

Thomas von Känel¹, Martha Kaeslin-Meyer², Saskia Brunner-Agten³

Diagnose von Hämoglobinopathien

Hämoglobinopathien beinhalten eine heterogene Gruppe von genetischen Erkrankungen. Sie gehören mit einer Trägerfrequenz von 7% der Weltbevölkerung zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten. In der Schweiz sind etwa 50000 Personen betroffen, darunter 250 mit schweren Hämoglobinopathien.

Die genetischen Veränderungen betreffen die Globingene, welche für die Untereinheiten des Hämoglobinmoleküls kodieren. Man unterteilt in Thalassämien (verminderte Synthese von Globin) und anormale Hämoglobine (abnormales Protein). Die betroffenen Gene liegen auf Chromosom 11 (ϵ , γ , δ , β) und auf Chromosom 16 ($\alpha 1$ und $\alpha 2$). Während anormale Hämoglobine und β -Thalassämien meist durch Punktmutationen verursacht werden, sind die Ursache von α -Thalassämien oft grössere Deletionen. Hämoglobinopathien kommen primär in früheren und rezenten Malaria-gebieten vor, dies weil Mutationsträger einen gewissen Schutz vor Malaria geniessen und somit in diesen Gebieten über einen Selektionsvorteil verfügen. α -Thalassämien haben in Griechenland und in Südostasien hohe Prävalenzen, β -Thalassämien primär im Mittelmeerraum und in Asien. Die anormalen Hämoglobine Hb S (welches im homozygoten Zustand die Sichelzellerkrankheit verursacht) und Hb C sind im subsaharischen Afrika verbreitet; weitere häufige anormale Hämoglobine sind Hb E und Hb D. Interessanterweise kommen auch in der autochthonen Schweizer Bevölkerung Hämoglobinopathien vor, wie z.B. die seltene α -Globin-Variante Hb Zürich-Albisrieden.

Klinik und hämatologische Diagnostik

Klinisch manifestieren sich Hämoglobinopathien u.a. durch persistierende mikrozytäre oder unklare Anämie, Hämolyse, Zyanose, Polyglobulie und vermehrte Aborte. Es gibt keine ursächliche Therapie, weshalb auf Transfusionen und – als Folge ebendieser

– auf Eisenchelatoren zurückgegriffen werden muss. Ausgehend von der klinischen Fragestellung geschieht die Diagnose am besten aufgrund eines Algorithmus, welcher folgende Schritte umfasst: Ausgangspunkt ist ein Hämogramm und ein Blutausstrich, gefolgt von Tests zum Ausschluss eines Eisenmangels und anderer Ursachen einer Anämie. Eine schwierige Aufgabe ist die Differenzierung zwischen milder α - β -Thalassämie und Eisenmangel respektive der Kombination von beidem. In dieser Situation helfen Formeln wie diejenigen von England/Frazer oder von Huber/Herklotz (Abb. 1), welche unter Einbezug von Hämoglobin, Erythrozytenindizes, Erythrozytenzahl und allenfalls Retikulozytenzahl die Wahrscheinlichkeit einer Thalassämie berechnen.

Bleibt der Verdacht auf eine Hämoglobinopathie bestehen, müssen Spezialanalysen unternommen werden. Die endgültige Hämoglobinopathie-Abklärung im Speziallabor umfasst unter anderem die Bestimmung der Hämoglobinmoleküle mittels Elektrophorese, HPLC, Kapillarelektrophorese oder sogar Massenspektrometrie (Abb. 2). Die häufigsten anormalen Hämoglobine können meistens aufgrund des Banden- bzw. Peakmusters klar diagnostiziert werden, und es bedarf nur bei unklaren Befunden, Kombinations-

$$HH = \frac{MCH \times RDW}{10 \times Ec} + RDW$$

Abbildung 1: Die Huber-Herklotz-Formel erleichtert die Differenzierung von Thalassämien und Eisenmangel. Huber-Herklotz-Werte unter 21 weisen auf eine Thalassämie hin, während Werte über 23 für einen Eisenmangel sprechen. Ziel ist ein Algorithmus mit hoher Sensitivität und hohem positivem prädiktivem Wert, so dass insbesondere die Molekulargenetik optimal eingesetzt werden kann.

