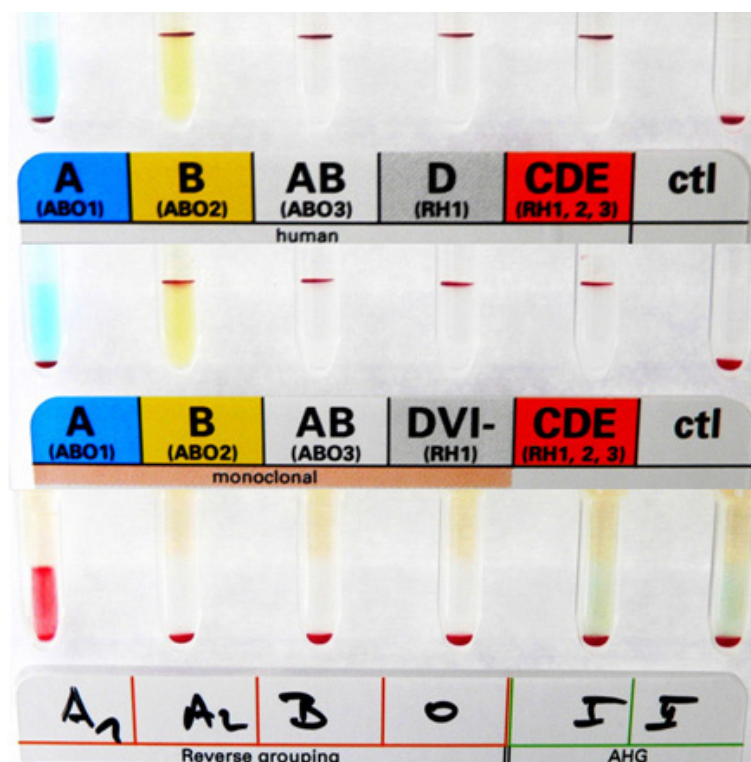
Auf der Website des ISBT sind bis Februar 2017 87 O-Allele beschrieben (12).

1.3.3.6 Das O⁵-Allel [O52]

Gewöhnliche Methoden der Genotypisierung untersuchen die Probe auf eine Deletion von G an Position c.261 um ein O-Allel zu bestimmen. Inaktivierende Mutationen an anderen Stellen des ABO-Gens erschweren Genotyp Screening Methoden.

In einer Untersuchung von Proben mit diskrepanten serologischen ABO Ergebnissen konnten Hosseini-Maaf et al. 2005 eine Reihe neuer O-Allele identifizieren. Aufgrund ihrer Abweichungen von dem ordinären O-Allel stellen sie ein Risiko für fehlerhafte Genotypisierungen dar. Unter den identifizierten Allelen befanden sich zwei Proben mit einer erstmalig entdeckten Substitution c.322C>T (p.Gln108Stop) im Exon 6 des A₁-Allels. Bei den Blutproben handelte es sich um Vater und Tochter, deren Phänotyp zwar O ist, aber im Plasma Anti-A fehlt und Anti-A₁ nur schwach vorhanden ist.

Durch die Substitution wird ein sofortiges Stoppcodon eingebaut, welches zu einem Abbruch der Proteinsynthese nach Aminosäure 107 führt. Dies entspricht 31 % des normalen Proteins. Aufgrund der Kürze des Proteins ist es höchst unwahrscheinlich, dass ein aktives Enzym entsteht. Folglich sollte es in Kombination mit einem weiteren Nullallel (O¹) einen normalen O-Phänotyp bilden. Tatsächlich wurde das O⁵-Allel [O52] in der Genotypisierung mittels kommerzieller Sequenzierkits als A¹-Allel interpretiert. Dies zeigt das hohe Risiko der Fehlinterpretation von Allelen, denen charakteristische Mutationen fehlen. Hosseini-Maaf et al. bezeichneten dieses Allel mit O⁵, welches sich nun als O52 in der Datenbank der dbRBC befindet (39).



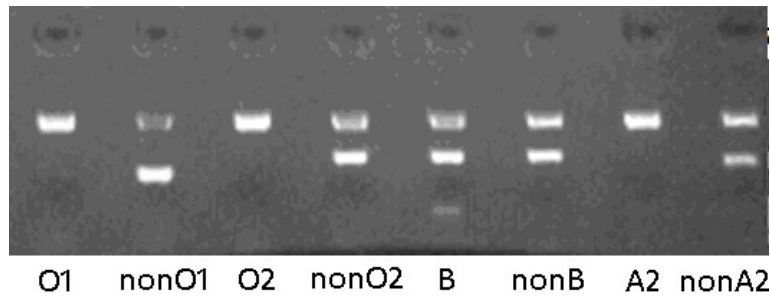


Abbildung 11: Serologie (oberes Bild) und SSP-PCR (unteres Bild) einer weiteren O⁵ [O52] Spende. Der serologische Befund ergibt die Blutgruppe B. Die Serumgegenprobe (Kärtchen „Reverse Grouping“) stimmt allerdings nicht mit der Antigenbestimmung (Kärtchen „monoclonal“ und „human“) überein. A₁ und A₂ sollten in der Serumgegenprobe positiv sein (s. Kap. 2.1). Die SSP-PCR der O⁵-Spende ergibt die Blutgruppe A₁B, obwohl ein O⁵-Allel im Genotyp vorliegt.

In der gleichen Studie wurde eine weitere Mutation entdeckt, eine Insertion von G an Position c.88, die zu einem Stoppcodon führt (O⁴ [O60]). Das Translationsprodukt entspricht nur 8 % des ursprünglichen Proteins. In den 3 bekannten Fällen fehlt Anti-A im Plasma und in 2 Fällen konnten Spuren von Antigen A auf den Erythrozyten nachgewiesen werden (38).

Hosseini-Maaf et al. entwickelten eine Genotyp Screening Methode, die, im Gegensatz zu der Vielzahl vorheriger Screening Methoden, neben den Hauptallelen auch die Identifikation von seltenen Allelen (Frequenz <1%), insbesondere nicht deletionaler O-Allele oder von Hybridallelen, ermöglicht.

Die Methode ist in zwei Schritte aufgeteilt. In einem ersten Schritt werden in einer Multiplex Allele Specific Polymorphism (ASP) PCR (s. Kap. 1.4.2) mit 12 Standard Primer-Mixturen alle Hauptallele bestimmt und gleichzeitig wird auf die meisten bekannten seltenen Allele oder Hybridallele gescreent. Das Screening wird in den meisten Fällen negativ ausfallen und der Genotyp kann sofort bestimmt werden. Ist das Screening positiv, kann für eine genaue Definition eine zweite PCR mit „High Resolution“ Primer-Mixturen durchgeführt werden. Mit dieser Methode können auch seltene Allele und Hybride genau bestimmt werden. Kommt es zu Diskrepanzen in beiden PCR-Schritten, kann eine Sequenzierung z.B. zur Identifikation eines neuen Allels durchgeführt werden. Der Vorteil dieser Methode ist ihre Flexibilität. Sie kann leicht um neue Allele erweitert werden oder an regionale Unterschiede angepasst. Außerdem laufen beide Schritte unter den gleichen PCR Konditionen und benötigen ca. 2 h pro Lauf.

Das O⁵-Allel ist bereits in diesem Screening enthalten (41).

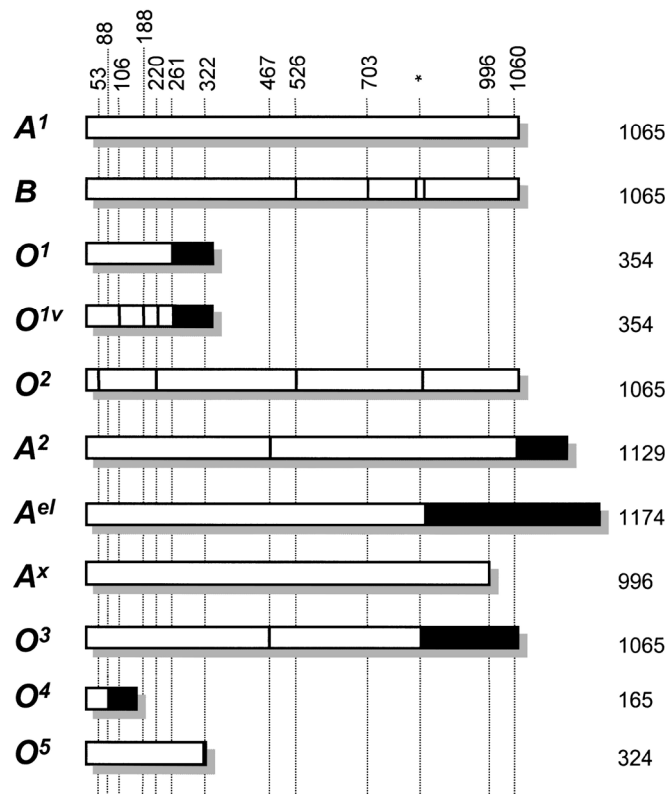


Abbildung 12: Schematische Darstellung verschiedener Allele mit veränderter Länge des Leserahmens im Vergleich zum Konsensus A¹-Allel. Rechtsseitig ist die Anzahl der Basenpaare des Leserahmens (inkl. Stoppcodon) angegeben. Oben sind Nukleotidpositionen angegeben, an denen es zu einer Mutation mit Aminosäureaustausch kam. * steht für zwei Mutationen im B-Allel an den Nukleotiden c.796 und c.803, sowie im O²-Allel an Position c.802. Bei dem A^x-Allel handelt es sich um A^{x-6} (19).

1.3.3.7 Die Hh und Se/se-Allele

Das Antigen H ist fast in jedem Menschen vorhanden. In A₁- und B-Individuen wurde das H-Antigen größtenteils in das entsprechende Blutgruppenantigen umgewandelt, aber in A₂-Individuen, deren Transferase deutlich ineffizienter ist, bleiben viele H-Strukturen frei. Das Gen FUT1, welches die H-Transferase bzw. Fucosyltransferase 1 codiert, ist genetisch unabhängig von dem ABO-Gen. FUT1 befindet sich auf Chromosom 19 an Position 19q13.3, das ABO-Gen auf Chromosom 9.

In sehr seltenen Fällen, kann eine homozygote Mutation im FUT1-Gen, die Expression des H-Antigens auf Erythrozyten verhindern und somit auch die der ABO-Antigene. FUT1 ist in mesodermalem, also auch hämatopoetischem Gewebe aktiv, nicht aber in endodermalem, welches für die Körpersekretion, wie z.B. Speichel zuständig ist (5). Endodermale Antigene werden über die Allele Se und se am FUT2 Genlocus vererbt. Die codierte Fucosyltransferase 2 ist der FUT1 sehr ähnlich. Die Se/se-Allele liegen genetisch unabhängig von ABO und Hh vor (42). Allerdings sind FUT1 und FUT2 eng miteinander

verbunden, da sie nur 35 kb voneinander entfernt vorliegen (43). Personen, die das Se-Gen homo- oder heterozygot tragen, sind ABH-Sekretoren. Personen, die homozygot für das rezessive Allel se sind, können keine ABH-Merkmale sezernieren (4).

Sind beide Gene, FUT 1 (h) und FUT2 (se), homozygot inaktiviert (hh/sese), besitzt dieses Individuum kein Antigen H und bildet klinisch relevante Anti-H Antikörper. Diese Konstellation kennzeichnet, nach dessen Entdeckungsort benannt, den Bombay-Phänotyp. Menschen mit diesem Phänotyp besitzen nicht nur Anti-A und Anti-B, sondern auch Anti-H in ihrem Serum, das sowohl mit A, B, als auch O Antigenen der Spendererythrozyten reagieren kann. Diese Patienten dürfen nur mit Bombay-Blut versorgt werden, was aufgrund des Mangels an potentiellen Spendern, eine Herausforderung für die Transfusionsmedizin darstellt (5).

1.3.4 Molekulare Struktur der A-, B-, H-Antigene

ABH-Antigene sind Oligosaccharidstrukturen an Glykoproteinen bzw. Glykolipiden der Erythrozyten- oder Gewebszellmembranen (alkohollösliche Blutgruppensubstanzen), sowie auf Molekülen der Körpersekrete (wasserlösliche Blutgruppensubstanzen). Das Grundgerüst der Oligosaccharidstruktur kann, abhängig von den endständigen Disacchariden, in 6 Typen unterteilt werden, von denen 4 bekanntlich ABH-Antigene tragen (44):

Typ 1: Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow X-

Typ 2: Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow X-

Typ 3: Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow X-

Typ 4: Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow X-

Durch die blutgruppenspezifischen Transferasen werden an diese Vorläufersubstanzen (an die D-Galactose) weitere Monosaccharide angehängt.

Im ersten Schritt wird das H-Antigen gebildet, indem die H-Transferase Fucose mittels einer α -1,2-glykosidischen Bindung an die Galactose anhängt.

Im zweiten Schritt werden die Blutgruppenantigene gebildet.

- Antigen A: N-Acetylgalactosamin wird durch die A-Transferase an die H-Struktur in α -1,3-glykosidischer Bindung gehängt.
- Antigen B: Galactose wird durch die B-Transferase in α -1,3-glykosidischer Bindung an die H-Struktur gehängt.

- Antigen O: Das O-Allel codiert für keine aktive Transferase. Somit bleiben die H-Antigene unmodifiziert und bilden die Blutgruppe O (3).

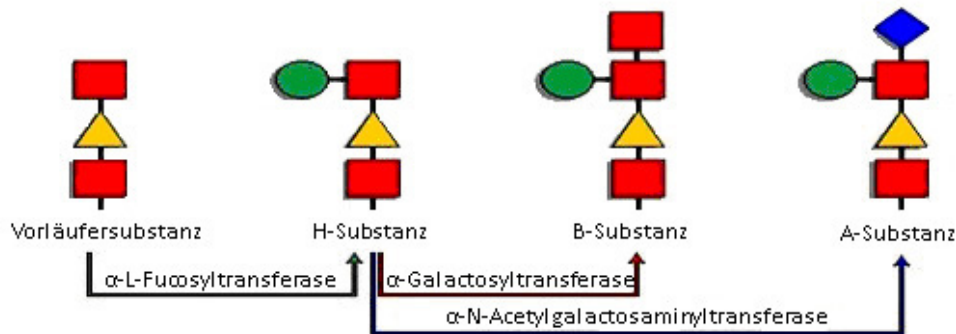
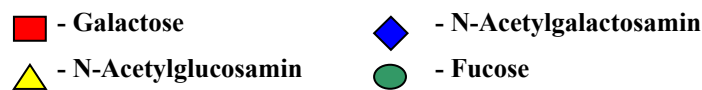


Abbildung 13: schematischer Aufbau der Monosaccharidstruktur der ABO-Antigene (abgeändert von: 45)



Die immunogenen Determinanten des ABH-Antigens bestehen aus einem einzigen Monosaccharidrest. Antikörper erkennen meistens 2 – 3 weitere Monosaccharideinheiten. Lektine hingegen binden an kleinere Epitope, die nur aus dem immundominanten Monosaccharidrest oder einem Teil davon bestehen. Trotzdem bestimmen vermutlich die Art der Oligosaccharidkernstruktur, des Trägermoleküls und der Zellmembran selbst, die serologische Reaktivität durch die sterische Anordnung der Blutgruppenderminanten. Zum Beispiel zeigen Membranglykolipide starke Unterschiede in der Orientierung ihrer Oligosaccharidketten: Typ 1 Ketten stehen nahezu senkrecht zur Membran, während Typ 2, 3 und 4 Ketten mit dem endständigen Anteil parallel zur Membran angeordnet sind. Zusätzlich können die ABH-Determinanten in ihrer räumlichen Orientierung entweder zur Membran hin oder zur Zellumgebung gerichtet sein (4, 46).

