

Andreas Fritz
Dr. med.

Einführung der molekulargenetischen Diagnostik für das Fragile-X-Syndrom.

Geboren am 23.02.1967 in Backnang
Reifeprüfung am 11.06.1986 in Backnang
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1989 bis WS 1996
Physikum am 03.04.1991 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Durban, Südafrika (1. Tertial) und Bruchsal (2. und 3. Tertial)
Staatsexamen am 06.11.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F. Vogel

Das Fragile-X-Syndrom wird auch als Marker-X-Syndrom oder Martin-Bell-Syndrom bezeichnet und zählt mit einer Prävalenz von 1:4000 bei Männern und 1:6000 bei Frauen zu den häufigsten Ursachen genetisch bedingter mentaler Retardierung. Im Kindesalter fallen die männlichen Patienten weiterhin durch psychomotorische Entwicklungsretardierung und Verhaltensstörungen auf. Die typische klinische Trias, auch Martin-Bell-Phänotyp genannt, prägt sich meist erst postpubertär aus und umfaßt neben der mentalen Retardierung außerdem Makroorchidismus sowie faziale Dysplasien mit länglichem Gesicht mit prominenter Stirn und großen, abstehenden Ohren.

Bei cytogenetischen Untersuchungen fiel auf, daß unter bestimmten Kulturbedingungen auf dem X-Chromosom bei Xq27.3 eine fragile Stelle auftrat. Genaugenommen handelt es sich nicht um einen Chromosomenbruch, sondern um eine Stelle, wo durch eine veränderte Anordnung der Nukleosomen die Chromatinstruktur verändert und deshalb schlechter anfärbbar ist.

Mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden konnte eine Expansion der Trinukleotidsequenz (CGG)_n im ersten Exon des FMR-1-Gens entdeckt werden. Bei Personen, die nicht vom FXS betroffen sind, liegt ein Normalallel (S) vor, welches 6 bis 51 CGG-Wiederholungen umfaßt. Liegen 52 bis 200 CGG-Repeats vor, so spricht man von einer Prämutation (S*), die im Gegensatz zum Normalallel instabil ist und die zur Vollmutation (L) mit 200 bis mehr als 2.000 CGG-Repeats expandieren kann. Man spricht deshalb auch von „dynamischer Mutation“ oder „triplet repeat mutation“. Wahrscheinlich findet die Transition von der Prä- zur Vollmutation in einem frühen postzygotischen Stadium statt. Durch einen Imprinting-Mechanismus expandieren nur die Prämutationen, die vom mütterlichen X-Chromosom stammen. Vermutlich resultiert aus der CGG-Expansion die Methylierung einer CpG-Insel der Promotor-Region des FMR-1-Gens, wodurch die Transkription des Gens unterbunden wird. Dadurch entsteht ein Mangel an FMRP, das durch FMR-1 translatiert wird. Wahrscheinlich hat dieses Protein die Funktion, RNA zu binden und dieses vom Zellkern zu den Ribosomen zu transportieren. Vermutlich kommt es durch diesen Mangel an FMRP zu einem gestörten Aufbau von Synapsen und Dendriten der Nervenzellen in bestimmten Gehirnbezirken. Daraus könnten die mentale Retardierung sowie die neurologischen Defizite der Patienten resultieren.

Die klinische Diagnostik dieser Erkrankung ist äußerst schwierig zu stellen, da die Symptome inkonstant und sehr variabel auftreten. Dies trifft besonders für Frauen und Kinder zu, da die Symptome hier geringer ausgeprägt und unspezifischer sind. Bevor diese Arbeit aufgenommen wurde, konnte im Institut für Humangenetik nur die cytogenetische FXS-Diagnostik durchgeführt werden. Nachdem die Leukozyten in folsäurearmem Medium unter Zusatz von FUDR kultiviert wurden, konnten die fragilen Stellen im Karyogramm entdeckt werden. Diese Methode war sehr zeit- und arbeitsaufwendig und außerdem unzuverlässig. Besonders bei Frauen und bei Prämutationen konnten die Fragile-X-Chromosomen häufig nicht dargestellt werden, was zu falsch negativen Befunden führte. Andererseits traten die fragilen Stellen auch auf, wenn kein FXS vorlag.