zuständen und bei Neugeborenen (bei denen das fötale Hämoglobin die Diagnose erschwert) molekulargenetischer und anderer spezieller Abklärungen. Ebenso kann meistens mit Hilfe der Bestimmung des Hämoglobins HbA2 eine β -Thalassämie belegt oder auch ausgeschlossen werden. Vorsicht ist dort jedoch bei zusätzlichem Eisenmangel respektive Werten von HbA2 im oberen Normbereich (2,2–3,1%) angezeigt. Hier kann sich eine milde silent- β -Thalassämie oder β^{++} -Thalassämie verbergen, die bei Kombination mit einer β^0 -Thalassämie einen schweren Phänotypen bei den Nachkommen auslöst. α -Thalassämien schliesslich können aufgrund der hämatologischen Messungen nicht abschliessend diagnostiziert werden und verlangen nach molekulargenetischen Abklärungen für eine definitive Diagnose.

Molekulargenetische Abklärung

Punktmutationen und Deletionen sind bei Hämoglobinopathien gleichermaßen häufig anzutreffen; dies erschwert zusammen mit der grossen Diversität an bekannten Mutationen die molekulargenetische Diagnostik. Erleichtert wird das Vorgehen dadurch, dass gewisse Aberrationen gehäuft auftreten. Dies erlaubt z.B. die Verwendung von Streifenhybridisierungs-Assays zur

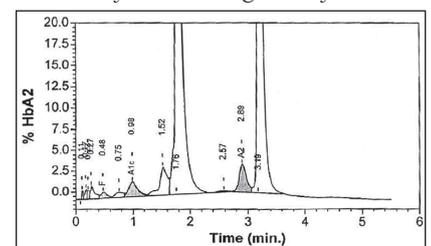


Abbildung 2: Detektion einer Hämoglobinvariante mittels HPLC. Bei einer Retentionszeit von 3,19 min zeigt sich bei diesem Patienten ein Peak von 33%. Diese Hämoglobinvariante des β -Globingens konnte mittels Molekulargenetik als Hb D-Los Angeles (auch bekannt als Hb D-Punjab) identifiziert werden.

1 Thomas von Känel, PhD,

2 Dr. phil. II Martha Kaeslin-Meyer,

3 Dr. sc. nat. Saskia Brunner-Agten, Abteilungsleiterin Erythrozytenfunktionsdiagnostik (EFD) Zentrum für Labormedizin, Kantonsspital Aarau AG

Detektion der häufigsten Punktmutationen im β -Globingen. Im Bereich der α -Thalassämie-Diagnostik haben sich aufgrund der Häufigkeit von bestimmten Deletionen gap-PCR-Ansätze (Abb. 3) bewährt, idealerweise ergänzt durch MLPA für den Nachweis von selteneren Deletionen. Bei der genaueren Charakterisierung von neu nachgewiesenen Deletionen kommt die Chip-Hybridisierung (Array-CGH, Abb. 4) zum Einsatz.

Eine Alternative bzw. eine Ergänzung zu den Streifenhybridisierungen ist die Sequenzierung nach Sanger. Damit sind sämtliche Punktmutationen in der untersuchten Region nachweisbar; die Methode erlaubt jedoch keine quantitativen Rückschlüsse und somit keinen Nachweis von grösseren Deletionen. Wegen der geringen Grösse der Globingene ist der Druck zur Umstellung auf Next-Generation-Sequencing (welches die effiziente Analyse von grossen Genregionen erlaubt) noch gering. Der Einsatz dieser neuen Sequenzier-Technologie wird zudem durch die starke Homologie zwischen dem $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Gen erschwert.

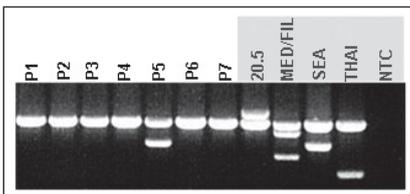


Abbildung 3: Ein Multiplex-gap-PCR-Ansatz zur Detektion der häufigsten α^0 -Deletionen. Grau hinterlegt sind die Positivkontrollen sowie die Non-Template Control. Patient 5 ist heterozygot für die SEA-Deletion. Je nach Verdachtsstärke der α -Thalassämie ist bei den negativen Patienten eine MLPA zur Detektion von selteneren Deletionen sowie eine Sanger-Sequenzierung zum Nachweis von Punktmutationen indiziert.