Untersuchungen zu den Vorläufersubstanzen zeigten, dass Typ 2 Ketten auf Erythrozyten der BG A₁, A₂, B, A₁B, A₂B und O vorhanden sind. Typ 3 und 4 Strukturen wurden im Gegensatz nicht auf Erythrozyten der BG B und O entdeckt. Erythrozyten synthetisieren keine Typ 1 Ketten, aber sie können zirkulierende Typ 1 Glykolipide aus dem Plasma adsorbieren (31, 33).

1.3.4.1 ABH-Determinanten auf Glykolipiden der Erythrozytenmembran

Unter den ABH-aktiven Glykosphingolipiden der Erythrozytenmembran überwiegen Typ 2 Ketten, Typ 3 und 4 liegen in geringfügiger Anzahl vor. Typ 2 Glykosphingolipide tragen Kohlenhydratstrukturen, die von einfachen kurzen Oligosacchariden bis zu komplexen

verzweigten Ketten reichen. Sie haben alle ein Neolactotetraosylceramid als Vorläufersubstanz.

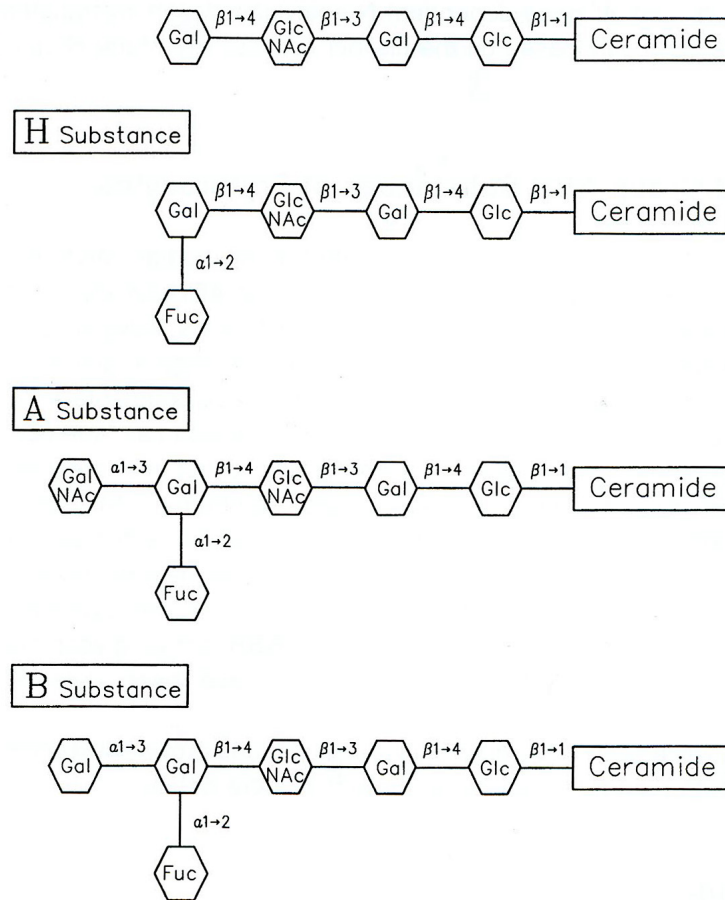
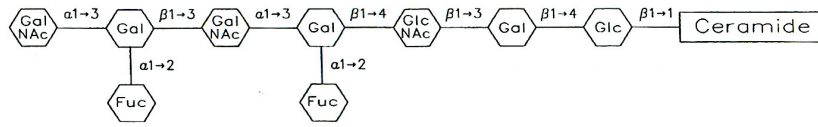


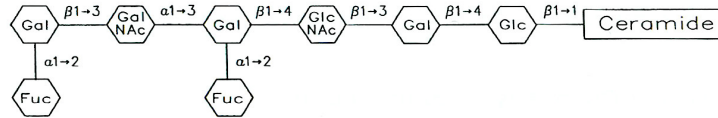
Abbildung 14: Neolactotetraosylceramid und die Typ 2 ABH-Substanzen (4)

Typ 3 und 4 Glykosphingolipide kommen nur auf BG A Erythrozyten vor. Die einfachste Form eines Typ 3 Glykosphingolipids ist das das Gerüst eines A-Typ 2 Glykolipids, welches durch eine terminale A oder H Determinante erweitert wird. Typ 4 Glykosphingolipide haben ein Ceramid der globo-Kette als Vorläufersubstanz (s. Kap. 1.2.1) (4).

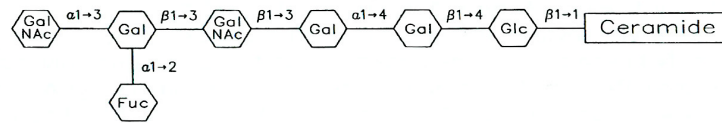
A Type-3



H Type-3



A Type-4 (= Globo-A)



H Type-4 (= Globo-H)

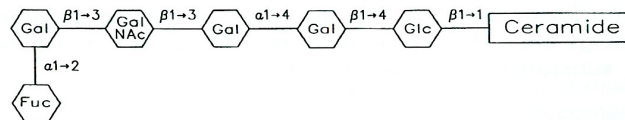


Abbildung 15: Typ 3 und Typ 4 Glykolipide (4)

Des Weiteren entdeckten Gardas und Kościelak (47) ABH-aktive Glykosphingolipide mit hochkomplexen Oligosaccharidketten aus bis zu 60 Monosacchariden. Aufgrund ihres hohen Kohlenhydratanteils sind diese Moleküle wasserlöslich. Man kann sie den Laktoglykosphingolipiden zuordnen, aber aufgrund ihres speziellen Aufbaus erhielten sie zusätzlich die Bezeichnung Polyglykosylceramide. Die Kohlenhydratkette besteht aus sich wiederholenden N-Acetyllaktosamin-Einheiten ($\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$). Durchschnittlich ist an das C6 jeder zweiten Galactose eine weitere kurze N-Acetyllaktosamin-Seitenkette gebunden (4).

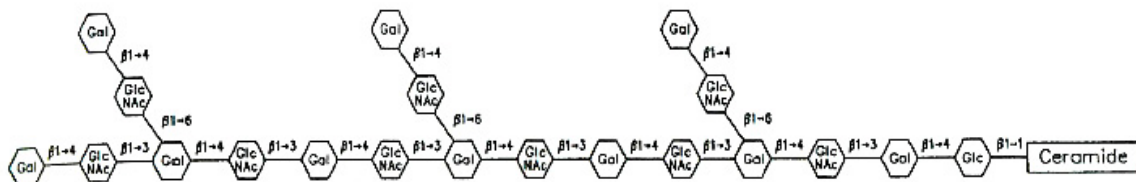


Abbildung 16: Modell eines Polyglycosylceramids (4)

1.3.4.2 ABH-Determinanten auf Glykoproteinen der Erythrozytenmembran

Auf ABH-aktiven Glykoproteinen der Erythrozytenmembran konnten bis heute nur Typ 2 Determinanten nachgewiesen werden. Unter diesen lassen sich O-glykosidisch oder N-glykosidisch gebundene Ketten unterscheiden. O-glykosidisch gebundene Oligosaccharidketten mit H-Determinante wurden von Takasaki et al. auf BG O Erythrozyten entdeckt (48). Die H-spezifische Oligosaccharidkette besteht aus $\text{Fuca1} \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc-Serin/Threonin}$. Sie werden in geringer Menge von Glykophorinen der Erythrozytenmembran getragen (49). N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide liegen auf Band 3 (Anionen Austausch 1) und Band 4.5 Proteinen (Glucose Transporter 1), sowie in geringer Menge auf Glykophorinen vor (4, 6, 50).

1.3.4.3 Verteilung der ABH-Determinanten auf die Membranbestandteile

Glykolipide mit kurzen Kohlenhydratketten (5 – 15 Monosaccharideinheiten pro Sphingosinmolekül) tragen 4 – 5 % und Polyglykosylceramide 15 – 20 % der ABH-Determinanten. Die Hauptträger der ABH-Determinanten sind Glykoproteine. 60 % liegen auf stark verzweigten N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten (v.a. Band 3 und 4.5 Proteine) und 10 – 15 % auf O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratketten (v.a. Glykophorine) (4, 34). Die Dichte der Blutgruppenderminanten auf Erythrozyten ist stark variabel. Die Anzahl der A-Determinanten pro Erythrozyt beträgt $0,81-1,17 \times 10^6$ auf A_1 -Zellen, $0,24-0,29 \times 10^6$ auf A_2 -Zellen, $0,46-0,85 \times 10^5$ auf A_1B -Zellen und $0,12 \times 10^6$ auf A_2B -Zellen.

Die Anzahl der B-Determinanten pro Erythrozyt beträgt $0,61-0,83 \times 10^6$ auf B-Zellen und $0,31-0,56 \times 10^6$ auf A_1B -Zellen (28).

Zu den niedrigsten gemessenen Werten zählen A_{el} -Erythrozyten mit durchschnittlich 700 A-Determinanten pro Zelle (51).

1.4 Methoden der Blutgruppenbestimmung

1.4.1 Serologische Blutgruppenbestimmung

Der serologische Nachweis erythrozytärer Antigene und Antikörper ist eine Standardmethode der Transfusionsmedizin. Bei Antigen-Antikörper-Reaktionen im ABO-

System achtet man auf das Ausmaß der Hämagglutination und kann somit die Reaktionsstärke der Antikörper semiquantitativ feststellen:

- negativ (-): keine Agglutination
- diskret positiv ([+]): wenige Mikroagglutinationen
- schwach positiv (+): kleine Agglutinationen
- deutlich positiv (++): viele kleine und mittelgroße Agglutinationen
- stark positiv (+++): viele große Agglutinationen
- sehr stark positiv (++++): komplette Agglutination aller Zellen, keine freien Zellen sichtbar (3)

Eine standardisierte blutgruppenserologische Untersuchung umfasst:

- Bestimmung der Blutgruppen im ABO- und im Rh-System
- Antikörpersuchtest
- ggf. Bestimmung weiterer Merkmale und deren Antikörper
- Kreuzprobe
- Bedside-Test direkt vor Transfusion eines Blutprodukts (52)

1.4.1.1 Faktoren, die die Antigen-Antikörper-Bindung beeinflussen

1.4.1.1.1 Temperatur

Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen ist eine chemische Reaktion. Eine polare Bindung, in der Elektronen zwischen Donor und Akzeptor ausgetauscht werden, findet in einem wässrigen Medium statt. Die gebildeten Hydrogen-Bindungen sind exotherm und daher stärker in niedrigeren Temperaturen. Diese Art von Bindung findet sich bei Antigenen aus Kohlenhydraten.

Apolare Moleküle, v.a. Protein-Antigene, bilden unter höheren Temperaturen hydrophobe Bindungen, indem sie H₂O ausstoßen.

Starke Temperaturerhöhungen fördern die Dissoziation von Antigen und Antikörper. Diese Tatsache findet z.B. bei Lösungsmethoden Anwendung, um Erythrozyten von gebundenen Antikörpern zu befreien (5).

1.4.1.1.2 pH-Wert

Der optimale pH-Wert für die meisten Antikörper konnte noch nicht genau ermittelt werden. Unter normalen Bedingungen (pH 7 – 7,5) tragen Erythrozyten eine negative und

Antikörper eine leicht positive Ladung, wodurch eine Agglutination gefördert wird. Eine Reduzierung des pH-Werts erhöht die Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe (5).

1.4.1.1.3 Zeit und Ionenstärke

Mollison und Polley entdeckten 1964, dass neben Temperatur, pH-Wert und Art des Antigens, auch die Ionenstärke eine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion hat. Indem sie die Ionenkonzentration der Lösung verringerten, konnten sie die Bindung von Antikörpern an die Erythrozytenantigene erhöhen und somit die Inkubationszeit von einer Stunde auf 5 Minuten verringern (53). Die geladenen Na⁺- und Cl⁻-Ionen einer isotonischen Lösung bilden Cluster um die entgegen gesetzten Ladungen der Antigen- und Antikörpermoleküle. Reduziert man die Anzahl der freien Ionen einer Lösung, wird diese „Neutralisierung“ verringert und folglich die Geschwindigkeit der Komplexbildung von Antigen und Antikörper erhöht. Solche Lösungen mit reduzierter Ionenstärke bezeichnet man als LISS (Low Ionic Strength Solution) (5).

1.4.1.2 Die Hämagglutinationsreaktion

Hämagglutination findet in zwei Schritten statt. Zuerst bindet ein Antikörper, i.d.R. IgG oder IgM, an ein Antigen eines Erythrozyten. Der Durchmesser eines Erythrozyten beträgt 7–8 µm und der eines IgG 14 nm bzw. eines IgM 30 nm. Um eine Hämagglutination hervorzurufen muss der Antikörper an mehr als einen Erythrozyten binden. Dies ist der zweite Schritt. IgM-Moleküle besitzen fünf Mal so viele Bindungsstellen wie IgG und können dadurch leichter eine Hämagglutination verursachen. Um eine Agglutination durch IgG-Antikörper zu erreichen, muss deshalb der Test modifiziert werden. Entweder indem die Erythrozyten enger aneinander gebracht werden, sodass der Abstand zwischen den Zellen verringert wird, oder indem man einen weiteren Antikörper verwendet, der die IgG-Moleküle verbindet und somit eine Agglutination verursacht (5).

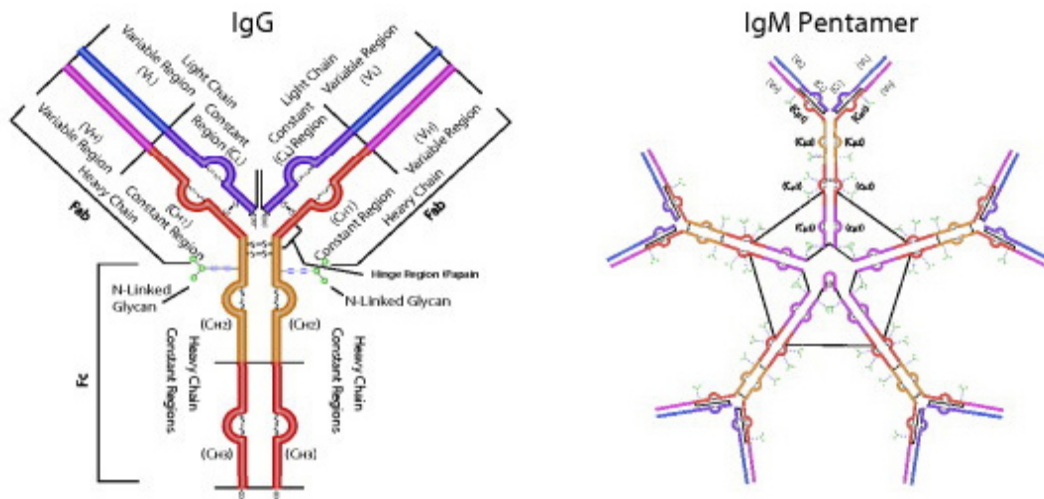


Abbildung 17: Immunglobuline IgG mit einem Durchmesser von 14 nm und IgM mit 30 nm (abgeändert von 54)

1.4.1.2.1 Direkte Agglutination

Direkte Agglutination findet i.d.R. bei IgM, optimal bei niedrigen Temperaturen, und auch bei einigen IgG statt, wie z.B. Anti-A und Anti-B. Unter normaler Ionenkonzentration beträgt der Mindestabstand zwischen Erythrozyten 14 nm, da diese sich aufgrund ihrer negativen Ladung gegenseitig abstoßen. Somit kann ein IgM-Antikörper leichter zu einer Agglutination führen als IgG, durch seinen größeren Durchmesser und seine höhere Anzahl an Bindungsstellen. Die direkte Agglutination bei IgG-Antikörpern ist vermutlich auf die Struktur der Antigene zurückzuführen. Diese ragen über die Erythrozytenoberfläche hinaus, sodass sich die Distanz zwischen den Antigenen auf unter 14 nm verringert. Ebenso spielt die Dichte des Antigens auf dem Erythrozyten eine Rolle. Je mehr Antigene vorhanden sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Komplexbildung.

