



Medizinische Genetik Dr. Wolfgang Schmitt
Pränataldiagnostik Dr. Reinhard Mai
Dr. Lore Mulfinger
FRAUENÄRZTE

Informationen für ärztliche Zusender von Humangenetischen Untersuchungen

Inhalt:

1. Einleitung	S. 2
2. Glossar	S. 3
3. Probenversand	S. 5
4. Abrechnung	S. 5
5. Humangenetische Beratung	S. 5
6. Abstammungsuntersuchung	S. 6
7. Nackentransparenzmessung	S. 7
8. Chromosomenuntersuchung	S. 8
9. Pränataler Schnelltest	S. 9

EINLEITUNG

In der modernen Medizin kommt der Humangenetik eine ständig wachsende Bedeutung zu. Die Zahl der vererbaren Erkrankungen oder Prädispositionen, die einer molekulargenetischen Untersuchung zugänglich sind, ist in den letzten Jahren rasant gestiegen. Für eine ergebnisorientierte Medizin sind daher humangenetische Untersuchungen und Leistungen zu einem wichtigen Stützpfiler geworden.

Methodisch kann man die Humangenetik in molekulare und zytogenetische Humangenetik unterteilen. Die **Zyto-genetik** hat in den letzten Jahren durch die Verwendung verbesserter Methoden und neuer Sonden wieder an Bedeutung gewonnen. Die klassische Karyotypisierung mit modernen Bänderungstechniken ist bei numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen in ihrer Aussagekraft kaum zu überbieten. Die Verwendung spezifischer DNA-Sonden mit Fluoreszenzmarkierung (*Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* (FISH)) ist zu einer weiteren wichtigen Methode geworden. Mit diesen Sonden können Mikrodeletionssyndrome nachgewiesen, Ploidieanalysen durchgeführt oder komplexe Chromosomenaberrationsergebnisse nachvollzogen werden.

Der Siegeszug der **molekularen Humangenetik** begann vor über dreißig Jahren. Seither wurde eine Vielzahl von Genen lokalisiert, kloniert und charakterisiert, Mutationen detektiert und in funktionellen Studien analysiert. Die Zahl der molekulargenetisch diagnostizierbaren Krankheiten ist daher beständig angewachsen.

Aus dem akademischen Fach Medizinische Genetik wurde eine klinische Disziplin, die in praktisch alle Bereiche der Medizin hineinwirkt und für die Diagnose und Therapie zunehmend an Bedeutung gewinnt. Unter genetischer Erkrankung versteht man heute nicht mehr nur die klassisch-mendelnden, dominanten oder rezessiven Erkrankungen. Unvollständige Penetranz und Polygenie, reduzierte Expressivität und Phänokopie zeigen uns, dass der Weg vom Genotyp zum Phänotyp sehr komplex ist. Besonders deutlich wird dies an solchen Erkrankungen, die sich auf eine genetische Prädisposition zurückführen lassen. Dazu gehören zum Beispiel genetische Störungen der Thromboseregulation oder genetische Prädisposition bei verschiedenen Krebsformen (z.B. Kolon-Ca oder Mamma-Ca).

Träger einer prädisponierenden Mutation haben ein *erhöhtes* Risiko, an einer Krankheit zu erkranken. Eine verstärkte Kontrolle und Vorsorge ist dann ebenso angezeigt wie der Verzicht auf weitere vermeidbare Risikofaktoren.

Bei vielen weiteren Erkrankungen ist die Suche nach prädisponierenden (oder verursachenden) genetischen Faktoren in vollem Gange, dazu gehören auch solche mit hoher Prävalenz (z.B. Adipositas, Bluthochdruck oder NIDDM). Fast täglich werden Ergebnisse neuer Kopplungs- und Assoziationsstudien vorgelegt, Gene und Mutationen identifiziert und so vielleicht schon bald der humangenetischen Untersuchung und Risikoevaluation zugänglich.

GLOSSAR

Allel

Zustand eines Genes (an einer bestimmten Stelle). Zum Beispiel trägt ein Mukoviszidose Patient auf dem einen Allel die Mutation delta F508, auf dem anderen Allel die Mutation R334W. Dies ist zugleich ein Beispiel für zusammengesetzte Heterozygotie.