Fazit

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Thalassämien und anomale Hämoglobine weltweit sehr häufig vorkommen und infolge Migration auch in unseren Breitengraden vermehrt auftreten. Eine definitive Diagnose ist wichtig, um unklare Anämiezustände zu klären, unnötige Eisentherapien zu verhindern und eine Risikoabschätzung im Rahmen eines Kinderwunsches zu erlauben. Molekulargenetische Untersuchungen sind indiziert bei der Diagnose von α -Thalassämien, zur Klärung von unklaren Befunden, in Neonaten sowie in Situationen nach Transfusionen und bei Patienten mit schweren, bedrohlichen Anämien. Zudem ist eine vorangehende molekulargenetische Untersuchung der Eltern bei pränatalen Untersuchungen zwingend. Sinnvollerweise gehören diese Abklärungen in ein erfahrenes Speziallabor.

Korrespondenz:
Saskia.Brunner@ksa.ch

Diagnostic des hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies regroupent un ensemble hétérogène de maladies génétiques. Avec une part de population porteuse de 7% dans le monde, il s'agit des maladies héréditaires monogéniques les plus fréquentes. En Suisse, 50 000 personnes sont concernées, parmi lesquelles 250 sont atteintes d'hémoglobinopathies sévères. Les modifications génétiques portent sur les gènes de la globine codant pour les diverses chaînes de la molécule d'hémoglobine. Parmi ces pathologies, on distingue les défauts de synthèse de la globine (thalassémies) et les anomalies de structure de l'hémoglobine (protéine anormale). Ces gènes sont localisés sur les chromosomes 11 (ϵ , γ , δ , β) et 16 ($\alpha 1$ et $\alpha 2$). Il est très important d'établir un diagnostic définitif et d'écarter toute anémie d'étiologie peu claire, afin d'éviter des cures martiales superflues et de permettre une évaluation des risques dans le cadre d'un désir de procréation. Il est indiqué de recourir aux examens de génétique moléculaire lors du diagnostic d'une thalassémie α , pour préciser un résultat insuffisamment clair, chez des nouveau-nés, dans des situations post-transfusionnelles et chez des patients présentant une anémie sévère ou alarmante. Lors de l'établissement d'un diagnostic prénatal, il est en outre strictement nécessaire d'effectuer chez les parents des tests préalables par génétique moléculaire. Raisonnablement, ce genre d'analyse doit revenir à des laboratoires spécialisés avec expérience.

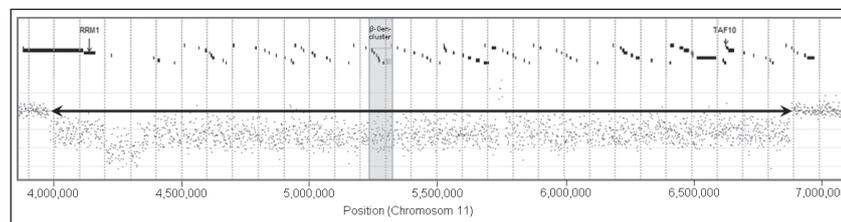


Abbildung 4: Chip-Hybridisierung (Array-CGH) bei einer Schweizer Patientin mit einer de novo aufgetretenen $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -Thalassämie und leichter mentaler Retardierung. Die Deletion (Doppelpfeil) umfasst den gesamten β -Globingencluster (grau hinterlegt) sowie über 90 weitere Gene. Die Deletion der Gene *RRM1* und/oder *TAF10* verursacht wahrscheinlich die mentale Retardierung. Mit MLPA wäre in diesem Fall nur die $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -Thalassämie diagnostiziert worden, und das wahre Ausmass der Deletion wäre unerkannt geblieben.

**“Metrologie für
Pipetten und
Dispenser
aller Marken”**

SOCOREX Service Center

- Breites Reparatur- und Kalibrationsprogramm
- Technische Beratung durch qualifiziertes Team
- Effiziente Erledigung, **“Express Service”** in nur 48-Stunden
- SCS akkreditiertes Kontrolllabor
- Kontrollen gemäss Normen ISO 8655 und ISO 17025

Socorex Isba S.A. - socorex@socorex.com - www.socorex.com