Wichtig ist die Verwendung von EDTA-Blut. EDTA verhindert die Aktivierung des Komplementsystems, indem es die dafür notwendigen Ca^{2+} -Ionen in einem Chelatkomplex bindet. Ansonsten führt die Komplementkaskade zu einer Hämolyse, die falsch negative Resultate vortäuscht (5).

1.4.1.2.2 Indirekte Agglutination

Antikörper, die keine ausreichende direkte Agglutination verursachen, werden anhand modifizierter Testsysteme nachgewiesen. Ein mögliches Verfahren ist der Indirekte Antiglobulintest (IAT).

Der IAT ermöglicht den Nachweis von IgG-Blutgruppenantikörpern im Patientenserum. Hierfür werden Testerythrozyten zu dem Patientenserum hinzugegeben. Nach ausreichender Inkubationszeit werden die ungebundenen Immunglobuline ausgewaschen und Antihumanglobulin (AHG) hinzugegeben. AHG ist ein Antikörper gegen die IgG-Antikörper im humanen Serum. Nach Zentrifugation führen diese zu einer sichtbaren Hämagglutination.

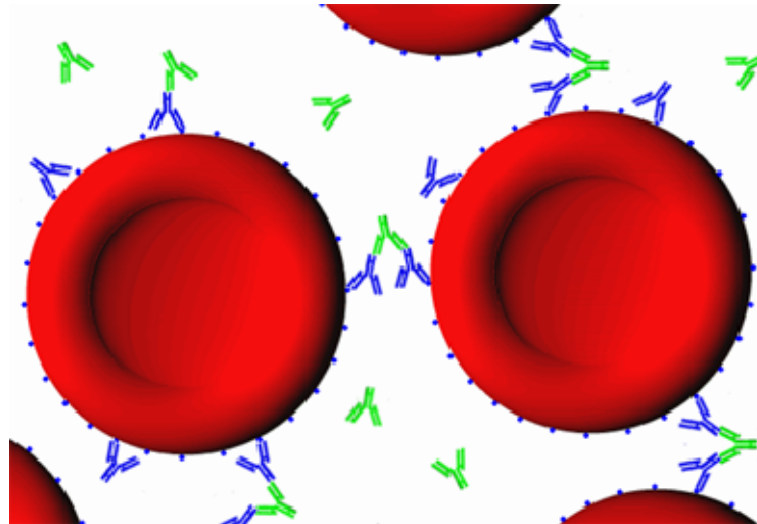


Abbildung 18: Antihumanglobulin (grün) bindet an humanes IgG (blau) und führt zu einer sichtbaren Agglutination. (55)

Das Auswaschen ungebundener Immunglobuline ist ein wichtiger Bestandteil des IAT, da bei mangelhafter Durchführung die freien Immunglobuline das AHG neutralisieren. Dies würde zu einem falsch negativen oder falsch schwachen Ergebnis führen. Durch die Entdeckung der Gelmethode kann auf die Waschphase verzichtet werden, da unter Zentrifugation nur die Erythrozyten in die Gelmatrix eindringen können, während die flüssige Phase auf der Geloberfläche verbleibt. Innerhalb des Gels befindet sich das AHG und kann dort sensibilisierte Erythrozyten agglutinieren. Agglutinierte Erythrozyten verbleiben nach Zentrifugation im oberen Anteil des Gels, während freie Erythrozyten zum Boden der Röhren gewandert sind (5).

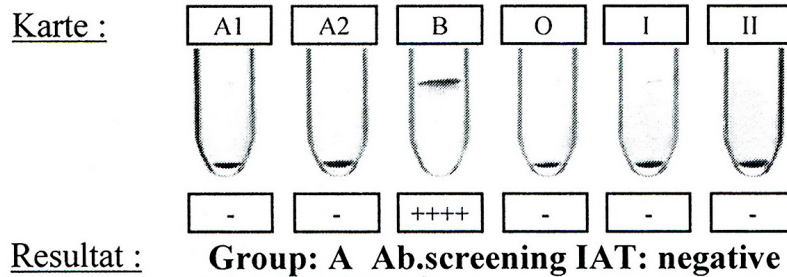


Abbildung 19: Gelkarte mit pos. und neg. Agglutinationsreaktion. Agglutinierte Erythrozyten wandern nicht durch die Gelmatrix hindurch.

1.4.2 Molekulargenetische Methoden

Serologische Verfahren zur Blutgruppenbestimmung sind nicht bei allen Blutproben möglich oder ausreichend. Wenn Blutproben einen ungewöhnlichen Phänotyp zeigen oder die Antikörper schwer definierbar sind, bzw. Diskrepanzen zwischen Antigen- und Antikörperbestimmung vorliegen, ist es notwendig, den genauen Genotyp der Probe festzustellen, durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden.

Vor allem in Fällen mit A_{weak} und B_{weak} Phänotypen entstehen häufig Probleme in der Interpretation von inkompletten Hämagglutinationen. Unterschiedliche Allele werden dem gleichen Phänotyp zugeordnet oder ein gleiches Allel ruft verschiedene Phänotypen hervor. So unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen den Laboren und ebenso zeigen unterschiedliche Klone (monoklonal) oder Serien (polyklonal) von Anti-A, Anti-B und Anti-AB Reagenzien eine hohe Varianz. Zum Beispiel erhielten Olsson et al. mehrfach Proben eines $A_{\text{w-3}}$ -Allels, das als A_{end} , A_{x} und A_{weak} beschrieben wurde. Dies stellt die Klassifikation von Untergruppen durch serologische Methoden in Frage und betont die Wichtigkeit der molekulargenetischen Diagnostik (56).

Grundlage für die Genotypisierung oder Sequenzierung eines Gens ist die Polymerase-Kettenreaktion.

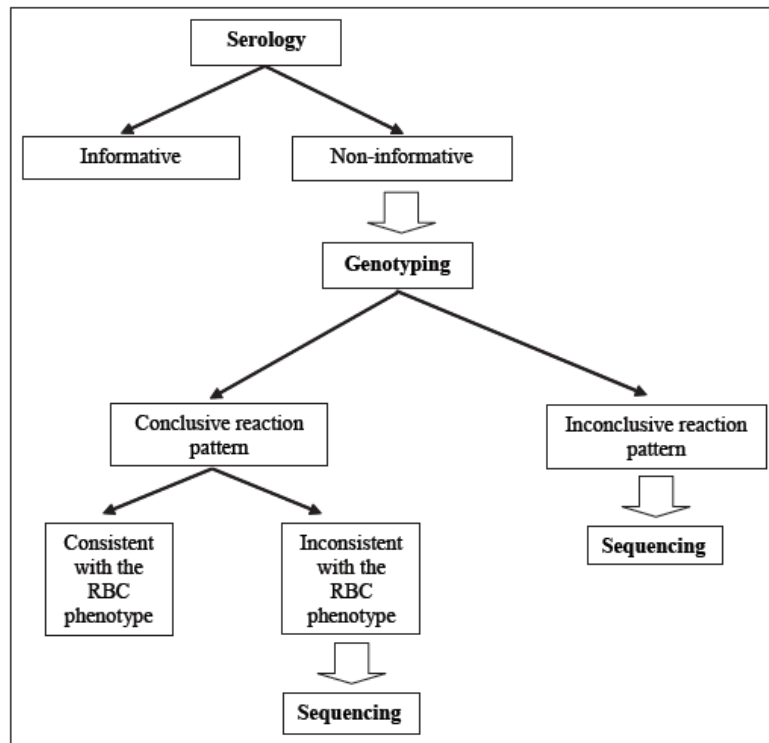


Abbildung 20: Algorithmus für die Bestimmung ungewöhnlicher Blutgruppen (57). Diskrepante serologische Ergebnisse werden durch molekulargenetische Verfahren genauer bestimmt.

1.4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro-Methode, die gezielt DNA-Segmente identifiziert und diese spezifisch, nahezu unbegrenzt vervielfältigen kann (58).

Die Synthese der spezifischen DNA-Abschnitte erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Damit diese am DNA-Strang ansetzen kann, muss die DNA-Doppelhelix durch Erhitzen denaturiert werden, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aufgebrochen werden. Die kovalenten Bindungen zwischen Desoxyribosen und Phosphatgruppen bleiben intakt.

Nachdem die DNA denaturiert ist, lässt man sie kontrolliert abkühlen, damit sog. Primer als Startmolekül den gewünschten DNA-Abschnitt markieren können. Da Primer kürzer sind, als die Matrizenstränge und in Überzahl vorliegen, binden sie schneller als die beiden Gegenstränge. Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide, die komplementär zu den Sequenzen am 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA sind. Zur Optimierung der PCR wird beim Primerdesign, unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur der Primer (T_M Wert), darauf geachtet, dass die Primer bei einer bestimmten Annealingtemperatur spezifisch an die gewünschte Stelle binden.

Die Synthese durch die Polymerase erfolgt in 3'-Richtung. Amplifiziert wird jener DNA-Abschnitt, der zwischen den spezifisch gebundenen Forward- und Reverseprimerpaaren liegt. Als Substrat dienen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), genauer dATP, dTTP, dGTP und dCTP, die in 3'-Richtung an den Primer angebaut werden, komplementär zu dem DNA-Strang, der als Matrize dient.

Dieser Zyklus der Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Elongation wird 20 – 40 Mal wiederholt, wobei die gewonnenen DNA-Kopien selbst als Matrizen wirken und somit die Zahl der synthetisierten Abschnitte exponentiell ansteigt (2^n mit n = Anzahl der Zyklen). Voraussetzung für die PCR ist die Kenntnis zumindest von Teilen der Sequenz, damit passende Primer entwickelt werden können (58).

Um Abweichungen der Sequenzen im ABO-Gen zu erkennen, wurde das Allel A¹ als Referenzsequenz festgelegt. In dieser Arbeit wurde zur Genotypisierung eine SSP PCR (PCR mit Sequence Specific Priming) angewendet. Über spezifische Primer werden bestimmte Allele bzw. SNP-Positionen erkannt und ein kurzer DNA-Abschnitt des ABO-Gens amplifiziert (59). Weiters wurde eine Longrange PCR durchgeführt, um fast das gesamte ABO-Gen zu amplifizieren. Abschließend erfolgte die Sequenzanalyse mittels Sequenzierung nach Sanger, welche im nächsten Kapitel genauer beschrieben wird.

1.4.2.2 Sequenzierung

Mithilfe der Sequenzierung lassen sich die einzelnen Basenabfolgen eines kompletten Genabschnitts darstellen. Die Festlegung des zu untersuchenden Genabschnitts erfolgt durch spezifische Primer. Es gibt verschiedene Methoden der Sequenzierung. In dieser Arbeit basiert die Sequenzierung auf der Didesoxymethode nach Sanger et al. (60), auch Kettenabbruchsynthese genannt. Es handelt sich um eine unidirektionale PCR-Reaktion, in der es durch den zufälligen Einbau fluoreszenzmarkierter 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTP) zu multiplen Strangabbrüchen kommt. Man benötigt für diese Methode die amplifizierte DNA-Matrize, Primer, DNA-Polymerase, dNTPs, ddNTPs und einen Reaktionspuffer.

Den ddNTPs fehlen zusätzlich zur 2'- auch die 3'-Hydroxygruppe am Zuckerrest. Dadurch werden sie zwar von der DNA-Polymerase als Substrat akzeptiert, aber durch die fehlende 3'-OH-Gruppe kann die Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids nicht mehr binden und es kommt zum Abbruch des neusynthetisierten DNA-Strangs (58).

Die DNA-Stränge haben durch den gleichen Primer im Ansatz alle das gleiche 5'-Ende, aber unterscheiden sich in ihrem 3'-Ende. Das Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs ist

so berechnet, dass es an jeder Position zu einem Kettenabbruch kommt und eine ausgeglichene Anzahl an kurzen und langen Fragmenten entsteht. Die vier unterschiedlichen ddNTPs (A, T; C, G) sind mit je einem anderen Farbstoff markiert.

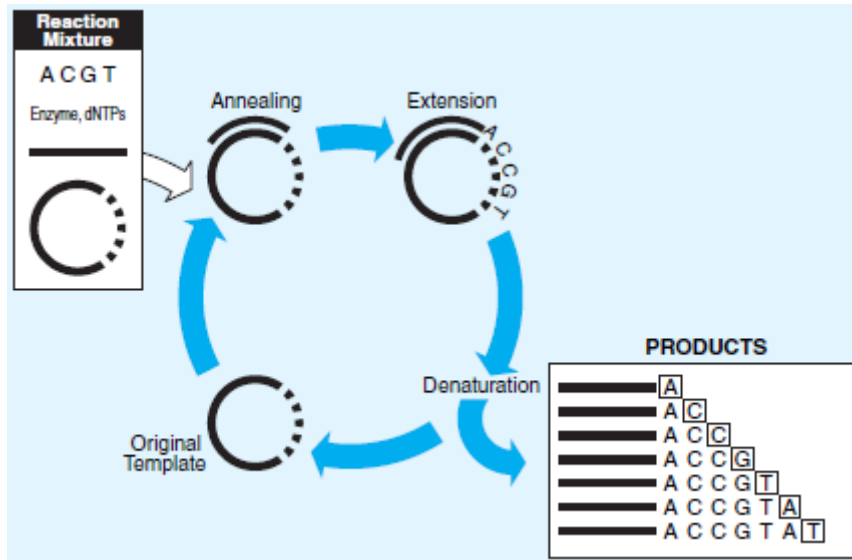


Abbildung 21: Sequenzierungs-Zyklus nach der Sanger-Methode (61)

Die Erfassung der Nukleinsäuresequenz erfolgt in einem Kapillarsequenzierer, wobei die negativ geladenen DNA-Fragmente, nach Anlage eines elektrischen Feldes, durch das Kapillarsystem des Gerätes wandern. Die Geschwindigkeit der Fragmente ist indirekt proportional zu ihrer Größe. Folglich kommt es zu einer Auftrennung nach ihrer Nukleotidanzahl. Kurz bevor die einzelnen Fragmente die Anode erreichen, passieren sie einen Laserstrahl, der die farbmarkierten ddNTPs zur Fluoreszenz anregt. Der nachgeschaltete Detektor erkennt die emittierten Farbsignale, welche je nach Base eine unterschiedliche Wellenlänge besitzen. Mittels einer Software werden die Signale in digitale Daten umgewandelt (61, 62).

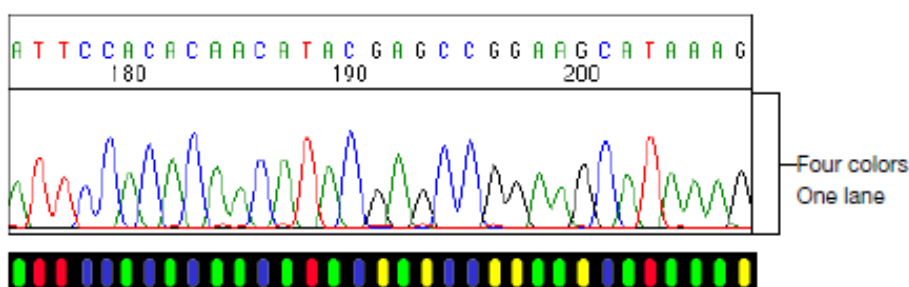


Abbildung 22: Elektropherogramm einer Kapillarelektrophorese und Umwandlung der Fluoreszenzsignale in digitale Daten. Jeder Peak steht für eine Base (61).

