Leitlinien zur Molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose

Berufsverband Medizinische Genetik e.V. [1]

Vorwort

Die Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose basieren auf den von Martin Schwarz, Manchester, erarbeiteten „Molecular Genetics Service Guidelines“ der Clinical Molecular Genetics Society (Januar 1997) und wurden den Gegebenheiten in der Bundesrepublik Deutschland angepaßt. Sie sind als Ergänzung zu den Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik des Berufsverbandes Medizinische Genetik (1996) gedacht und wurden von den Teilnehmern des Workshops „Molekulargenetische Diagnostik der Cystischen Fibrose“, der vom 29.9.97 bis 02.10.97 im Rahmen der Qualitätssicherung des Berufsverbandes Medizinische Genetik und der European Community Concerted Action for Cystic Fibrosis (ECCACF) in Hannover durchgeführt wurde, verabschiedet. Bei jeder molekulargenetischen Untersuchung müssen die Leitlinien des Berufsverbandes Medizinische Genetik beachtet werden, insbesondere auch das Junktim zwischen molekulargenetischer Diagnostik und genetischer Beratung.

1. Einführung

Weltweit sind bisher mehr als 700 Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) – Gen beschrieben (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, siehe Internetadresse), doch da viele dieser Mutationen nur in einzelnen Familien beobachtet wurden, und da in vielen Fällen eine krankheitsverursachende Wirkung nicht sicher ist, sind die meisten dieser Mutationen für die molekulargenetische Diagnostik irrelevant. Bei deutschen Betroffenen einer Cystischen Fibrose (CF) sind bisher ca. 100 verschiedene Mutationen im CFTR-Gen beobachtet worden, und nur sieben Mutationen erreichen eine Häufigkeit von 1 % oder mehr. Es ist nicht möglich, das Vorhandensein einer CF mittels einer molekulargenetischen Untersuchung auszuschließen, und das weitere Vorgehen ist problematisch, wenn ein Patient mit der Verdachtsdiagnose CF keine oder nur eine der häufigen Mutationen trägt. In den meisten Fällen kann jedoch die Diagnose (oder sogar Verdachtsdiagnose) Cystische Fibrose molekulargenetisch bestätigt werden: Der Nachweis von Mutationen auf beiden CFTR-Allelen bestätigt die Diagnose CF.

2. Teststrategie

2.1 Betroffener einer CF

In den meisten Fällen handelt es sich bei dem Indexfall um den Betroffenen einer CF. Der Umfang der Untersuchung hängt wesentlich von den personellen und technischen Möglichkeiten des Testlabors ab. Die erste Mutation, die untersucht werden sollte, ist die Mutation DF508, da es sich hierbei um die mit Abstand häufigste Mutation in Deutschland handelt (Tab 1).

Die kostengünstigste Möglichkeit zum Testen der Mutation DF508 besteht in der Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eines Abschnittes des Exons 10 des CFTR-Gens mit anschließender Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) (Rommens et al., 1990; Stuhrmann et al., 1991). Bei diesem Verfahren wird ein 98 bp großes PCR-Fragment erzeugt (95 bp im Falle der beiden Mutationen DF508 oder DI507; 96 bp im Falle der Mutation 1677delTA). Bei dieser Methode können also nicht nur die Mutation DF508, sondern auch noch andere Deletionen oder Insertionen in diesem Abschnitt vom Exon 10 des CFTR-Gens nachgewiesen werden. Darüberhinaus kann über Unterschiede in der Heteroduplexbildung auch zwischen den Mutationen DF508 und DI507 unterschieden werden. Die Methode ist besonders auch im Rahmen der Pränataldiagnostik (siehe dort) zu empfehlen. Zum spezifischen Nachweis der Mutation DF508 stehen darüberhinaus noch weitere Verfahren wie die Allel-spezifische Oligonukleotid (ASO) - Hybridisierung (Kerem et al., 1989) oder Allel-spezifische PCR (ASP) - Techniken (Ballabio et al., 1990; Wagner et al., 1990) zur Verfügung. Bei etwas mehr als der Hälfte aller deutschen Betroffenen einer CF liegt Homozygotie für die Mutation DF508 vor, und die Diagnose kann mit einem einzigen einfachen Test bestätigt werden. Die meisten anderen Betroffenen einer CF sind heterozygot für die Mutation DF508, und nur ca. 6 % der deutschen Betroffenen einer CF tragen die Mutation DF508 überhaupt nicht.