Expressivität

Bezeichnet das Phänomen, das Anlageträger unterschiedlich starke klinische Symptome aufweisen.

homozygot/heterozygot/hemizygot/zusammengesetzt heterozygot

Befindet sich auf beiden Chromosomen eines Menschen an einer bestimmten Stelle die gleiche Information, spricht man von Homozygotie, ist die Information unterschiedlich von Heterozygotie. Im Sprachgebrauch bezeichnet man meist das Vorliegen von zwei gleichen Mutationen als homozygot, die entsprechend ‚normale‘ Information wird nicht betrachtet. Das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Mutationen bezeichnet man als sogenannte zusammengesetzte Heterozygotie (compound heterozygosity). Beim Sonderfall des X-Chromosoms beim Mann (hier gibt es nur eine Kopie, die stets von der Mutter stammt) spricht man von Hemizygotie, pathogene Mutationen führen dann zur phänotypischen Ausprägung (z.B. Bluterkrankheit). Entsprechendes gilt auch für das Y-Chromosom des Mannes.

Mikrosatellit (MS)

Abfolge einer kurzen Sequenz (meist 2 bis 6 Nukleotide, jeweils als ein Repeat bezeichnet), die vielfach wiederholt wird, also z.B. (GATA)₁₅. Charakteristisch für MS ist die starke Heterozygotie, das heißt, die meisten Menschen tragen auf ihren beiden Chromosomen unterschiedliche Repeatzahlen. Dies macht man sich bei Abstammungsgutachten zunutze (und auch in der Forensik). Während die Repeatzahlen der meisten MS keine bekannte funktionelle Auswirkung haben, sind diese bei den Sonderformen der Tripletrepeatkrankungen (z.B. Polyglutaminerkrankungen wie die Huntington-Krankheit) oder dem Martin-Bell-Syndrom von entscheidender Bedeutung.

Mutation

Veränderung der genetischen Information, bezeichnet im Sprachgebrauch meist das pathologische Allel (z.B. delta F508, das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin 508), das andere Allel (F508) wird als normal oder wildtypisch bezeichnet. Mutationen können an unterschiedlichen Stellen eines Gens auftreten und zu verschiedenen funktionellen Veränderungen eines Proteins führen (z.B. veränderte Aminosäuresequenz, veränderter Expressionssort oder -zeitpunkt).

PCR

Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction), ermöglicht die spezifische Vervielfältigung (Amplifikation) definierter DNA-Abschnitte, um diese dann weiter zu untersuchen. Ausgehend von zwei kurzen Oligonukleotiden (sog. Primern) und einer Vorlage (template-DNA, z.B. Patienten-DNA) wird die dazwischen liegende DNA amplifiziert. Das entstandene Produkt kann

- elektrophoretisch aufgetrennt und so seine exakte Länge untersucht werden (z.B. bei Repeatkrankheiten wird von der Länge auf die Anzahl der dazwischenliegenden Tripletwiederholungen geschlossen)
- einem sog. Verdau mit Restriktionsenzymen (DNA-Scheren) unterworfen werden zum Nachweis einer bestimmten und bekannten Mutation, die die Schnittstelle für ein solches Enzym zerstört oder neu schafft (vergl. Restriktionslängenpolymorphismus, RFLP). Durch elektrophoretische Auftrennung und Größenbestimmung des so verdauten PCR-Produktes schließt man auf das Vorliegen (oder die Abwesenheit) einer Mutation.
- sequenziert werden zur Bestimmung der exakten Abfolge der Nukleotide dieses DNA-Abschnitts.

Die PCR ermöglicht die milliardenfache Vervielfältigung des betreffenden DNA-Abschnitts, weil mit den Primern mehrfach vom gleichen „template“ und schon ab der zweiten Runde auch vom PCR-Produkt der vorangegangenen Runde(n) kopiert werden kann. Es ist daher möglich, selbst aus sehr geringen Mengen an vorhandener DNA die für eine Untersuchung erforderlichen Mengen an PCR-Produkt zu gewinnen.

Penetranz

Bezeichnet das Phänomen, das nicht alle Anlageträger klinische Symptome aufweisen (reduzierte Penetranz).

Polymorphismus

Verschiedengestaltigkeit, hier: Unterschiede in der DNA Sequenz, die i.d.R. nicht klinisch manifest sind. Je nach Populationshäufigkeit spricht man von Polymorphismus oder Variante.

Restriktionsenzyme

Enzyme, die eine bestimmte kurze Abfolge (meist 4 bis 8 Nukleotide) erkennen und spezifisch die DNA schneiden. Die erkannten Sequenzen sind oft palindromisch, das heißt, die Sequenz lautet von links nach rechts und von rechts nach links gelesen (im komplementären Strang) gleich, z.B. *GAATTC*. Restriktionsenzyme tragen ihren Namen nach dem Organismus, aus dem sie stammen, so ist z.B. *Eco RI* das erste gefundene Restriktionsenzym aus *Escherichia coli*. Für einige Mutationen gibt es Restriktionsenzyme, deren Schnittstelle durch eben diese Mutation verändert (zerstört oder kreiert) wird, so daß ein diagnostischer Test auf das Vorliegen der Mutation möglich ist (vergl. z. B. Hämochromatose). Man spricht dann von einem Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP).