Die Qualität und Quantität der DNA hat großen Einfluss auf das Ergebnis. Eine mangelhafte DNA-Qualität kann zu Datenrauschen, schwachen Signalen oder unbrauchbaren Sequenzen führen. Deshalb sollte die DNA in der Spektrophotometrie eine A_{260}/A_{280} -Ratio von 1,7 – 1,9 haben. Kleinere Verhältnisse weisen auf Verunreinigungen hin. Je höher die Quantität der DNA, desto stärker ist die Intensität der Signale (63).

1.5 Ziel der Studie

Die Entdeckung des O^5 -Allels führte zu der Etablierung eines SNP Screeningverfahrens für die Substitution c.322C>T im Exon 6 des ABO-Gens. Innerhalb von 5 Jahren wurde in 15 von 91 serologisch auffälligen Proben das O^5 -Allel entdeckt (16 %).

Ziel dieser Studie war, die Kausalität zwischen der serologischen Auffälligkeit und der Mutation sowie die Prävalenz im steirischen Spenderpool und regionale bzw. familiäre Zusammenhänge des O^5 -Allels zu erkennen.

2 Methoden

Es wurden 220 Vollblut EDTA Proben zufällig an unterschiedlichen Tagen aus dem Blutspenderpool der Blutbank der Universitätsklinik für Transfusionsmedizin Graz ausgewählt. Die Blutspender stammen aus unterschiedlichen Regionen der Steiermark und es erfolgte keine Beachtung von Geschlecht, Alter oder Gesundheitszustand der Spender.

2.1 Serologische Blutgruppenbestimmung

Eine vollständige serologische ABO Blutgruppenbestimmung besteht aus der Testung der Erythrozyten auf ihre Antigene, sowie zur Bestätigung des Ergebnisses, aus der Bestimmung der Isoagglutinine im Plasma (64). Prinzipiell gibt es verschiedene serologische Methoden. In diesem Fall entschieden wir uns für die Geltechnik mit dem DiaMed ID System (DiaMed GmbH, Cressier, Schweiz), da es einen geringen Arbeitsaufwand und einfache Dokumentation verspricht. Hierzu verwendet man drei verschiedene Testkarten, die mit einem Gel gefüllte Mikroröhrchen tragen. Dieses Gel enthält bereits die entsprechenden Antikörper und Reagenzien und ist für die Verwendung von EDTA-Blut geeignet. Durch Dichtegradienten und Mikropartikel in den Röhrchen werden verschiedene Partikelgrößen aufgetrennt (z.B. agglutinierte und nicht agglutinierte Erythrozyten, freie Proteine) und dann semiquantitativ bestimmt (3). Nach diesem Schema wurden die Blutgruppen der ersten 70 verwendeten Blutproben manuell bestimmt. Aus Gründen der Zeitersparnis und bei gleicher Genauigkeit wurden die restlichen 150 Proben in einem automatisierten Verfahren mit dem Olympus PK 7300 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) serologisch getestet.

2.1.1 Humane (Polyklonale) Blutgruppenbestimmung

Antigene bieten oft mehrere Bindungsstellen, sogenannte Epitope, für verschiedene Antikörper. Polyklonale Antiseren sind daher eine Mischung von Antikörpern von verschiedenen B-Zellen, die an unterschiedliche Epitope eines Antigens binden (3).

Für die polyklonale Blutgruppenbestimmung wurde das Kärtchen „ABD-Confirmation“ verwendet, welches ein Gemisch aus poly- und monoklonalem Anti-A sowie polyklonalem Anti-B humanen Ursprungs in der Gelmatrix enthält (65).

2.1.1.1 Arbeitsschritte

Zunächst wurde eine 5%ige Erythrozytensuspension mit ID-Diluent 1 hergestellt. ID-Diluent 1 ist eine modifizierte Bromelin-Lösung mit langfristig stabilisierter Enzymaktivität. Durch die negative Ladung der Erythrozytenoberfläche kommt es zur Abstoßungsreaktion unter den Zellen und einer Verminderung der Agglutination mit IgG-Antikörpern. Proteolytische Enzyme wie Bromelin verringern die negative Ladung der Erythrozyten und spalten hervorstehende Polypeptidketten ab, sodass es zu einer leichteren Agglutination und einem geringeren Zellabstand kommt (66).

Zur Herstellung der Suspension wurden 0,5 ml ID-Diluent 1 mit 25 µl Erythrozytenkonzentrat gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 12,5 µl in die Mikroröhrchen der Gelkarte pipettiert und für weitere 10 min zentrifugiert (65).

2.1.1.2 Interpretation der Ergebnisse

Prinzipiell gibt es 2 mögliche Ergebnisse:

- Positiv: Agglutinierte Erythrozyten bilden eine rote Linie auf dem Gel oder sind im Gel verteilt.
- Negativ: Kompaktes Erythrozytensediment am Boden des Mikroröhrchens.

Aus dem Agglutinationsmuster ergeben sich folgende Möglichkeiten:

Tabelle 4: Agglutinationsmuster der polyklonalen Blutgruppenbestimmung im Reaktionsansatz mit 5%iger Erythrozytensuspension und Anti-A bzw. Anti-B

Anti-A	Anti-B	Blutgruppe
+	-	A
-	+	B
+	+	AB
-	-	O

2.1.2 Monoklonale Blutgruppenbestimmung

Monoklonale Antikörper stammen i.d.R. von Mäusen und sind Klone einer einzigen B-Zelle, die durch Hybridisierung mit einer Myelomzelle vervielfältigt wurde. Dadurch entstehen Antikörper, die nur an ein bestimmtes Epitop binden. Fehlt einem Antigen genau dieses Epitop, bindet der Antikörper nicht (3).

Die ID-Karte „DiaClon ABO/Rh for Patients“ bietet ein vollständiges Antigenprofil für ABO, RhD und CDE in einem Testansatz. Dabei liegen Sensitivität und Spezifität laut Hersteller bei 100 % für Anti-A, Anti-B und Anti-AB.

2.1.2.1 Arbeitsschritte

Zunächst wurde eine 5%ige Erythrozytensuspension mit ID-Diluent 2 hergestellt. Diluent 2 ist eine modifizierte LISS (Low Ionic Strength Solution), sprich eine modifizierte Lösung niedriger Ionenstärke.

Um eine 5%ige Erythrozytensuspension herzustellen, wurden 0,5 ml ID-Diluent 2 auf Raumtemperatur mit 25 µl konzentrierter Zellen vorsichtig gemischt. Im nächsten Schritt wurden die Mikroröhrchen der ID-Karte mit je 12,5 µl Erythrozytensuspension gefüllt und anschließend 10 min zentrifugiert (64).

2.1.2.2 Interpretation der Ergebnisse

Wie bereits unter dem Punkt „polyklonale Blutgruppenbestimmung“ beschrieben, ergibt eine rote Linie auf dem Gel bzw. im Gel verteilt, eine positive und ein kompaktes Sediment auf dem Boden des Gels, eine negative Wertung.

Aus dem Agglutinationsmuster ergeben sich folgende Möglichkeiten:

Tabelle 5: Agglutinationsmuster der monoklonalen Blutgruppenbestimmung im Reaktionsansatz mit 5%iger Erythrozytensuspension und Anti-A, Anti-B oder Anti-AB

Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Blutgruppe
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB
-	-	-	O

Schwach-positive Reaktionen können auf A oder B Untergruppen hinweisen. Diese Proben sollten weiter getestet werden. Die Negativkontrolle „ctl“ muss eine negative Reaktion aufweisen, ansonsten ist der Test ungültig (64).

2.1.3 Serumgegenprobe

Die Serumgegenprobe ist als Bestätigung der Antigenbestimmung obligat durchzuführen. Für diesen Zweck wurden Erythrozyten mit bekanntem ABO-Antigen verwendet, um die Anwesenheit von Isoagglutininen im Spenderblut nachzuweisen.

Verwendet wurde die Gelkarte „Reverse Grouping with Antibody Screening 4/2“ sowie Testerythrozyten mit den jeweiligen Antigenen A1, A2, B und O.

2.1.3.1 Arbeitsschritte

Im Gegensatz zu den Erythrozyten, konnte das Plasma ohne weitere Aufbereitung verwendet werden. Die Mikroröhrchen der Testkarte wurden mit einem Tropfen der jeweiligen Testerythrozyten und je 50 µl Spenderserum gefüllt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließenden 10 min Zentrifugation, konnte das Ergebnis abgelesen werden.

2.1.3.2 Interpretation der Ergebnisse

Auch hier können je nach Agglutination positive bzw. negative Werte angegeben werden, deren Muster eine Blutgruppe ergibt.

Tabelle 6: Agglutinationsmuster der Serumgegenprobe im Reaktionsansatz von Probenplasma und Testerythrozyten

A1	A2	B	O	Blutgruppe
-	-	+	-	A
+	+	-	-	B
-	-	-	-	AB
+	+	+	-	O

Stimmen die Ergebnisse der Serumgegenprobe mit den Ergebnissen der Antigenbestimmung überein, kann das Testverfahren als gültig angesehen werden (67).

2.2 DNA-Isolierung

Für die weiterführenden Untersuchungen ist es notwendig, die DNA aus dem EDTA-Vollblut zu isolieren und sie von kontaminierendem Material, wie RNA, Proteine etc. zu reinigen.

Eine mögliche Methode ist die magnetische Auftrennung von Stoffen, die besonders für die Isolierung von Partikeln kleiner 1 µm Durchmesser, wie DNA, geeignet ist. Nach der Lyse der Zellen adsorbiert die Siliciumdioxidoberfläche magnetischer Trägerpartikel die DNA unter Anwesenheit chaotroper Salze, welche Wasserstoffbrückenbindungen stören und die Denaturierung von Proteinen und Nukleinsäuren fördern (68).

Durch Anlage eines elektrischen Feldes werden die Bestandteile einfach und sanft aufgetrennt, was im Gegensatz zur vormals drastischen Zentrifugation zu einer geringeren Schädigung der DNA führt. Die Platzierung eines Magneten an eine Seite des Gefäßes führt zu einer Aggregation der Zielsubstanz an der Gefäßwand und der restliche Überstand kann entfernt werden. Zur Verwendung kommen magnetische Partikel von 0,5-10 µm Durchmesser, die u.a. aus Polymeren, porösem Glas oder Eisenoxid gewonnen werden. Besonders praktisch sind superparamagnetische Partikel, die, sobald ein zuvor angelegtes Magnetfeld abgeschaltet wird, nicht mehr untereinander agieren. Vor allem Polymer-„beads“ (Kügelchen) sind wegen ihrer großen Bindungskapazität bevorzugt.

Für bestimmte weiterführende Untersuchungen, ist es notwendig die Nukleinsäure von dem magnetischen Trägerpartikel wieder zu trennen. Durch die Partikel, Stabilisatoren oder Metalloxide kann die Sensitivität der PCR vermindert werden oder es kommt zu falsch negativen PCR-Ergebnissen. Eine höhere Ionenstärke, Erhitzen oder pH-Änderungen können eine Reinigung der Nukleinsäuren erreichen.

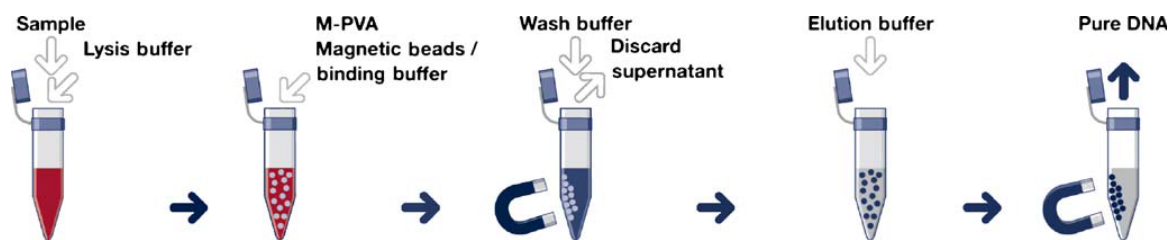


Abbildung 23: Ablauf der DNA-Isolierung (69)

Automatisierte Verfahren, wie das verwendete GenoM™-6 (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit dem vorgefertigten EZ1 DNA Blood 350µl Kit (Qiagen), bieten neben der Zeit- und Arbeitersparnis eine geringe Gefahr der Probenverschmutzung und können große Mengen Material bearbeiten (69). Das Kit enthält eine Kassette aus 10 Vertiefungen, die verschiedene Reagenzien wie z.B. magnetische Partikel und diverse Puffer enthalten.

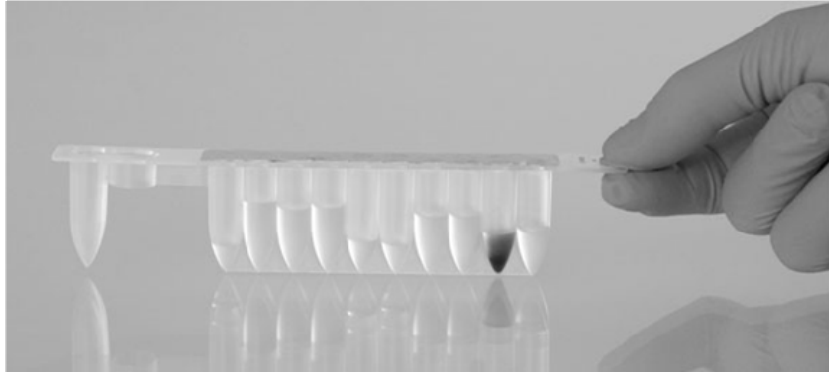


Abbildung 24: Qiagen-Kassette (68); jedes Röhrchen enthält ein bestimmtes Reagenz, z.B. magnetische Partikel, Lysepuffer, Waschpuffer oder Elutionspuffer.

2.2.1 Durchführung

Für die DNA-Isolierung wurden 350 μl EDTA-Vollblut in Probenröhrchen pipettiert. Diese wurden mit Pipetten, weiteren Probenröhrchen sowie den Reagenzienkassetten in die vorgesehenen Öffnungen des Geräts eingelegt. Nun wurde das passende Protokoll ausgewählt und gestartet. Nach Beendigung konnten die Probenröhrchen mit purifizierter DNA in 200 μl H_2O entnommen werden. So wurden aus 350 μl Vollblut ungefähr 5-12 μg DNA gewonnen (68).

2.2.2 Spektrophotometrie

Im nächsten Schritt wurden die Konzentration und der Reinheitsgrad der gewonnenen DNA gemessen. Für diese Aufgabe eignet sich die Spektrophotometrie, die die Lichtdurchlässigkeit einer Flüssigkeit bei einer bestimmten Wellenlänge misst. Dazu wurden 1-2 μl der Probe direkt auf die optische Messoberfläche des NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) pipettiert. Als Lichtquelle diente eine Licht Emittierende Diode (LED), die Wellenlängen von 260 und 280 nm aussenden kann und als Detektor eine Silikon-Photodiode (70).

Die Konzentration der DNA wurde bei 260 nm Wellenlänge bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht.

Um die Qualität der gewonnenen DNA zu messen, wurde die A260/A280-Ratio ermittelt. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zielwerte liegen zwischen 1,7 und 1,9. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine oder organische Chemikalien hin (71).

2.3 SNP Screening auf die O⁵-Mutation [O52]

Die aufgereinigte DNA wurde auf die Substitution von Cytosin durch Thymin an Position 322 der codierenden Sequenz des ABO-Gens (c.322) untersucht. Hierzu wählten wir das Verfahren einer SSP PCR, einer PCR mit „sequence specific priming“. Dafür werden die Primer so konzipiert, dass sie direkt die gesuchte Mutation bzw. den Wildtyp in der Nukleotidsequenz anzeigen. In einem Ansatz mit dem spezifischen Primer für die O⁵-Mutation, kommt es nur zu einer Amplifikation und einem PCR-Produkt, wenn die Mutation in der Proben-DNA tatsächlich vorhanden ist. Mithilfe von Primer Design Tools (kleine Computerprogramme) können passende Primersequenzen erstellt werden, die dann kommerziell produziert werden.