Neben den in der Tabelle 1 genannten Mutationen, die jeweils auf mindestens 1 % der CF-Chromosomen deutscher CF-Patienten detektiert werden, kommen auch noch andere Mutationen wie 1717-1G→A (ca. 0,9 %), 2789+5G→A (ca. 0,9 %), 3272-26A→G (ca. 0,9 %), 2143delT (ca. 0,7 %), W1282X (0,7%) relativ häufig vor. Die genannten Frequenzen sind sicherlich in den verschiedenen Regionen der Bundesrepublik Deutschlands unterschiedlich, und in mancher Gegend können andere, hier nicht genannte Mutationen, möglicherweise so häufig sein, daß solche regional häufigen Mutationen sinnvollerweise in die Diagnostik einbezogen werden sollten.

Das Testen der non-DF508-Mutationen kann mittels einer Vielzahl von Methoden erfolgen. Neben „hausgemachten“ Methoden wie PCR und Restriktionsverdau, ASO oder ASP für weitere Mutationen, SSCP oder DGGE (siehe unten), oder direkter Sequenzierung, stehen inzwischen auch eine Vielzahl kommerziell erhältlicher „Diagnostik-Kits“ zur Verfügung. Diese Kits ermöglichen die simultane Detektion mehrerer Mutationen und basieren zumeist auf den Methoden der reversen-ASO-Hybridisierung (Cuppens et al., 1992), einer multiplen ASP, dem amplification refractory mutation system (ARMS) (Ferrie et al., 1992) oder dem Oligo-Ligations-Verfahren (Eggerding et al., 1995). Zu den einzelnen Testverfahren siehe Abschnitt 3.1. Es ist damit zu rechnen, daß in den nächsten Jahren noch weitere Testverfahren auf den Markt kommen, mit denen möglicherweise noch mehr verschiedene Mutationen nachgewiesen werden können.

Die molekulargenetische Diagnostik sollte auf jeden Fall die in der Tabelle 1 aufgeführten Mutationen beinhalten. Labors, in denen nicht alle der genannten Mutationen getestet werden können, sollten gegebenfalls DNA-Proben an andere Labors zur Fortführung der Diagnostik weiterleiten. Darüberhinaus hat es sich bewährt, daß DNA-Proben, bei denen trotz der Untersuchung aller in Tabelle 1 genannten Mutationen (sowie gegebenenfalls weiterer häufiger Mutationen) keine vollständige Identifizierung des

Tab 1
Die Verteilung der CFTR-Mutationen in der deutschen Bevölkerung

Mutation	Exon	N	(%)	non-ΔF508 (%)
ΔF508	10	938	(73,2)	---------
R347P	7	17	(1,3)	(4,9)
G542X	11	15	(1,2)	(4,4)
G551D	11	17	(1,3)	(4,9)
R553X	11	34	(2,7)	(9,9)
N1303K	21	16	(1,2)	(4,6)
3849+10Kb	19*	15	(1,2)	(4,4)
andere		230	(17,9)	(66,8)
non-ΔF508 gesamt		344	(26,8)	(100,0)
CF-Chrom. gesamt		1282		

* Die Mutation 3849+10KbC T liegt im Intron 19 des CFTR-Gens.

Die Daten wurden in Berlin, Hannover und Göttingen erhoben; die Patienten stammen aus dem gesamten Bundesgebiet (Tabelle aus Will et al 1994). Aufgeführt ist der jeweilige Anteil (%) der Mutationen unter allen untersuchten 1282 CFTR-Allelen (zweite Spalte von rechts) und unter den 344 non-ΔF508-Allelen (rechte Spalte).