Sequenzierung

Bestimmung der exakten Abfolge der Basen (Nukleotide) eines DNA-Moleküls. Diese von Sanger entwickelte Methode basiert darauf, dass ausgehend von einem kurzen Oligonukleotid (Primer, meist 18 – 25 Nukleotide lang) eine DNA-Polymerase dieses Molekül gemäß der Vorlage (template, hier meist Patienten-DNA) verlängert. Bei vier parallelen Ansätzen (für die Nukleotide G, A, T und C) werden jeweils in geringen Mengen modifizierte Nukleotide beigemischt, die nicht mehr verlängert werden können – es kommt zum Kettenabbruch. Die so entstandenen Moleküle werden der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und die Sequenz daraus abgeleitet.

Spezifität

Gibt an, wie häufig bei Gesunden keine falsch positiven Ergebnisse detektiert werden, errechnet sich aus der Anzahl der richtig negativen geteilt durch die Gesamtzahl der Untersuchungen an Gesunden. In der molekulargenetischen Diagnostik tendiert der Wert gegen 1 (100%), die Spezifität ist extrem hoch.

Sensitivität

Gibt an, wie häufig Positive tatsächlich erkannt werden Die Sensitivität errechnet sich aus der Anzahl der richtig Positiven geteilt durch die Gesamtzahl der Positiven, die mit anderen Untersuchungsmethoden detektiert werden. Die genetische Sensitivität gibt an, wie häufig bei Patienten mit klinisch eindeutigen Symptomen eine Mutation (resp. zwei) gefunden wird. Abhängig u.a. von:

- Untersuchungsmethode (z.B. bei SSCP 70-90%, sequenzieren nahezu 100%),
- klinische Homogenität,
- genetische Homogenität,
- Untersuchungsumfang (wie viele Exons/Mutationen wurden getestet)
- genetische Herkunft des Patienten (das Vorkommen einzelner Mutationen kann sehr unterschiedlich sein. Zum einen erhöht sich die Sensitivität, wenn eine in einer bestimmten Bevölkerungsgruppe besonders häufige Mutation zusätzlich untersucht wird, zum anderen ist der Wert der Aussage, keine Mutation gefunden zu haben abhängig von den untersuchten Mutationen und deren Häufigkeit).

PROBENVERSAND

⌘ Für eine **molekulargenetische** Untersuchung benötigen wir:

5 - 10 ml EDTA-Blut

das mit der normalen Post ohne Kühlung versandt werden kann.

⌘ Für die **chromosomale Untersuchung** von Lymphozyten benötigen wir

5 - 10 ml heparinisiertes Blut

⌘ Für **Fruchtwasseruntersuchungen** benötigen wir

10 - 20 ml Fruchtwasser

⌘ Für Untersuchungen an **Chorionzotten**, **Fibroblasten** oder **Abortmaterial** benötigen wir mindestens

20 - 30 mg Material

das in speziellem Medium transportiert werden sollte. Entsprechend befüllte Röhrchen können bei uns angefordert werden. Da eine Zellkultur angelegt werden muss, sollte der Versand ohne Verzögerung erfolgen.

Auf Anfrage erhalten Sie gerne Anforderungsformulare und Versandmaterial zugeschickt.

ABRECHNUNG

Molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen sind nicht budgetierte Leistungen (EBM). Die Abrechnung kann mittels Überweisungsschein Nr. 10 oder auf Rechnung erfolgen. Ein klarer Untersuchungsauftrag ist notwendig.

HUMANGENETISCHE BERATUNG

Vor einer genetischen Untersuchung muss mit dem Patienten ein ausführliches und individuelles Beratungsgespräch durchgeführt werden, das über die möglichen Folgen und Konsequenzen der Untersuchung und deren Ergebnis informiert. In einem humangenetischen Beratungsgespräch werden u.a. Hilfestellungen für die individuellen Entscheidungen im Umgang mit einer genetischen Erkrankung gegeben, Handlungsoptionen für die Lebens- und Familienplanung aufgezeigt, auf die Freiwilligkeit der Untersuchung (Recht auf Nichtwissen) hingewiesen und das Risiko für das erneute Auftreten innerhalb der Familie (genetisches Risiko) beurteilt. Eine prädiktive (präsymptomatische) Diagnostik bei nicht-therapierbaren Erkrankungen ist nur nach einer ausführlichen Beratung möglich.