2.3.1 Primer und Kontrollen

Als Targetprimer für die zwei PCR Reaktionen wurden je ein Reverseprimer (spezifisch für die O⁵-Mutation oder das Wildtyp-Allel) und ein Forwardprimer (generisch) verwendet. Das PCR-Produkt dieses Genabschnitts beträgt 817 bp. Die Reverseprimer beinhalten in ihrer Sequenz die Position c.322, welche die Lokalisation für den O⁵-SNP ist. Im Falle eines O⁵-Allels bindet der Primer ABO_O52_322T_Rev und es kommt zu einer Vervielfältigung des Abschnitts zwischen Reverse- und Forwardprimer. Im Falle der Abwesenheit des O⁵-Allels kann dieser Primer nicht binden und es erfolgt keine Amplifikation des Genabschnitts, was auf das Vorhandensein des Wildtyp-Allels (c.322C) hinweist. Der Nachweis von c.322C erfolgt in einem eigenen Ansatz mit dem spezifischen ABO_O52_322C_Rev Primer.

Tabelle 7: Primersequenzen für das SNP Screening: der 1. Primer trägt G an der entsprechenden Stelle, die an Position c.322 der DNA-Matrize bindet; der 2. Primer trägt das endständige Nukleotid A, spezifisch für die O⁵-Mutation.

Targetprimer	Sequenz 5'-3'	Tm °C
1. ABO_O52_322C_Rev	TGTTCTGGAGCCTGAACTG	57
2. ABO_O52_322T_Rev	TGTTCTGGAGCCTGAACTA	55
3. ABO_O52_For2 (In5 16)	ACACTGAACTGAACGCAGC	60

Als Interne Kontrolle wurden im selben Mastermix die Forward- und Reverseprimer des FUT2 Fragment 1 verwendet. Sie amplifizieren das Gen der Fucosyltransferase 2 als Marker für den fehlerfreien Ablauf der PCR-Reaktion.

Tabelle 8: Primersequenzen für die Interne Kontrolle

Primer	Sequenz 5'-3'
FUT2_F	TGCCAAGTATTTACACACCTGAAG
FUT2_285bp_R	GGCTAGCACTGGTATCTGCA

Als Positivkontrolle wurde eine bereits sequenzierte und als O⁵ bestimmte Probe verwendet. Die Negativkontrolle wurde ebenso sequenziert und enthält die Mutation an Position c.322 nicht. Als Blank wurde destilliertes H₂O verwendet. Er dient zum Ausschluss möglicher Verunreinigungen der Reagenzien.

2.3.2 Zusammensetzung der Mastermixe

Für die PCR wurden zwei Mastermixe angerichtet. Hierfür wurden je 3 µl destilliertes Wasser, 12,5 µl Super Hot Taq Universal Master Mix (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Deutschland), 2,5 µl Betain 5M, 2 µl des Forwardprimers ABO_O52_For2 (400nM) sowie je 0,5 µl der Primer FUT2_F und FUT2_285bp_R (je 100nM) in n-facher Menge gemischt. Einem Mastermix wurde der O⁵-spezifische Primer ABO_O52_322T_Rev (400nM) zupipettiert (Mastermix T), dem Anderen der Primer ABO_O52_322C_Rev (400nM), der spezifisch an die Wildtyp-Sequenz bindet (Mastermix C). „n“ entspricht der Anzahl der Proben, zusätzlich einer Positivkontrolle, einer Negativkontrolle, einem Blank (Leerwert) und 2-3 Anteilen Pipettierreserve.

Der SuperHot Master Mix der Firma Bioron ist eine Fertigmixtur aus einer hitzestabilen Taq DNA Polymerase (0,1 units/µl), Antikörpern gegen die Polymerase, um diese unter Raumtemperatur zu inhibieren, 3mM MgCl₂, 0,02% Tween-20, dNTPs (je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) als Substrat und einem PCR Puffer aus 130 mM TrisHCl (pH 8,8 bei 25°C) sowie 32mM (NH₄)₂SO₄ (72).

Guanin- und Cytosin-reiche Abschnitte haben eine höhere Tendenz Sekundärstrukturen zu bilden als Adenin- und Thymin-reiche Abschnitte. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht in der Amplifikation der DNA, da die Sekundärstruktur eine Denaturierung der DNA und die Bindung der Primer erschwert. Durch die Zugabe von Betain wird die Bildung solcher Sekundärstrukturen unterbunden (73).

Im nächsten Schritt wurden abwechselnd 23 µl Mastermix T und Mastermix C in die Wells von beschrifteten 8-tube-Streifen pipettiert. Die aufgereinigte Proben-DNA (ca. 30-50 ng/µl) wurde mit je 2 µl in die Mastermix T oder C enthaltenden Wells eingespült. Somit konnten pro Achterstreifen 4 Proben getestet werden. Zusätzlich wurden je 2 µl

Positivkontrolle, Negativkontrolle und Aqua dest. als Blank in jedem PCR Durchlauf mitgetestet.

Tabelle 9: Protokoll für die Zusammensetzung der Mastermixe (MM) des SNP-Screening; n entspricht der Anzahl der Proben zusätzlich Positivkontrolle, Negativkontrolle, Blank und 2-3 Anteilen Reserve.

	µl	MM * n
Aqua dest.	3	
Super Hot Taq Universal MasterMix	12,5	
Betain [5M]	2,5	
ABO_O52_322C_Rev/T_Rev (400nM)	2	
ABO_O52_For2 (In5 16) (400nM)	2	
FUT2_F (100nM)	0,5	
FUT2_285bp_R (100nM)	0,5	
Template DNA [30-50 ng/µl]	2	
Gesamtansatz	25	

2.3.3 Thermocycler Protokoll Veriti™

Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem Thermocycler Veriti™ 56 Well (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) nach folgendem Protokoll:

Tabelle 10: Protokoll für das SNP Screening im Thermocycler

°C	Sec	
94	60	
92	30	} 35x
62	50	
72	40	
4	∞	

Einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 60 sek folgten 35 Zyklen Denaturierung bei 92°C für 30 sek, Primerhybridisierung bei 62°C für 50 sek und Elongation der neu synthetisierten DNA Stränge durch die Polymerase bei 72°C für 40 sek.

2.3.4 Gelelektrophorese

DNA-Moleküle besitzen eine negative Ladung. Setzt man sie in einer Gelmatrix einem elektrischen Feld aus, wandern sie zum Pluspol (Anode) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Gelmatrix ist chemisch inert und enthält viele mikroskopische Hohlräume. Sie verhält sich wie ein Netz, welches die Moleküle, je größer diese sind, umso langsamer durchlaufen.

Um die Moleküle optisch sichtbar zu machen, wurde dem Gel ein Fluoreszenzmarker für Nukleinsäuren (GelRed™ der Firma Olerup SSP®, Stockholm, Schweden) beigelegt sowie das PCR Produkt mit Bromphenolblau angefärbt. Neben der Anfärbung des Produkts dient Bromphenolblau als Gelladepuffer, indem es den pH-Wert der Probe stabilisiert und es erhöht die Dichte der Probe, sodass diese beim Auftragen in den Vertiefungen des Gels (Slots) versinkt. Je nach Größe der Probenmoleküle muss die Gelmatrix (Agarosekonzentration) ausgewählt werden. (58).

Wir entschieden uns für 2%iges Agarosegel, da das amplifizierte Molekül eine Größe von 817 bp besitzt. Zusätzlich verwendeten wir einen sogenannten „Ladder“ (Olerup SSP®). Dieser trennt sich im elektrischen Feld in 7 Fragmente (50 bis 1000 bp) gleicher Intensität auf, gleich einer Leiter und ist ein Marker für die Größe der amplifizierten Basenpaare (74).

Am Agarosegel links außen wurden 10 µl Ladder aufgetragen. Danach wurden je 7 µl PCR Produkt mit 2 µl Bromphenolblau gemischt und der Reihe nach in die Slots pipettiert. Als Nächstes wurde das Gel in eine Gelkammer mit 0,5x TBE-Pufferlösung (Gatt-Koller, Absam, Österreich) gegeben, an die ein elektrisches Feld mit 170 V angelegt ist.

Nach 24 min wurde das Gel aus dem Pufferbad entnommen, von einer UV-Kamera abgelichtet und mit dem Programm Intas (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) bearbeitet.

In der Auswertung sind unterschiedliche Banden zu erkennen. Die unterste Bande zeigt das PCR Produkt der internen Kontrolle (FUT2) und sollte immer zu sehen sein. In der Positivkontrolle oder bei einem vorhandenen O⁵-Allel erscheint eine 2. Bande im Ansatz mit Mastermix T. Bei Abwesenheit des O⁵-Allels ist keine weitere Bande sichtbar. Der Mastermix C zeigt in jedem Ansatz eine Bande, ausgenommen der Spender ist homozygot für die Mutation am Nukleotid c.322 des ABO Gens. Der Blank sollte keine einzige Bande aufzeigen, da dies sonst auf Verunreinigungen hinweist.

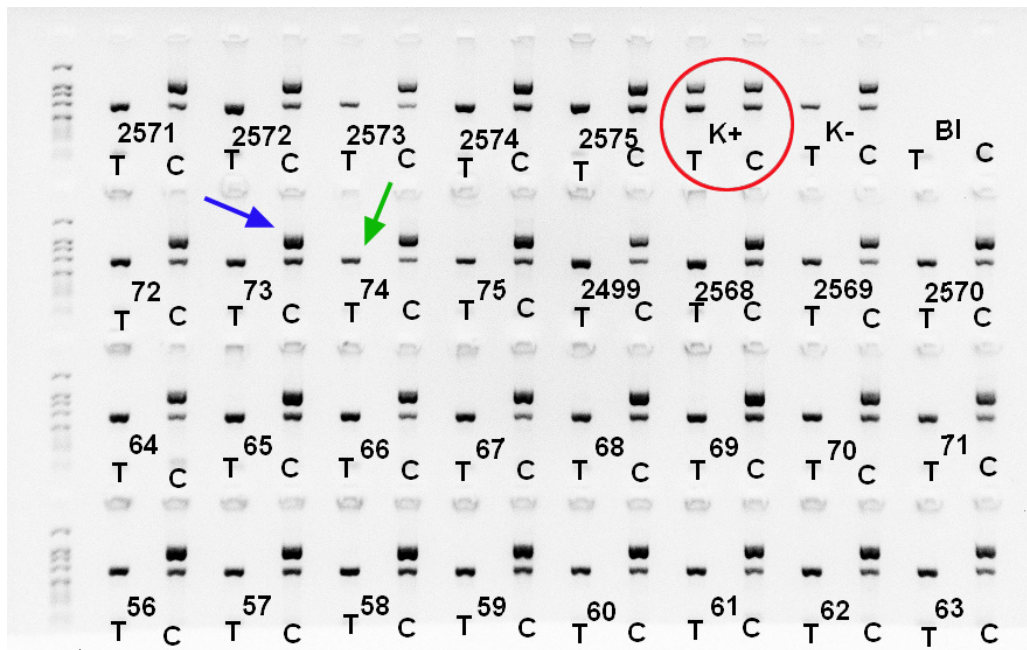


Abbildung 25: Repräsentatives Bild einer Gelelektrophorese; Die Proben wurden der Reihe nach aufgetragen. T steht für das c.322T-Allel bzw. die O⁵-Mutation, C für den Wildtyp. Bei einer O⁵-positiven Probe zeigt T zwei Banden, wie in der Positivkontrolle K⁺ (roter Kreis) dargestellt. Die obere Bande (blauer Pfeil) steht für das PCR-Produkt, welches durch die Targetprimer definiert wird (ABO c.322C oder T). Die untere Bande (grüner Pfeil) zeigt das Amplifikat der internen Kontrolle (FUT2). K⁻ steht für die Negativkontrolle, in der T nur eine Bande aufweist, und BI für den Blank. Dieser darf keine Banden aufweisen. Links befindet sich der Ladder als Marker für die Basenpaar-Anzahl: 100, 200, 300, 400, 500 und als oberste Bande 1000 bp.

2.4 Charakterisierung der Positivkontrolle

Das ABO Gen, der für das SNP-Screening verwendeten O⁵-Positivkontrolle, wurde zur Charakterisierung durchsequenziert.

2.4.1 Genomische Longrange PCR

Für die Amplifizierung des ABO-Gens der Positivkontrolle verwendeten wir die Methode der Longrange PCR. Hierfür wählten wir ein kommerzielles Kit der Firma Kapa Biosystems (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, USA). Es enthält 5 U/μl KAPA™ LongRange DNA Polymerase, welche ein Gemisch aus einer Taq DNA Polymerase und einer modifizierten Archae (Typ B) DNA Polymerase ist, die die Fähigkeit zum Korrekturlesen besitzt. Des Weiteren enthält es einen fünffach konzentrierten Puffer, 25 mM MgCl₂-Lösung, sowie 250 μl KAPA dNTP-Mix in einer Konzentration von je 10 mM.

Das KAPALongRange System ist vor allem für die PCR Amplifikation von großen DNA Fragmenten geeignet. Beide Polymerasen synthetisieren in 5'-3'-Richtung, aber nur Taq besitzt eine Doppelstrang-abhängige 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und nur die Typ B Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Korrekturlese-Aktivität. Der Taq Polymerase fehlt die Fähigkeit zum Korrekturlesen und sie kann nicht über fehleingebaute Basen hinwegarbeiten. Falsch eingebaute Basenpaare verursachen deshalb verkürzte Produkte, die während der PCR akkumulieren und bei langstreckiger PCR Fehlreaktionen hervorrufen. Im Gegensatz dazu, bieten Korrekturlese-Enzyme hohe Genauigkeit, aber arbeiten schlecht über große Distanzen oder bei geringer Probenkonzentration, da die 3'-5'-Exonuklease Primer zerstört und die Sensitivität beeinflusst. Durch die Kombination beider Polymerasen können große Fragmente mit hoher Genauigkeit synthetisiert und fehleingebaute Nukleotide ausgetauscht werden (75).

2.4.1.1 Targetprimer

Die Qualität des Produkts hängt in hohem Maße von den Primern ab und der Qualität der DNA, umso mehr, je länger die Ziel-DNA ist. Die Größe des resultierenden PCR-Produkts betrug 6828 bp.

Tabelle 11: Primersequenzen für die Longrange-PCR des ABO-Gens

Targetprimer	5'-3'	TM °C
ABO_In1_12979_SeF (18)	GATCTGGACTGGGTTTGGAG	59.4
ABO_Ex_7_Se_R (18)	CCTAGGCTTCAGTTACTCAC	57.3

Primer ABO_In1_12979_SeF hat seine Bindungsstelle im Intron 1, Primer ABO_Ex_7_Se_R in der 3'NCR (3' nicht codierende Region). Da die Primer nicht spezifisch für die O⁵-Mutation sind, sondern, für eine generische Amplifikation an konstante Sequenzabschnitte des ABO Gens binden, wurden beide Allele der Positivkontrolle vervielfältigt.

2.4.1.2 Protokoll der Mastermixe und des Thermocyclers

Der Mastermix wurde nach folgendem Protokoll für zwei Ansätze angerichtet, der Positivkontrolle und dem Blank.

