

Silke Christiane Nuß
Dr. med.

Anwendung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung auf direkt präparierten Amnionzellen zur Pränataldiagnostik
Der Einfluß von technischen Bedingungen und einer mütterlichen Kontamination auf die Hybridisierungsergebnisse

Geboren am 24.12.1969 in Neckarbischofsheim
Reifeprüfung am 25.04.1989 in Neckarbischofsheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90 bis SS 1997
Physikum am 05.09.1991 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg und Coimbra, Portugal
Praktisches Jahr in Porto Alegre, Brasilien und Mannheim
Staatsexamen am 28.05.97 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. C.-R. Bartram

Das Thema dieser Arbeit ist die Anwendung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) auf direkt präparierten Amnionzellen als ergänzende Untersuchungsmethode zur Pränataldiagnostik. Direkt präpariert bedeutet, daß die Amnionzellen am Tag der Amniozentese, ohne über eine Kultur zur Teilung angeregt, bearbeitet werden. Die Chromosomen werden mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden markiert. Als markierte Hybride können den Chromosomen fluoreszenzoptische Stoffe angelagert werden, die es ermöglichen, die Chromosomen als Signale im Fluoreszenzmikroskop auszuwerten. Anhand der Signalauswertung ist eine pränatale Untersuchung auf fetale Chromosomenaberrationen innerhalb von zwei Tagen unter geringem Aufwand möglich. Im Vergleich dazu werden für eine zytogenetische Untersuchung in der Regel zwei Wochen benötigt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Protokoll so zu verbessern, daß gute reproduzierbare Ergebnisse erzielt und über Indikationen der FISH zur Pränataldiagnostik nachgedacht werden konnte. Zum Nachweis der lebensfähigen numerischen Chromosomenaberrationen (Trisomie 13, 18, 21 und gonosomale Aberrationen) setzten wir repetitive DNA-Sonden aus den Zentromerregionen der Chromosomen 18 (L1.84), 13 und 21 (L1.26), X (pXBR) und Y (pYZ2.1) ein. Durch Veränderungen der Fixierungstechnik, der Kernmembranbehandlung und der Hybridisierungstechnik wurden die Hybridisierungsergebnisse verbessert. Eine Verbesserung bezieht sich dabei auf die Materialerhaltung, die deutliche Darstellung der Kern- und Signalstrukturen, der Senkung von Neben- und Hintergrundvalenzen und damit der Erhöhung der Hybridisierungseffizienz (prozentualer Anteil der Kerne, die die richtige Anzahl an Signalen aufweisen). Die Ergebnisse der FISH mit repetitiven DNA-Sonden werden photographisch an Interphasepräparaten direkt präparierter Amnionzellen dokumentiert. Die Besonderheit dieser Arbeit zeigt sich darin, daß eine mütterliche Kontamination bei der Untersuchung von direkt präparierten Amnionzellen erkannt wurde. Eine mütterliche Kontamination beeinflußt die Hybridisierungsergebnisse erheblich. Je mehr mütterliche Zellen im Fruchtwasserpunktat vorhanden sind, desto mehr Signale, die dem mütterlichen Karyotyp 46,XX entsprechen, treten bei den Auswertungen auf. Dadurch sinkt

bei einer statistischen Auswertung von Fällen, in denen der fetale vom mütterlichen Karyotyp differiert, der prozentuale Anteil der fetalen Signalkonstellation. Die Hybridisierungseffizienz wird dadurch scheinbar verringert. Bei einem hohen Anteil von mütterlichen Zellen im Fruchtwasserpunktat (in unseren Untersuchungen bis zu 80%) besteht damit das Risiko, einen pathologischen Befund nicht zu erkennen. Bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurde erkannt, daß fetale von mütterlichen Kernen aufgrund ihrer Morphologie unterschieden werden können. Mütterliche Kerne haben eine unregelmäßige inhomogene Struktur und fetale Kerne eine runde homogene Struktur. Die morphologische Unterscheidung ermöglichte eine differenzierte Auswertung, d.h. eine Auswertung nur der fetalen Kerne durchzuführen. An Interphasepräparaten einer fetalen Triploidie führten wir exemplarisch eine differenzierte Auswertung durch. Die unregelmäßig geformten Kerne repräsentierten dabei zu 93% den mütterlichen, die runden Kerne zu 94% den fetalen Karyotyp. Die Hybridisierungseffizienz erhöhte sich von 48.2% bei der Auswertung aller Kerne auf 71.7% bei der differenzierten Auswertung. Der Prozentsatz von Kernen mit der unzutreffenden disomen Signalanzahl reduzierte sich von 31% auf 5%. Ohne Einbeziehung der nicht identifizierbaren Kerne, die bei einer Diagnosestellung nicht berücksichtigt würden, erhöhte sich die Hybridisierungseffizienz von 60.6% bei der Auswertung aller Kerne auf 93.8% bei der differenzierten Auswertung. Durch die Möglichkeit der differenzierten Auswertung konnten in unsere Untersuchungen auch Interphasepräparate einbezogen werden, die ein hohes Maß an mütterlichen Zellen enthielten und mußten nicht, wie von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen wurde, von der Untersuchung ausgeschlossen werden.

In Untersuchungen, bei denen wir die Lage der Plazenta unter Amniozentese mit dem Kontaminationsgrad der Interphasepräparate verglichen haben, zeigte sich, daß die mütterliche Kontamination von der Lage der Plazenta bei der Amniozentese beeinflußt wird. Punktionsbedingt war die Kontamination bei Vorderwandplazenten höher ($87\% \geq 20\%$ Kontamination) als bei Hinterwandplazenten ($91\% \leq 20\%$ Kontamination) und kann damit als Artefakt nicht ausgeschlossen werden. Bei der Auswertung von 390 Interphasepräparaten durch mehrere Personen wurde zudem deutlich, daß die Beurteilung der Kernmorphologie subjektiv bleibt und erfahrungsabhängig ist. Es muß demnach eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die mütterlichen Kerne optisch zu markieren bzw. zu eliminieren, bevor eine Hybridisierung durchgeführt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch eine differenzierte Auswertung eine Triploidie und ein Turner-Syndrom trotz einer hohen Kontamination der Interphasepräparate im Vorfeld einer zytogenetischen Karyotypisierung sicher diagnostiziert und anschließend von dieser bestätigt werden.

In dieser Arbeit wird der Stellenwert der FISH auf direkt präparierten Amnionzellen als schnelles und einfaches Verfahren besprochen und mit den zur Verfügung stehenden und zu neuen diagnostischen Verfahren in der Pränataldiagnostik ausführlich verglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden besonders im Hinblick auf die mütterliche Kontamination mit den Veröffentlichungen von Arbeitsgruppen, die auf dem gleichen Gebiet arbeiteten, diskutiert. Chancen einer Einführung der FISH in die Pränataldiagnostik liegen bei auffälligen Sonographiebefunden, die in ihrer Gesamtheit auf eine bestimmte Chromosomenstörung hinweisen (z.B. Herzfehler und Gesichtsdysmorphien bei Trisomie 21), bei geschlechtsgebundenen Erkrankungen (z.B. M. Duchenne), wo vor einer weiterführenden Diagnostik das Geschlecht bestimmt werden muß, oder in Familien mit bekannten Risiken (z.B. Aniridie), wo spezifische Sonden ganz gezielt zum Nachweis der Erkrankung bei belastender Familienanamnese eingesetzt werden können. Die aufgeführten potentiellen Einsatzmöglichkeiten müssen selbstverständlich in gut vorbereiteten Studien auf ihre Durchführbarkeit und klinische Relevanz getestet werden.