Ziel dieser Arbeit war, am Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg eine einfache, sichere und kostengünstige molekulargenetische Diagnostik für das Fragile-X-Syndrom einzuführen. Es wurde ein PCR-Protokoll entwickelt, mit dem männliche Patienten, die nicht vom FXS betroffen sind, erkannt werden können. Dies funktioniert auch bei Patientinnen, deren beide Allele eine ausreichend unterschiedliche Anzahl von CGG-Repeats aufweisen. Anschließend werden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt, was entweder mittels Agarosegel oder Polyacrylamidgel erfolgen kann. Die DNA wird durch Ethidiumbromid, bzw. durch Silberionen angefärbt. Nachdem die Gele fotografiert wurden, kann die Länge der Fragmente graphisch ermittelt werden, woraus sich die Diagnose ableiten läßt. Mit dieser Methode gelingt die Diagnostik eines Großteils der Patienten.

Die anderen Fälle werden einer Southern-Blot-Analyse unterzogen, die zwar teurer und zeitaufwendiger als die PCR, für eine sichere Diagnostik jedoch unumgänglich ist. Bei männlichen Patienten reicht dabei der Einzelverdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym Eco RI. Bei Frauen wird ein Doppelverdau durchgeführt, wobei zusätzlich das methylierungssensitive Enzym Ecl XI verwendet wird. Dieser Doppelverdau eignet sich besonders für die Identifizierung von Prämutationen. Soll eine genaue Fragmentlängenbestimmung der Prämutation erfolgen, empfiehlt sich ein Verdau mit dem Restriktionsenzym Pst I. Die verdaute DNA wird mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert, anschließend werden die DNA-Fragmente mittels Southern-Blot an eine Nylonmembran fixiert. Eine radioaktiv markierte DNA-Sonde hybridisiert an das betreffende DNA-Fragment. Nach Autoradiographie kann die Fragmentlängenanalyse erfolgen, woraus sich die Diagnose ableitet. Bei männlichen Probanden erwartet man nach Eco RI-Verdau bei einem Normalallel ein Fragment von 5,2 kb. Bei Patientinnen findet man nach dem Doppelverdau eine Bande bei 2,8 kb, die dem Allel auf dem aktiven X-Chromosom entspricht sowie eine Bande bei 5,2 kb, die das Allel des inaktiven X-Chromosoms repräsentiert. Vollmutationen erkennt man an der Expansion von mindestens 600 Bp. Wurde ein Doppelverdau durchgeführt, fällt zusätzlich die Methylierung der Vollmutation auf. Prämutationen sind unmethyliert und weisen eine kleinere CGG-Expansion auf.

Weitergehende Experimente, die auf den Nachweis von Vollmutationen mittels PCR oder auf die alleinige FXS-Diagnostik mittels Nested PCR abzielten, wurden abgebrochen, da sich zeigte, daß dadurch die Gefahr von falsch negativen Befunden bestanden hätte.

Mit diesem diagnostischen Konzept wird fast immer auf die cytogenetische FXS-Diagnostik verzichtet werden können. Dies gilt jedoch nicht für die konstitutionelle Chromosomenanalyse, die bei jedem Patienten mit mentaler Retardierung, Entwicklungsverzögerung oder körperlichen Dysplasien durchgeführt werden sollte, um andere chromosomale Ursachen diese Symptome nicht zu übersehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 152 Patienten untersucht, von denen 99 Patienten sowohl cytogenetisch als auch molekulargenetisch getestet wurden. Insgesamt konnten innerhalb dieser Studie 14 FXS-Vollmutationen sowie eine Prämutation aufgedeckt werden. Bei 96 Patienten waren die cytogenetischen und die molekulargenetischen Ergebnisse konkordant. Bei einer Patientin konnte mittels Southern-Blot-Analyse eine Prämutation nachgewiesen werden, die im cytogenetischen Test unerkant blieb und bei den verbleibenden zwei Fällen konnte die eindeutige Diagnose nur mit molekulargenetischen Methoden gestellt werden.

Bei über 90% der untersuchten Personen konnte der Verdacht auf ein FXS nicht bestätigt werden. Die Indikation zur FXS-Diagnostik wurde von den überweisenden Ärzten offensichtlich großzügig gehandhabt. Eine genaue Analyse der klinischen Merkmale der Patienten ergab, daß in vielen Fällen Symptome, die ganz untypisch für ein FXS wären, vorgelegen hatten. Daraufhin wurde eine Checkliste erarbeitet, die allerdings einer ausgiebigen klinischen Prüfung bedarf, bevor sie als Instrument der klinischen FXS-Diagnostik eingesetzt werden könnte. Mit dieser Checkliste könnte ein Fragile-X-Score ermittelt werden, womit die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines FXS abgeschätzt werden könnte.