Tabelle 12: Protokoll für die Anrichtung des Mastermix (MM) der Longrange PCR; n entspricht der Positivkontrolle zusätzlich einem Blank

	µl	MM*n
Aqua dest.	19.75	
5x KAPALongRange Buffer	10.00	
MgCl ₂ [25mM]	3.50	
dNTPs [je 10mM]	1.50	
ABO_In1_12979_SeF [5µM]	5.00	
ABO_Ex_7_Se_R [5µM]	5.00	
Polymerase [1,25U/50µl]	0.25	
Template DNA [ca. 80ng]	5.00	
Summe	50.00	

Nach Fertigstellung der Ansätze wurde die PCR mit folgendem Protokoll im Veriti™ Thermocycler (Applied Biosystems) gestartet:

Tabelle 13: Thermocyclerprofil für die Amplifikation des ABO-Gens; die Dauer für die Extension von 6:51 min entspricht ca. den 6828 bp bei einem Synthesedurchschnitt von 1 kb/min

°C	Zeit	
94	2'	
94	20''	} 35x
58	15''	
68	6'51''	
72	6'51''	} 1 min pro kb
4	∞	Dauer: 5h

2.4.1.3 Gelelektrophorese

5 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl blauem Ladepuffer 6x DNA Loading Dye (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA) in die Kammern eines 1%igen Agarosegels aufgetragen. Der Puffer enthält Bromphenolblau und Xylencyanol FF (76). Linksseitig wurden 5 µl Standard 10000 bp (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.) als Ladder aufgetragen. Das Gel lief 40 min bei 195 V.

2.4.1.4 Aufreinigung der DNA mit ExoSapIT vor der Sequenzier-PCR

Das ExoSapIT-Reagenz (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc.) reinigt PCR-Produkte von noch freien Primern und Nukleotiden, damit diese mit folgenden Reaktionen nicht interferieren. Es enthält zwei hydrolytische Enzyme, Exonuklease I, welches einzelsträngige Primer und ssDNA entfernt, und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), welches die dNTPs entfernt (77). Die übrigen Primer würden mit den Sequenzier-Primern um Bindungsstellen konkurrieren und Fragmente mit unterschiedlichem 5'-Ende produzieren. Dies verursacht gefälschte Sequenzen und verrauschte Sequenzier-Daten. Ebenso können andere unspezifische PCR-Produkte, wie ssDNA oder Primer-Dimere, als fälschliche Matrize die Daten verunreinigen. Überschüssige dNTPs würden das Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs in der Sequenzierung verändern und die Anzahl an kurzen DNA-Fragmenten vermindern (61).

Es wurden 10 µl des Reagenz mit 25 µl PCR-Produkt vermengt und bei 37°C über 15 min im Thermocycler inkubiert. Um ExoSapIT zu inaktivieren wurde es weitere 15 min auf 80°C erhitzt.

2.4.2 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung der Positivkontrolle erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger. Das PCR-Produkt des ABO-Gens wurde in 14 Forward- und 14 Reverse-sequenzierte Abschnitte aufgeteilt. Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt nochmals aufgereinigt und mittels Kapillarelektrophorese im ABI 3130 Genetic Analyzer (Thermofisher Scientific) sequenziert. Eine Software kombinierte die einzelnen detektierten Signale und schrieb sie in ein Elektropherogramm um.

2.4.2.1 Sequenzier-PCR

Es wurden insgesamt 28 verschiedene PCR-Reaktionen mit 28 verschiedenen Primern durchgeführt, um die Sequenz über den gesamten amplifizierten Abschnitt des ABO-Gens analysieren zu können. Die maximale Sequenz-Leseweite bei der Methode nach Sanger mit Kapillarelektrophorese liegt bei ca. 600 - 800 bp. Um eine besonders hohe Sensitivität zu erreichen, wurden Forward-, sowie Reverseprimer verwendet. Dadurch können die komplementären Stränge abgeglichen werden.

Tabelle 14: Liste der 28 Sequenzier-Primer für die Sequenzanalyse des ABO Gens (Matzhold, Eva M.; Unpublished Data)

Sequenzier-Primer	Sequenz 5'→3'	Tm
ABO_In1_12797SeF (18)	GATCTGGACTGGGTTTGGAG	59,4
ABO_Ex2_R	CCACGTCAGGGAGTGTTTCCAG	64,0
ABO_In2_593_R	GGCAGGTAGGGCAAGTTC	58,2
ABO_Ex3_F	TCGCTTCCAGACACAGAAGGTC	62,1
ABO_Ex3_R	TTCAAGGCCACAGAGTTGAGCAT	60,6
ABO_Int3_88For	CCGCTCTCTATGCTCTGCCC	63,5
ABO_Int3_715Rev	GAGTGGGAATTAGCAGACACAGCA	62,7
ABO_Int3_662For	CCTCTGTTGGGACCACTCTTGTC	64,2
ABO_Int3_1243Rev	GTTGCAGTCTGAGGTCTACGTTC	62,4
ABO_Ex4_F	TTCGACGTGTCTGGTGAATGTGT	60,6
ABO_Ex4_R	TCAAAACTGAAGCTCCAGCTCCAT	61,0
ABO_Int4_138For	CAGTCTCTACCCTGACTTGGC	61,8
ABO_Int4_778Rev	GCTGCACAGCAATGTGAATGGACT	62,7
ABO_Int4_719For	GCCATCTTAGTCATTTTGGAGTGTT	59,7
ABO_Int4_1447Rev	GCCATTGCTTTCCACTTGACTT	58,4
ABO_Ex5_F1	TGAGACACAACCCCTTACGTCCC	64,2
ABO_Ex5_R1	AAGAGACGCAAGTCAGAGAAAGCA	61,0
ABO_In5_62_F1	GAGGGCGGTTTCCTTGATGTAAATC	63,0
ABO_In5_530_R1	ATGGAGCTGGCAGGGTG	57,6
ABO_Ex6_F	TGAGTGGAGTTTCCAGGTGGG	61,8
ABO_In6_223_R	GCCTCTGGAGAAGGAGCT	58,2
ABO_In6_335_F	CTGACCAGAGATAGCAGGAG	59,4
ABO_In6_942_R	CAGATGCACCACGTTCTCC	58,8
ABO_Ex7_F1	CATCGCTGGGAAGAGGATGAAGTG	64,4
ABO_Ex7_R1	CCGGCGCTCGTAGGTGA	60,0
ABO_Ex7_F2	ATTACCTGGTGTGCGTGGACG	61,8
ABO_Ex7_F3	AAGCTGAGGTTCACTGCGGTG	61,8
ABO_Ex7_Se_R (18)	CCTAGGCTTCAGTTACTCAC	57,3

Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) angewendet. Es besteht aus einer 2,5-fach konzentrierten Fertigmixtur und einem fünffach konzentrierten Sequenzierpuffer. Die Fertigmixtur enthält dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und Puffer sowie weitere Reagenzien. Die genaue Zusammensetzung ist Eigentum des Herstellers (63).

Das Anrichten der Mastermixe erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tabelle 15: Protokoll für den Mastermix der Sequenzierung der Positivkontrolle; n entspricht der Anzahl der 28 Primer

	µl	MM*n
2,5x BigDye Terminator v3.1	2	
5x Sequencing Buffer	1	
Aqua dest.	5	
Primer [5µM] pro Röhrechen	1	
ExoSapIT aufgereinigte DNA pro Reaktionsansatz	1	
TOTAL	10	

Das Protokoll für den Thermocycler Veriti™ lautete:

Tabelle 16: Thermocyclerprofil für die Sequenzieransätze

°C	Zeit	
96	1'	
96	10''	} 25x
57	5''	
60	4'	
4	∞	Dauer: 2:15 h

2.4.2.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

Auch die Produkte der Sequenzier-PCR wurden vor der Weiterverarbeitung gereinigt. Überschüssige ddNTPs z.B. können die Zuordnung der Basen zu den Peaks im Elektropherogramm sowie die Genauigkeit der Anfangssequenzen beeinträchtigen. Zur

Verwendung kam das BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems), das Salzionen, dNTPs und ddNTPs zu Komplexen bindet und somit deren Eindringen in das Kapillarsystem verhindert.

Das Kit besteht aus zwei Reagenzien, der SAM Solution und der XTerminator Solution. Es wurden 45 µl SAM Solution und anschließend 10 µl XTerminator Solution in jeden Ansatz eingespült. Die Ansätze wurden mit Folie versiegelt und 30 min gevortext, damit die Reagenzien die unerwünschten Komponenten binden. Danach wurden die Ansätze 2 min bei 1000 g zentrifugiert, damit sich die unlöslichen Anteile der Reagenzien und die gebundenen Reaktionskomponenten auf dem Boden der Wells absetzen. Das Sequenzier-Produkt befindet sich dann im Überstand und kann direkt weiterbearbeitet werden (78).

2.4.2.3 Kapillarelektrophorese

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde vollautomatisiert mit dem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert, der die Proben parallel in 4 Kapillaren elektrokinetisch einzieht. Als Gelmatrix in den Kapillaren diente POP™ 7 (Performance Optimized Polymer). Wenn die DNA-Fragmente die Detektorkammer passieren, durchleuchtet ein Laserstrahl die Kapillaren und regt die ddNTPs zur Fluoreszenz an. Das emittierte Licht wird nach Wellenlänge aufgetrennt und von einem CCD-Sensor (charge-coupled device) empfangen. Dieser leitet die Daten an den Computer weiter, der sie durch chemometrische, algorithmische Prozessierung in 4- oder 5-farbige Elektropherogramme umwandelt (s. Abbildung 26). Die Analyse erfolgte mit der SeqScape® Software Version 3 (Applied Biosystems), welche für die Detektion von heterozygoten Basen geeignet ist (79).

2.5 Suche nach einem Zusammenhang zwischen O⁵-positiven Spendern

Es wurde mit Hilfe der Daten, gespeichert in ePROGESA (Softwareapplikation speziell für Blutbanken, MAK-SYSTEM SAS International Group, Paris, Frankreich), nach einem Zusammenhang zwischen 19 O⁵-Trägern gesucht, die bis zum 22.10.2014 identifiziert wurden. Fünf der Träger waren Blutspender, 14 Patienten. Es wurde primär nach familiären und regionalen Zusammenhängen gesucht.

3 Ergebnisse

3.1 Serologische Blutgruppenbestimmung

Die serologische Blutgruppenbestimmung ergab bei insgesamt 220 Proben, von denen 70 manuell und 150 automatisch bestimmt wurden, folgende Blutgruppenverteilung:

Tabelle 17: Blutgruppenverteilung der 220 Proben

Blutgruppe	Anzahl	Häufigkeit (%)
A	94	43,3
B	33	15,2
AB	9	4,1
O	81	37,3

Die Häufigkeiten entsprechen der ABO-Blutgruppenverteilung in der europäischen Bevölkerung.

Drei Proben konnten mittels automatisierter BG-Bestimmung nicht eindeutig einer Blutgruppe zugeordnet werden. Diese Proben wurden ebenso auf das O⁵-Allel getestet. Da diese Ergebnisse negativ ausfielen, ergab sich keine weitere Konsequenz.

3.2 DNA-Konzentration und -Qualität

Die Messung der Quantität und Qualität der isolierten DNA erfolgte mittels Spektrophotometrie. Die DNA-Konzentrationen unserer Versuchsreihe lagen bei 260 nm Wellenlänge in einem Bereich von 30,2 – 147,1 ng/μl, die Reinheitsgrade bei einer A₂₆₀/A₂₈₀-Ratio in einem Bereich von 1,74 – 1,85.

3.3 SNP-Screening

Das SNP Screening der untersuchten Proben ergab keine positiven Ergebnisse für die O⁵-Mutation. Bei 220 untersuchten Proben ergibt sich folglich eine Frequenz des O⁵-Allels von < 1/440, was per definitionem eine seltene Mutation (< 1 %) darstellt.

Tabelle 18: Auflistung der einzelnen Proben und ihrer Messwerte

	Spendennummer	Codierung	Blutgruppe	DNA-Konzentration	Reinheit	O ⁵ Screening
1.	A002014243831	2464	O+	70,1	1,78	neg
2.	A002014243832	2465	O-	87,3	1,8	neg
3.	A002014243833	2466	O+	47,4	1,76	neg
4.	A002014243834	2467	O-	92,6	1,8	neg
5.	A002014243836	2468	A-	103,4	1,76	neg
6.	A002014243837	2469	A+	62,6	1,78	neg
7.	A002014243839	2470	A+	67,4	1,8	neg
8.	A002014243824	2471	B+	70,2	1,79	neg
9.	A002014243819	2472	B+	77	1,79	neg
10.	A002014243536	2473	B+	57,6	1,78	neg
11.	A002014243640	2479	O+	69	1,78	neg
12.	A002014243642	2480	O+	71,3	1,79	neg
13.	A002014243645	2481	O+	53,5	1,77	neg
14.	A002014243636	2482	A+	73	1,78	neg
15.	A002014243644	2483	A+	61,7	1,78	neg
16.	A002014243654	2484	A+	70,1	1,79	neg
17.	A002014243663	2485	B+	68,8	1,79	neg
18.	A002014243676	2486	B-	65,9	1,81	neg
19.	A002014243689	2487	B+	65,2	1,8	neg
20.	A002014243702	2499	B+	71,2	1,81	neg
21.	A002014244422	2568	O+	98,3	1,81	neg
22.	A002014244435	2569	O+	54,5	1,8	neg
23.	A002014244444	2570	O+	54,4	1,79	neg
24.	A002014244457	2571	B+	60,8	1,8	neg
25.	A002014244431	2572	B+	73,4	1,8	neg
26.	A002014244439	2573	B+	72,3	1,8	neg
27.	A002014244425	2574	A-	70,5	1,8	neg
28.	A002014244436	2575	A-	82	1,82	neg
29.	A002014244438	2576	A+	42,6	1,76	neg
30.	A002014244446	2577	A+	76,2	1,8	neg
31.	A002014245531	2611	O+	122,8	1,82	neg
32.	A002014245534	2612	A+	66,2	1,81	neg
33.	A002014245536	2613	A+	54,5	1,8	neg
34.	A002014245545	2614	O+	65,4	1,8	neg
35.	A002014245598	2615	B+	31,4	1,77	neg
36.	A002014245601	2616	A+	53,9	1,8	neg
37.	A002014245602	2617	O+	42,8	1,77	neg
38.	A002014245618	2618	AB+	65,5	1,8	neg
39.	A002014245619	2619	O+	66,2	1,79	neg
40.	A002014245621	2620	B+	72,9	1,79	neg
41.	A002014246028	2656	B-	62,2	1,79	neg
42.	A002014246030	2657	O+	67,8	1,83	neg
43.	A002014246031	2658	A+	68,3	1,84	neg
44.	A002014246034	2659	A+	72,2	1,8	neg
45.	A002014246035	2660	AB+	68,2	1,8	neg