ABSTAMMUNGSUNTERSUCHUNGEN

Abstammungsanalysen verwenden die Genotypisierung mittels Mikrosatelliten (siehe Glossar). Diese Marker haben den Vorteil, dass die meisten Menschen heterozygot für die Allele dieser Marker sind. Da die Anzahl der verschiedenen möglichen Allele bei den ausgewählten Markern meist zwischen 10 und 15 liegt, lassen sich Abstammungsverhältnisse statistisch gut absichern. Bei der Untersuchung werden mehrere dieser MS-Marker vergleichend zwischen den fraglichen Personen analysiert. Eine falsche Abstammung kann dabei eindeutig nachgewiesen werden, eine tatsächliche Abstammung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99,99% bestätigt werden.

Unser Labor ist für diese Untersuchung nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert, die Gutachten werden somit nach den Richtlinien der Bundesärztekammer und unter Einhaltung des Gendiagnostikgesetzes erstellt und sind gerichtsverwertbar.

Methode

Isolation der genomischen DNA, PCR-Amplifikation von MS-Markern, Allelbestimmung durch elektrophoretische Auftrennung, statistische Auswertung

Anmerkungen

Eine private DNA-Vaterschaftsuntersuchung wird üblicherweise aus Blut oder Mundschleimhautzellen von Vater, Mutter und Kind durchgeführt. Die Probenentnahme wird kostenfrei in unserer Praxis durchgeführt, oder auch bei einem Arzt Ihrer Wahl, dem wir vorab ein Probenentnahmeset zusenden.

Die Kosten für den Test müssen vom Auftraggeber übernommen werden, die Bearbeitungszeit beträgt maximal zehn Tage.

NACKENTRANSPARENZ-MESSUNG UND MATERNALER SERUMSCREEN ZUR ERMITTLUNG DES DOWN-SYNDROM-RISIKOS

Die Messung der Nackentransparenz, kombiniert mit der biochemischen Bestimmung von PAPP-A und freiem β -HCG in einem akkreditierten Labor erlaubt die pränatale Bestimmung des Risikos für ein Kind mit Down-Syndrom. Durchgeführt zwischen der SSW 11+0 und 13+6 (SSL zwischen 46 und 84 mm), erreicht diese nicht-invasive Untersuchung die Entdeckung von bis zu 90% betroffener Feten. Die Berechnung des individuellen Risikos erfolgt gemäß den Vorgaben der Fetal Medicine Foundation (FMF) Deutschland und unter Verwendung der Daten von Prof. K. Nikolaidis.

Die Evaluation des individuellen Risikos und die Beratung der Patientin über möglichen Konsequenzen kann in unserer Praxis durchgeführt werden. Im Bedarfsfall kann sofort eine Chorionzottenbiopsie durchgeführt werden, das Ergebnis der Schnellkaryotypisierung liegt dann bereits am nächsten Tag vor.

Die Untersuchung ist nicht Teil der Leistungspflicht der gesetzlichen Krankenversicherung, so dass die anfallenden Kosten vom Patienten selbst übernommen werden müssen. Eine entsprechende Übernahmeerklärung (Behandlungsvertrag) kann bei uns angefordert werden.

Methode

Bestimmung des freien β -HCG und PAPP-A aus dem Serum der Mutter. Biostatistische Berechnung des Trisomie-Risikos.

Anmerkung zum Probenversand

Eine Blutprobe muss innerhalb von 2 Stunden, eine Serumprobe innerhalb von 48 Stunden gemessen werden, um valide zu sein. Eine besondere Kühlung ist in der Regel nicht erforderlich, die Proben sind aber möglichst vor Hitze zu schützen.

CHROMOSOMENANALYSE

Die chromosomale Analyse von Geweben dient der Erkennung von numerischen und strukturellen Aberrationen des Chromosomensatzes.

Numerische Aberrationen können den ganzen Chromosomensatz betreffen (Polyploidie) oder die Abweichung um ein einzelnes Chromosom bedeuten (Aneuploidien). Polyploidien wie beispielsweise die **Triploidie** (dreifacher Chromosomensatz) werden meist nur bei spontanen Frühaborten gefunden, da die Feten nur selten die Geburtsreife erreichen. Aneuploidien dagegen sind von größerer klinischer Bedeutung.

Relativ häufig ist die Vermehrung des Chromosomensatzes um die Chromosomen 21, 18 und 13 (**Trisomie**). Die Betroffenen zeigen typische Symptome wie psychomotorische Retardierung, Organfehlbildungen und faciale Dismorphien, die als **Down-**, **Edwards-** bzw. **Patau-Syndrom** beschrieben sind. Die Lebenserwartung ist meist stark herabgesetzt. Eine Trisomie der Gonosomen äußert sich entweder als **Klinefelter-Syndrom** (Karyotyp 47,XXY) mit Hochwuchs, Gynäkomastie und hypoplastischem männlichem Genitale, oder als **Triplo-X-Syndrom** (47,XXX) mit nur geringen erkennbaren Symptomen.

Von klinischer Bedeutung ist auch der Karyotyp 45,X, der sich als **Turner-Syndrom** mit Kleinwuchs, Pterygium colli und fehlenden sekundären Geschlechtsmerkmalen bei weiblichem Genital äußert. Alle anderen Verminderungen des Chromosomensatzes um ein Chromosom (**Monosomie**) sind nicht lebensfähig.

Als strukturelle Aberrationen bezeichnet man alle Veränderungen, bei denen Rearrangements zu Strukturveränderungen eines oder mehrerer Chromosomen geführt haben, z. B. durch Deletion, Translokation oder Inversion.

Eine **Deletion** bezeichnet den Verlust von genetischem Material durch ein Bruchereignis. Die Symptome sind im wesentlichen von der Größe und dem genetischen Gehalt des verlorenen Segments abhängig. Meist handelt es sich bei Deletionen um Neumutationen; das deletierte Chromosom kann aber auch Folge einer balancierten Translokation eines Elternteils sein.

Bei einer **Translokation** wird ein Chromosomenteil auf ein anderes nicht homologes Chromosom übertragen, wobei meist kein genetisches Material verloren geht (balancierte Translokation). Daher sind die Betroffenen phänotypisch unauffällig, es besteht aber ein Risiko von etwa 10%, dass es zu Ungleichverteilungen bei der Keimzellbildung kommt.

Bei einer **Inversion**, einem Bruchereignis in einem Chromosom mit um 180° gedrehtem Wiedereinbau, geht ebenfalls kein genetisches Material verloren. Aber auch hier können bei der Keimzellreifung unbalancierte Gameten entstehen.

Die Chromosomenanalyse kann aus verschiedenen Geweben des Körpers erfolgen. Grundsätzlich werden dabei vitale Zellen kultiviert und anschließend die Zellen während der Zellteilung in der Metaphase arretiert, so dass die Chromosomen nach spezieller Anfärbung analysiert werden können. Von klinischer Bedeutung sind vor allem folgende Gewebe:

Lymphozytenkulturen können aus peripherem Venenblut oder - im Rahmen der Pränataldiagnostik - aus Nabelschnurblut angesetzt werden. Diese Kulturen wachsen im Allgemeinen 72 Stunden, wobei die Zellteilung mit Hilfe von Phytohämagglutinin induziert wird.

Chorionzotengewebe kann aufgrund seiner spontanen Proliferationsrate bereits nach einer Kurzzeitkultur von einem Tag analysiert werden. Aussagen über strukturelle Aberrationen können allerdings erst nach Langzeitkultur getroffen werden.

Fruchtwasserzellen müssen für eine Karyotypisierung zunächst in Kultur genommen werden. Sie wachsen in Zellkulturgefäßen klonal und können nach ein bis zwei Wochen Wachstum analysiert werden.

Auch aus **Abortmaterial** (Plazenta, embryonales Material) und durch Hautbiopsie gewonnenen **Fibroblasten** kann nach Langzeitkultivierung eine Chromosomenanalyse durchgeführt werden.

PRÄNATALER SCHNELLTEST AUF ZAHLENMÄSSIGE ABWEICHUNGEN DER CHROMOSOMEN 13, 18, 21, X UND Y

Der pränatale DNA-Schnelltest dient der raschen Erfassung der häufigsten chromosomalen zahlenmäßigen Abweichungen, die zu Behinderungen oder Fehlbildungen führen. Bei dieser Untersuchung werden die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y auf die Anzahl ihrer Kopien untersucht, die Ergebnisse liegen i.d.R. nach einem Tag vor. Auf das Ergebnis der ausführlichen Karyotypisierung muss dann etwa zwei Wochen gewartet werden.

Für den DNA-Schnelltest wird aus Fruchtwasser oder Chorionzotten das genetische Material isoliert und mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) an definierten Stellen (Mikrosatellitenmarkern) auf die Kopienzahl der jeweiligen Chromosomen hin analysiert. Durch Analyse einer größeren Zahl solcher Signalbilder lässt sich direkt auf die Anzahl der oben genannten Chromosomen schließen. Auch das Geschlecht des Kindes kann auf Wunsch mitgeteilt werden.