46.	A002014246037	2661	AB+	43,5	1,79	neg
47.	A002014246038	2662	A+	67,6	1,78	neg
48.	A002014246045	2663	O+	87,8	1,78	neg
49.	A002014246046	2664	A+	72,4	1,78	neg
50.	A002014246053	2665	B+	60,2	1,79	neg
51.	A002014250428	3023	B+	58,2	1,79	neg
52.	A002014250437	3024	B+	39,3	1,76	neg
53.	A002014250507	3025	A+	74	1,79	neg
54.	A002014250508	3026	O+	50,5	1,78	neg
55.	A002014250509	3027	A+	65,6	1,79	neg
56.	A002014250510	3028	O+	46,3	1,78	neg
57.	A002014250652	3029	B-	77	1,83	neg
58.	A002014250653	3030	A+	88,8	1,83	neg
59.	A002014250662	3031	O-	57,7	1,81	neg
60.	A002014250506	3032	O+	36	1,8	neg
61.	A002014250857	3208	O+	57,7	1,8	neg
62.	A002014250852	3209	O+	66,9	1,8	neg
63.	A002014250853	3210	A-	63,4	1,8	neg
64.	A002014250841	3211	A+	57,2	1,8	neg
65.	A002014250552	3212	B+	68,7	1,81	neg
66.	A002014250748	3213	A+	69,5	1,82	neg
67.	A002014250919	3214	A+	54,3	1,78	neg
68.	A002014250900	3215	B+	101,7	1,8	neg
69.	A002014250525	3216	B+	105,7	1,8	neg
70.	A002014250845	3217	O+	81,9	1,82	neg
71.	A002015201511	24	O-	63,1	1,81	neg
72.	A002015201512	25	B+	54,6	1,82	neg
73.	A002015201513	26	O+	56,8	1,82	neg
74.	A002015201514	27	O-	52,5	1,82	neg
75.	A002015201515	28	A-	61,4	1,82	neg
76.	A002015201516	29	O-	74	1,82	neg
77.	A002015201517	30	O+	53,3	1,83	neg
78.	A002015201518	31	B+	126	1,83	neg
79.	A002015201519	32	B+	58,8	1,82	neg
80.	A002015201520	33	A+	65,1	1,82	neg
81.	A002015201521	34	B+	59,4	1,82	neg
82.	A002015201522	35	O+	67,7	1,81	neg
83.	A002015201523	36	O+	49,8	1,83	neg
84.	A002015201524	37	O+	49,2	1,83	neg
85.	A002015201525	38	O+	68,4	1,83	neg
86.	A002015201526	39	A+	52,1	1,82	neg
87.	A002015201527	40	AB+	64,6	1,83	neg
88.	A002015201528	41	O+	49,6	1,83	neg
89.	A002015201529	42	A-	92,6	1,83	neg
90.	A002015201530	43	AB+	61,2	1,83	neg
91.	A002015201831	56	A+	64,4	1,81	neg
92.	A002015201832	57	A CDE	42,7	1,81	neg
93.	A002015201833	58	A+	91,2	1,82	neg
94.	A002015201834	59	A+	78,8	1,84	neg

95.	A002015201835	60	?+	53,5	1,83	neg
96.	A002015201836	61	A+	47,4	1,83	neg
97.	A002015201837	62	A+	49,6	1,83	neg
98.	A002015201838	63	A+	51,1	1,82	neg
99.	A002015201839	64	O CDE	67,9	1,83	neg
100.	A002015201840	65	A+	111,9	1,82	neg
101.	A002015201841	66	O-	64,6	1,82	neg
102.	A002015201842	67	A+	66,8	1,82	neg
103.	A002015201843	68	A+	48	1,83	neg
104.	A002015201844	69	O+	109,1	1,83	neg
105.	A002015201845	70	B+	52	1,82	neg
106.	A002015201846	71	A+	46,9	1,82	neg
107.	A002015201847	72	A+	66,1	1,82	neg
108.	A002015201848	73	AB+	63,5	1,82	neg
109.	A002015201849	74	???	55,8	1,82	neg
110.	A002015201850	75	O+	47	1,82	neg
111.	A002015202198	90	O+	47,1	1,82	neg
112.	A002015202199	91	A+	54	1,81	neg
113.	A002015202200	92	A+	52,7	1,82	neg
114.	A002015202201	93	O+	67,1	1,82	neg
115.	A002015202202	94	O+	63,3	1,8	neg
116.	A002015202203	95	A+	71,1	1,82	neg
117.	A002015202204	96	A+	51	1,81	neg
118.	A002015202205	97	A+	77,4	1,82	neg
119.	A002015202206	98	B+	147,1	1,83	neg
120.	A002015202207	99	A+	53,5	1,82	neg
121.	A002015202208	100	A+	60,9	1,83	neg
122.	A002015202209	101	O+	84,6	1,83	neg
123.	A002015202210	102	A+	43,6	1,8	neg
124.	A002015202211	103	A+	66,7	1,83	neg
125.	A002015202212	104	B+	48,3	1,82	neg
126.	A002015202213	105	O+	55,5	1,82	neg
127.	A002015202214	106	A-	42,4	1,82	neg
128.	A002015202215	107	A+	48,6	1,81	neg
129.	A002015202216	108	O+	30,2	1,81	neg
130.	A002015202217	109	AB+	49,6	1,82	neg
131.	A002015202631	128	A+	41,9	1,82	neg
132.	A002015202632	129	A+	56,3	1,84	neg
133.	A002015202633	130	B+	56,5	1,82	neg
134.	A002015202634	131	A+	46,9	1,76	neg
135.	A002015202635	132	A+	45,6	1,82	neg
136.	A002015202636	133	O+	50,7	1,82	neg
137.	A002015202637	134	B+	54,8	1,82	neg
138.	A002015202638	135	A+	57,7	1,82	neg
139.	A002015202639	136	A+	62,5	1,81	neg
140.	A002015202640	137	O CDE	36,4	1,81	neg
141.	A002015202641	138	???	98,2	1,83	neg
142.	A002015202642	139	O+	41,9	1,83	neg
143.	A002015202643	140	A+	44,9	1,82	neg

144.	A002015202644	141	O+	50,3	1,83	neg
145.	A002015202645	142	O+	50	1,83	neg
146.	A002015202646	143	B+	71,8	1,82	neg
147.	A002015202647	144	A+	42,3	1,82	neg
148.	A002015202648	145	O+	43,2	1,83	neg
149.	A002015202649	146	O+	30,7	1,81	neg
150.	A002015202651	161	A-	51	1,82	neg
151.	A002015202652	162	A+	50,8	1,82	neg
152.	A002015202653	163	A+	41,7	1,81	neg
153.	A002015202654	164	A+	55,3	1,81	neg
154.	A002015202655	165	O+	69,5	1,83	neg
155.	A002015202656	166	A-	69,7	1,85	neg
156.	A002015202657	167	A+	55,3	1,83	neg
157.	A002015202658	168	AB+	40,5	1,81	neg
158.	A002015202659	169	A+	63,6	1,82	neg
159.	A002015202660	170	O+	57,2	1,82	neg
160.	A002015202661	171	O+	42,3	1,81	neg
161.	A002015202662	172	A+	53,8	1,82	neg
162.	A002015202663	173	O+	46,8	1,82	neg
163.	A002015202664	174	A+	59,1	1,82	neg
164.	A002015202665	175	O+	62,4	1,82	neg
165.	A002015202666	176	A+	58,6	1,82	neg
166.	A002015202667	177	A+	72,5	1,82	neg
167.	A002015202668	178	A+	49,1	1,82	neg
168.	A002015202669	179	O+	66,6	1,83	neg
169.	A002015202670	180	A+	59,4	1,82	neg
170.	A002015202754	181	A+	41,3	1,82	neg
171.	A002015205091	397	O+	61,4	1,82	neg
172.	A002015205092	398	A+	56	1,79	neg
173.	A002015205093	399	O-	48,9	1,82	neg
174.	A002015205094	400	O+	56,3	1,82	neg
175.	A002015205095	401	A-	45,8	1,82	neg
176.	A002015205096	402	A+	60,6	1,82	neg
177.	A002015205097	403	A+	45,2	1,82	neg
178.	A002015205098	404	A+	79,2	1,81	neg
179.	A002015205099	405	O+	59,3	1,81	neg
180.	A002015205100	406	O+	61,8	1,82	neg
181.	A002015205101	407	A-	65	1,82	neg
182.	A002015205102	408	O+	58,2	1,81	neg
183.	A002015205103	409	A+	52	1,81	neg
184.	A002015205104	410	A+	70,9	1,74	neg
185.	A002015205105	411	O+	57,9	1,81	neg
186.	A002015205106	412	B-	56,4	1,81	neg
187.	A002015205107	413	B-	53	1,81	neg
188.	A002015205108	414	A CDE	69,8	1,83	neg
189.	A002015205109	415	O+	61,2	1,81	neg
190.	A002015205110	416	O-	62,4	1,82	neg
191.	A002015206771	513	A+	42,9	1,79	neg
192.	A002015206772	514	O+	53,8	1,74	neg

193.	A002015206773	515	O+	57,1	1,78	neg
194.	A002015206774	516	O+	47,7	1,79	neg
195.	A002015206776	517	O+	68,9	1,79	neg
196.	A002015206777	518	A+	60,6	1,79	neg
197.	A002015206778	519	B+	69,9	1,77	neg
198.	A002015206779	520	A+	53,1	1,79	neg
199.	A002015206780	521	A+	61,5	1,75	neg
200.	A002015206781	522	O+	44	1,75	neg
201.	A002015206782	523	O+	43,5	1,77	neg
202.	A002015206783	524	O+	56,8	1,77	neg
203.	A002015206784	525	A+	68	1,78	neg
204.	A002015206785	526	AB+	77,7	1,79	neg
205.	A002015206786	527	O+	65	1,77	neg
206.	A002015206787	528	O+	53,4	1,77	neg
207.	A002015206788	529	O-	49,1	1,77	neg
208.	A002015206789	530	A+	49,7	1,77	neg
209.	A002015206791	531	A+	61,8	1,76	neg
210.	A002015206794	532	A+	51,4	1,73	neg
211.	A002015206795	533	O+	95,7	1,78	neg
212.	A002015206796	534	O+	52,6	1,74	neg
213.	A002015206797	535	O+	58,4	1,79	neg
214.	A002015206798	536	O+	54,5	1,75	neg
215.	A002015206799	537	A+	46,9	1,82	neg
216.	A002015206800	538	O+	68,6	1,82	neg
217.	A002015206871	539	A-	118,3	1,83	neg
218.	A002015206872	540	O+	61,4	1,83	neg
219.	A002015206873	541	A+	73,9	1,83	neg
220.	A002015206874	542	A+	45,7	1,82	neg

3.4 Sequenzierung der Positivkontrolle

Die Sequenzanalyse der Positivkontrolle zeigte eine Vielzahl verschiedener Punktmutationen, in verschiedensten Bereichen des ABO-Gens verteilt. Durch den Abgleich der Sequenzen mit der Allel Datenbank der BGMUT (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) wurde der Genotyp O03/O52 festgestellt. Eine Auflistung der detektierten Basenaustausche erfolgt in Tabelle 19 (12).

Tabelle 19: Auflistung der detektierten SNP's in der Positivkontrolle mit dem O⁵-spezifischen SNP (fett) in Exon 6 (12).

ROI	Basenaustausch	Effekt
Intron 2	125-126insA (127insA) 209C> 362C>T 369C>G 396T>C 437C>T 539C>A	noncoding (nc) nc nc nc nc nc nc
Intron 3	1095delC 1096delA	nc nc
Intron 4	375C>T 1092C>T 1467G>A 1496T>C 1511T>G 1623insC	nc nc nc nc nc nc
Exon 5	c.220C>T	missense p.Pro74Ser
Intron 5	103insCCC 266G>A	nc nc
Exon 6	c.297A>G c.322C>T	silent nonsense p.Gln108Stop
Intron 6	42G>T 163T>C 179C>T 271A>G 280C>T 446A>G 628A>G 786A>G 891A>G 901G>A 950A>G	nc nc nc nc nc nc nc nc nc nc nc
Exon 7	c.526C>G c.802G>A c.1096G>A	missense p.Arg176Gly missense p.Gly268Arg silent

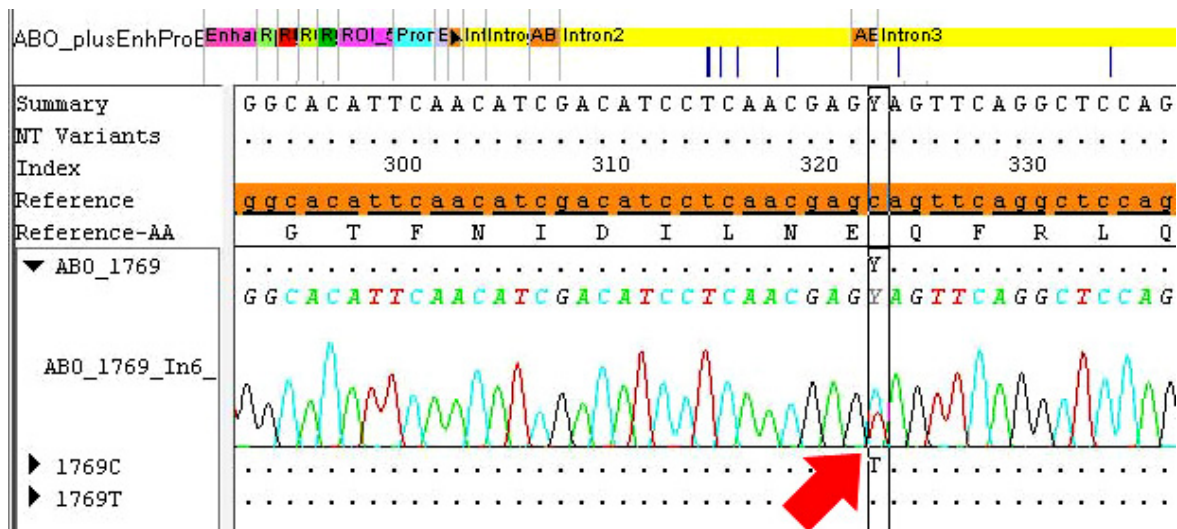


Abbildung 26: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Positivkontrolle. An Position c.322 ist durch den schwarzen Balken die Substitution von C durch T markiert. Y steht nach dem IUPAC Code für einen Pyrimidinbasenaustausch, also Cytosin und Thymin. Der rote Pfeil markiert die heterozygoten Signale an Position c.322 (blau für C und rot für T).

3.5 Analyse der ePROGESA Daten

Bei vier Patienten konnte aufgrund des Nachnamens und des Wohnsitzes eine Verwandtschaft vermutet werden. Die regionale Verteilung der Patienten und Spender konnte keine weiteren Aufschlüsse erbringen, da es keine auffälligen Häufungen innerhalb einer Region der Steiermark gab. Insgesamt verteilten sich die Spenden auf 17 unterschiedliche Regionen in einem Zeitraum von 1994 bis 2014. Der Zugang zu Patientendaten war leider auf Name und Wohnort beschränkt und konnte ebenso keine weiteren Aufschlüsse erbringen.

4 Diskussion

Ziel der Studie war es, zu erkennen, ob die Präsenz eines O⁵-Allels [O52] für das Fehlen von A1- und/oder A2-Isoagglutininen in den Blutgruppen O und B verantwortlich ist.

Aufgrund des Mangels an O⁵-positiven Proben lässt sich diese Frage nur bedingt beantworten. Da keine O⁵-positiven Spenden unter dem Pool der serologisch unauffälligen Spenden entdeckt wurden, wird die Hypothese unterstützt, dass ein Zusammenhang zwischen dem O⁵-Allel und der serologischen Auffälligkeit besteht.

Da es sich, mit einer Frequenz kleiner 0,22 %, um eine ausgesprochen seltene Mutation handelt, ist jedoch eine größere Stichprobenanzahl notwendig, um eine signifikante Aussage zu treffen. Die Größe der notwendigen Probenzahl ist jedoch schwer einzuschätzen, da die tatsächliche Häufigkeit des Allels noch nicht bekannt ist. Voraussichtlich bedarf es einiger Tausend Proben. Da dieses Allel bisher nur in der steirischen Bevölkerung zum Vorschein trat, ist die Durchführbarkeit und Sinnhaftigkeit einer solch großen Studie, im Bezug auf die Kosten-Nutzen-Relation, fragwürdig.

Die Seltenheit des O⁵-Allels in der steirischen Bevölkerung bestätigt das bisherige Vorgehen der Grazer Blutbank. Nur im Falle einer serologisch auffälligen Probe wird mit einem Genotypisierungs-Kit, welches auch das O⁵-Allel enthält, auf seltene Mutationen getestet. Es besteht keine Notwendigkeit, das O⁵-Allel in Routineuntersuchungen aufzunehmen.

Bereits Hosseini-Maaf et al. diskutierten, dass ein alternatives Splicing, welches das Exon 6 mit der O⁵-Mutation eliminiert, zu einer geringen Transferaseaktivität führen könnte. Allerdings verursacht die Verbindung von Exon 5 mit Exon 7 ebenfalls ein Stoppcodon.

Eine weitere Vermutung basiert auf der Existenz der Chi-Sequenz (5'-GCTGGCGG-3') in Intron 6. Möglicherweise führt diese auch in somatischen Zellen während der Mitose zu Rekombinationen, aus denen eine funktionelle A-Transferase entsteht. Folglich könnte ein Individuum der BG OO oder BO kleine Zellpopulationen tragen, die GTA-Aktivität aufweisen und dadurch die Produktion von Anti-A unterdrücken (39). Die O⁵-Mutation befindet sich zwar in Exon 6, allerdings könnte die Chi-Sequenz hypothetisch auch Auswirkungen auf das Splicing in vorhergehenden Abschnitten (in 5'-Richtung) haben.

Des Weiteren wiesen alle entdeckten O⁵-positiven Proben die gleichen serologischen Auffälligkeiten auf. Aus diesem Grund erscheint es unwahrscheinlich, dass die Ursache auf zufälliger Rekombination basiert. Gerade um diese Annahme zu bestätigen, wäre es

interessant zu sehen, ob es auch O⁵-Träger gibt, die keine serologischen Diskrepanzen aufweisen.

In der gleichen Studie berichten Hosseini-Maaf et al. von homozygoten c.261delG-Spenden, die trotz fehlender Antigen A Expression kein Anti-A im Plasma tragen. Dies weckt die Vermutung, dass eventuell ein anderer Mechanismus dahinter steckt, der in deletionalen, sowie nicht-deletionalen O-Allelen, die serologischen Auffälligkeiten verursacht.

Eine funktionelle Untersuchung des O⁵-Allels mittels DNA Transfektion, z.B. durch einen mutagenisierten Vektor in HeLa-Zellen eingebracht (36), könnte weitere Aufschlüsse zu der Frage erbringen, ob das O⁵-Allel bedingt fähig ist, Antigen A zu produzieren. Eine anschließende Untersuchung der Transferasekinetik kann durch radiochemische Messung mit einem hydrophoben Akzeptor Fuc α 1–2Gal β -O(CH₂)₇CH₃ erfolgen (37). Allerdings schließen solche in vitro Untersuchungen epigenetische Faktoren, wie Methylierung oder Histonmodifikation, nicht mit ein.

Über alleinige Genotypisierungsmethoden, die auf SSP PCR basieren (wie auch unsere SNP Screening Methode), werden niemals 100 % sichere Aussagen über den Genotyp einer Probe getroffen werden können. Neue Mutationen laufen immer Gefahr, übersehen zu werden und können im Extremfall zu Fehltransfusionen führen. In den letzten Jahren hat die Sequenzierung kompletter Gene einen großen Fortschritt gemacht und könnte in Zukunft, mit zunehmender Geschwindigkeit und Kosteneffizienz, eine Routineuntersuchung in den Laboren darstellen. Dies würde eine maximale Sicherheit in der Genotypisierung von Blutproben bedeuten.

Letztendlich deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das ABO-System ein sehr gut durchdachtes und verifiziertes Konzept ist, die Genetik des Systems allerdings nicht immer so eindeutig unterteilt werden kann, wie angenommen. Ein Großteil der O-Allele produziert wie erwartet reguläre O-Phänotypen, jedoch gibt es gelegentlich Ausnahmen, die das A-Antigen in geringer Menge codieren. Diese ungewöhnlichen Allele verursachen weiterhin Probleme für die klinische BG-Serologie (38).

PCR Screenings von serologisch auffälligen Proben und ggf. Sequenzierungen sind eine effektive Methode, um ein tieferes Verständnis für die Vielfalt des ABO Gens zu erlangen. Dies steigert die Qualität von Gendatenbanken und unterstützt die Entwicklung

verlässlicher Testverfahren für die Klinik. Ebenso ist ein nationaler und internationaler Austausch von Blutproben seltener ABO-Allele erstrebenswert, um PCR basierte Methoden der ABO-Typisierung zu optimieren und eine sinnvolle Nutzung von Ressourcen zu gewährleisten (80).

Die Entdeckung einer Vielzahl neuer ABO-Allele in den letzten Jahren (56, 80) ist für die Bereiche der Transfusionsmedizin, der Forensik und Transplantationsmedizin von hoher Wichtigkeit. Die weitere Suche nach neuen Allelen und der Versuch, einen tieferen Einblick in die molekulargenetischen Mechanismen zu entwickeln, sind essentiell für das Verständnis von Erkrankungen und die Entwicklung besserer Therapieverfahren.

5 Literaturverzeichnis

1. Vaupel, Schaible, Mutschler, editor. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 7.th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2015.
2. Hinghofer-Szalkay H. Transport im kardiovaskulären System (Kreislauf, Blut, Lymphe): 'Plasmaproteine', ödemverhindernde Mechanismen [cited 2016 Nov 8]. Available from: URL: <http://physiologie.cc/VII.8.htm>.
3. Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, editors. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik. 4., überarb. und erw. Aufl. Berlin: Springer Medizin; 2010.
4. Schenkel-Brunner H. Human blood groups: Chemical and biochemical basis of antigen specificity. 2., completely rev. ed. Wien: Springer; 2000. (Springer medicine).
5. Daniels G, Bromilow I. Essential Guide to Blood Groups. 3rd ed.: Wiley Blackwell; 2014.
6. Fukuda MN, Fukuda M, Hakomori S. Cell surface modification by endo-beta-galactosidase. Change of blood group activities and release of oligosaccharides from glycoproteins and glycosphingolipids of human erythrocytes. *J Biol Chem* 1979; 254(12):5458–65.
7. Christie W. Sphingosine-1-Phosphate; 2014 [cited 2016 Nov 3]. Available from: URL: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39363>.
8. Landsteiner K. Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien.; 1901 [cited 2016 Oct 18]. Available from: URL: https://www.billrothhaus.at/index.php?option=com_content&id=68&task=view&Itemid=86.
9. Hedrén G. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1930: Award Ceremony Speech; 1930 [cited 18.10.16]. Available from: URL: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1930/press.html.
10. ISBT. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Table of Blood Group Antigens [cited 2016 Oct 19]. Available from: URL: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20antigens%20within%20systems%20v4.0%20141124.pdf.
11. Jesch U, Endler PC, Wulkersdorfer B, Spranger H. ABO blood group. Related investigations and their association with defined pathologies. *ScientificWorldJournal* 2007; 7:1151–4.
12. Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT Database of Allelic Variants of Genes Encoding Human Blood Group Antigens. *Transfus Med Hemother* 2014; 41(5):346–51.
13. Springer GF, Williamson P, Readler BL. Blood group active gram-negative bacteria and higher plants. *Ann N Y Acad Sci* 1962; 97:104–10.
14. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* 2009; 25(2):48–59.

15. Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, Weghuis DO, van Kessel AG. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206(1):318–25.
16. Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology* 1995; 5(1):51–8.
17. Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1----2Gal alpha 1----3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem* 1990; 265(2):1146–51.
18. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 2003; 102(8):3035–42.
19. Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus Med* 2001; 11(4):295–313.
20. Storry JR, Olsson ML. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol* 2004; 126(6):759–71.
21. Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 1989; 264(30):17615–8.
22. Patenaude SI, Seto NOL, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol* 2002; 9(9):685–90.
23. Yamamoto F, Hakomori S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1990; 265(31):19257–62.
24. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345(6272):229–33.
25. Yamamoto F, McNeill PD. Amino acid residue at codon 268 determines both activity and nucleotide-sugar donor substrate specificity of human histo-blood group A and B transferases. In vitro mutagenesis study. *J Biol Chem* 1996; 271(18):10515–20.
26. Yip SP. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet* 2002; 66(Pt 1):1–27.
27. 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(1):366–74.
28. Economidou J, HUGHES-JONES NC, GARDNER B. Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sanguinis* 1967; 12(5):321–8.
29. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 9. ed., 2 print. Oxford: Blackwell Scientific Publ; 1994.
30. Furukawa K, Mattes MJ, Lloyd KO. A1 and A2 erythrocytes can be distinguished by reagents that do not detect structural differences between the two cell types. *J Immunol* 1985; 135(6):4090–4.
31. Jeyakanthan M, Tao K, Zou L, Meloncelli PJ, Lowary TL, Suzuki K et al. Chemical Basis for Qualitative and Quantitative Differences Between ABO Blood Groups and

- Subgroups: Implications for Organ Transplantation. *Am J Transplant* 2015; 15(10):2602–15.
32. Schachter H, Michaels MA, Tilley CA, Crookston MC, Crookston JH. Qualitative differences in the N-acetyl-D-galactosaminyltransferases produced by human A1 and A2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70(1):220–4.
 33. Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S. Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(4):1199–203.
 34. Schenkel-Brunner H. Blood-group-ABH antigens of human erythrocytes. Quantitative studies on the distribution of H antigenic sites among different classes of membrane components. *Eur J Biochem* 1980; 104(2):529–34.
 35. Olsson ML, Chester MA. Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox Sanguinis* 1996; 70(1):26–30.
 36. Seltsam A, Das Gupta C, Wagner FF, Blasczyk R. Nondeletional ABO*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion* 2005; 45(3):359–65.
 37. Lee HJ, Barry CH, Borisova SN, Seto NOL, Zheng RB, Blancher A et al. Structural basis for the inactivity of human blood group O2 glycosyltransferase. *J Biol Chem* 2005; 280(1):525–9.
 38. Yazer MH, Hosseini-Maaf B, Olsson ML. Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(6):618–24.
 39. Hosseini-Maaf B, Irshaid NM, Hellberg A, Wagner T, Levene C, Hustinx H et al. New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotypes. *Transfusion* 2005; 45(1):70–81.
 40. Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* 2009; 114(2):248–56.
 41. Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Chester MA, Olsson ML. An extensive polymerase chain reaction-allele-specific polymorphism strategy for clinical ABO blood group genotyping that avoids potential errors caused by null, subgroup, and hybrid alleles. *Transfusion* 2007; 47(11):2110–25.
 42. Oriol R, Danilovs J, Hawkins BR. A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene. *Am J Hum Genet* 1981; 33(3):421–31.
 43. Rouquier S, Lowe JB, Kelly RJ, Fertitta AL, Lennon GG, Giorgi D. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. *J Biol Chem* 1995; 270(9):4632–9.
 44. Oriol R. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet* 1990; 17(4-5):235–45.
 45. Heymann G. Blutgruppen-PCR. Lohnt sich der Aufwand? [cited 2016 Oct 27]. Available from: URL: <http://slideplayer.org/slide/864659/>.
 46. Nyholm PG, Samuelsson BE, Breimer M, Pascher I. Conformational analysis of blood group A-active glycosphingolipids using HSEA-calculations. The possible significance of the core oligosaccharide chain for the presentation and recognition of the A-determinant. *J Mol Recognit* 1989; 2(3):103–13.

47. Gardas A, Koscielak J. Megaloglycolipids--unusually complex glycosphingolipids of human erythrocyte membrane with A, B, H and I blood group specificity. *FEBS Lett* 1974; 42(1):101–4.
48. Takasaki S, Yamashita K, Kobata A. The sugar chain structures of ABO blood group active glycoproteins obtained from human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1978; 253(17):6086–91.
49. Podbielska M, Fredriksson S, Nilsson B, Lisowska E, Krotkiewski H. ABH blood group antigens in O-glycans of human glycophorin A. *Arch Biochem Biophys* 2004; 429(2):145–53.
50. Fredriksson S, Podbielska M, Nilsson B, Krotkiewska B, Lisowska E, Krotkiewski H. ABH blood group antigens in N-glycan of human glycophorin A. *Arch Biochem Biophys* 2010; 498(2):127–35.
51. Cartron JP. Quantitative and thermodynamic study of weak A erythrocyte phenotypes. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1976; 19(1):35–54.
52. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie); 2010 [cited 2016 Aug 23]. Available from: URL: http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/RiliHaemotherapie_2010.pdf.
53. Hughes-Jones NC, Polley MJ, Telford R, Gardner B, Kleinschmidt G. Optimal Conditions for Detecting Blood Group Antibodies by the Antiglobulin Test. *Vox Sanguinis* 1964; 9(4):385–95.
54. Sigma-Aldrich Co. Antibody Basics: Antibody Classes and Subclasses; 2017 [cited 2017 Jan 14]. Available from: URL: <http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html>.
55. Universitätsklinikum Würzburg - Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie. Coombs-Test [cited 2016 Oct 24]. Available from: URL: <http://www.transfusionsmedizin.ukw.de/studenten/hauptvorlesung/immunhaematologische-laboranalytik/coombstest.html>.
56. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Moulds MK, Sareneva H et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001; 98(5):1585–93.
57. Seltsam A, Doescher A. Sequence-Based Typing of Human Blood Groups. *Transfus Med Hemother* 2009; 36(3):204–12.
58. Watson J, editor. *Molekularbiologie*. 6.th ed.: Pearson Studium; 2011.
59. Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schonitzer D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996; 88(5):1852–6.
60. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463–7.
61. Applied Biosystems, editor. *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis: Applied Biosystems Chemistry Guide* 2009; 2nd Edition.
62. Thermo Fisher Scientific Inc. Sanger Sequencing Method [cited 2016 Dec 12]. Available from: URL: https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html.

63. Applied Biosystems, editor. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 06/2010.
64. DiaMed GmbH. DiaClon ABO/Rh for Patients: Hercules, California (BIO-RAD) [cited 2016 Mar 4]. Available from: URL: http://www.diamed.com/pdfs/B001025_50012_02.13_GEFISP.pdf.
65. DiaMed GmbH. ABD-Confirmation: Hercules, California (BIO-RAD) [cited 2016 Mar 4]. Available from: URL: http://www.diamed.com/pdfs/B001114_50041_06.13_GEFISP.pdf.
66. BMD Immunology. Bromelin Erytype ready for use [cited 2016 Mar 4]. Available from: URL: <http://bmd.cdi.ch/PDF/TF-RG/806220/IFU5-187819.pdf>.
67. DiaMed GmbH. Reverse Grouping with Antibody Screening 4/2: Hercules, California (BIO-RAD) [cited 2016 Mar 4]. Available from: URL: http://www.diamed.com/pdfs/B003024_50550_08.13_GEFISP.pdf.
68. Qiagen. EZ1® DNA Blood Handbook; 2010. Available from: URL: <https://www.qiagen.com/at/resources/resourcedetail?id=a815af41-355a-4598-b58b-9c2d3409e666&lang=en>.
69. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73(3):495–504.
70. Thermo Fisher Scientific Inc. NanoDrop Lite NanoDrop lite Spectrophotometer [cited 2016 Apr 7]. Available from: URL: <http://www.nanodrop.com/Productndliteoverview.aspx>.
71. Applied Biosystems, editor. BigDye® Terminator v3.1: Protocol 09/2002.
72. BIORON GmbH. SuperHot Master Mix (2x) [cited 2017 Jan 14]. Available from: URL: <http://www.bioron.net/en-2/products/superhot-master-mix-2x/>.
73. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(19):3957–8.
74. Olerup SSP. DNA Size Marker [cited 2016 Oct 29]. Available from: URL: http://www.olerup-ssp.com/productfiles/package_inserts/DNA%20Size%20marker%202011%2020M%20R01.pdf.
75. Kapa Biosystems, editor. Kapa TM LongRange DNA Polamerase.
76. Thermo Fisher Scientific Inc. DNA Gel Loading Dye (6X); 2016 [cited 14.12.16]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0611>.
77. Affymetrix. ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. Available from: URL: http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131310/USB/ExoSAP-IT+For+PCR+Product+Cleanup#1_2.
78. Applied Biosystems, editor. BigDye® Terminator v3.1 Purification Kit 2007.
79. Applied Biosystems. Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers.: System Profile; 2010 [cited 2016 Dec 21]. Available from: URL: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041990.pdf.
80. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Burkhart J, Blasczyk R. Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new ABO alleles. *Transfusion* 2003; 43(4):428–39.