CFTR-Genotyps gelang, an andere, stärker spezialisierte Labors weitergegeben werden, wenn im eigenen Labor keine weiterführende Diagnostik möglich ist. Allerdings ist bedauerlicherweise festzustellen, daß es in Deutschland kein Referenzlabor gibt, in dem (außerhalb von Forschungsprojekten) letztendlich das gesamte CFTR-Gen auf Mutationen untersucht werden kann. Ein solches (oder mehrere solcher) Referenzlabor(s) (wie z. B. Manchester in England) würde(n) in vielen Fällen dazu beitragen können, die Diagnose CF gerade auch bei den eher untypischen Verläufen zu sichern. Werden mehr als die in der Tabelle 1 aufgeführten Mutationen untersucht, kann für eine Abschätzung der Häufigkeit der jeweiligen Mutationen in der deutschen Population die Arbeit von Dörk et al. (1994) herangezogen werden.

Die Untersuchung von Betroffenen aus anderen Populationen sollte sich an den Mutationen, die in den entsprechenden Populationen beobachtet werden, orientieren. Verläßliche Aussagen zu Mutationshäufigkeiten in anderen Populationen finden sich in zahlreichen Publikationen. Einen (teilweise unvollständigen) Überblick liefern auch die Arbeiten des Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortiums (1994) und (für einige europäische Populationen) von Estivill et al. (1997). Zu letzterer Arbeit sei angemerkt, daß (zumindest in der dort beschriebenen deutschen Population) die selteneren Mutationen teilweise stark unterrepräsentiert sind.

2.1.1 Eltern eines Betroffenen

Es ist ratsam, die Eltern der Betroffenen ebenfalls zu untersuchen, um die Anwesenheit der beim Betroffenen nachgewiesenen Mutationen bei beiden Eltern zu bestätigen. Das ist besonders wichtig im Falle zukünftiger vorgeburtlicher Untersuchungen in betroffenen Familien, da so die Möglichkeiten falscher Paternität oder Probenvertauschung ausgeschlossen werden können. Bei vermeintlicher Homozygotie des Betroffenen kann durch die Untersuchung der Eltern die (bisher zweimal berichtete) Möglichkeit einer uniparentalen Isodisomie ausgeschlossen werden. Bei vermeintlicher compound-Heterozygotie des Betroffenen kann durch die Untersuchung der Eltern nachgewiesen werden, daß wirklich compound-Heterozygotie (und nicht etwa ein Allel mit zwei Mutationen oder eine Neumutation beim Betroffenen) vorliegt. Der Nachweis der elterlichen Mutationen ermöglicht dann auch das Testen der entsprechenden Mutation bei weiteren Verwandten.

Manchmal ist es notwendig, den Genotyp eines verstorbenen Patienten zu identifizieren. In diesen Fällen erlaubt zumeist die Untersuchung der Eltern des Verstorbenen die Herleitung dessen Genotyps.

2.2 Patienten mit der Verdachtsdiagnose CF

Es ist nicht möglich, mittels einer molekulargenetischen Untersuchung die (Verdachts-) Diagnose einer CF auszuschließen. Kliniker sollten darauf hingewiesen werden, daß ein „Ausschlußtest“ nicht möglich ist, es sei denn, es handelt sich um das klinisch auffällige Geschwisterkind eines Betroffenen, bei dem beide Mutationen bekannt sind. Die Untersuchung klinisch nicht auffälliger minderjähriger Geschwister von Betroffenen ist in der Regel nicht indiziert und abzulehnen (siehe dazu auch die Leitlinie des Berufsverbandes Medizinische Genetik, 1996, sowie die Stellungnahme der Kommission für Öffentlichkeitsarbeit und ethische Fragen der Gesellschaft für Humangenetik, 1995). Es ist allerdings sinnvoll, bei allen Patienten mit der Verdachtsdiagnose CF durch eine molekulargenetische Untersuchung zu versuchen, die Diagnose zu bestätigen. Durch die Untersuchung der in der Tabelle 1 aufgeführten Mutationen können in Deutschland ca. 82 % der CFTR Mutationen entdeckt werden.
Häufige Symptome, die zur Verdachtsdiagnose CF führen können, stellen intrauterine Auffälligkeiten im Ultraschall (echogenic bowel oder Mekoniumileus) bei Feten, ein Mekoniumileus oder andere gastrointestinale Symptome bei Neugeborenen, Nasalpolypen im Kindesalter, disseminierte Bronchiektasien, chronische Pankreatitis, congenitale bilaterale Aplasie der Samenleiter (CBAVD, siehe unten) und anderes dar. Mitunter wird die Verdachtsdiagnose CF auch erst im späteren Erwachsenenalter gestellt. Auch wenn bei allen diesen Symptomen häufig Mutationen im CFTR-Gen als Krankheitsursache nachgewiesen werden konnten, findet sich oft ein anderes Mutationsspektrum als bei der typischen CF.
Es gibt (wie auch bei klinisch sicher Betroffenen) drei mögliche Testergebnisse:

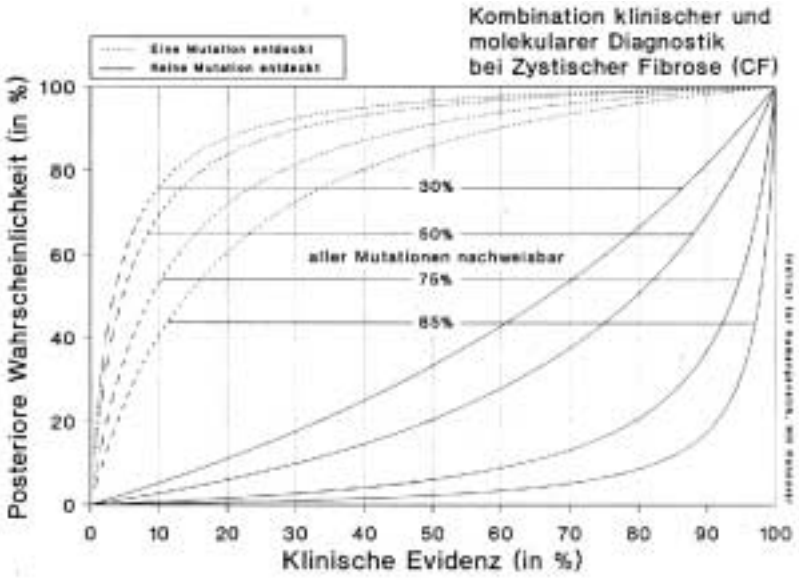

Abb 1
Kombination klinischer und molekularer Diagnostik bei CF
Die Graphik basiert auf der Anwendung des Bayes-Theorems. Sie ermöglicht die Abschätzung der posterioren Wahrscheinlichkeit für eine CF bei gegebener klinischer Evidenz für eine CF (apriori-Wahrscheinlichkeit) unter Berücksichtigung der Ergebnisse der molekularen Diagnostik
(Aus Stuhrmann et al 1995; mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages).

a) Identifizierung von zwei Mutationen (= CF)
b) Identifizierung einer Mutation
c) Identifizierung keiner Mutation

Sowohl in b), als auch in c) kann die Diagnose einer CF nicht ausgeschlossen werden. Ausgehend von der Wahrscheinlichkeit der klinischen Verdachtsdiagnose kann anhand des Ergebnisses der molekulargenetischen Untersuchung allerdings mitunter eine deutliche Präzisierung der posterioren Wahrscheinlichkeit für eine CF erfolgen. Die Abbildung 1 (aus Stuhrmann et al., 1995) ermöglicht die Abschätzung der posterioren Wahrscheinlichkeit auf einen Blick. Voraussetzung ist die Kenntnis der Häufigkeit der untersuchten Mutationen in der jeweiligen Population.

Auf jeden Fall sollte bei jeder Verdachtsdiagnose CF ein „Schweißtest“ veranlaßt werden, sobald der Patient alt genug ist (in der Regel ist ein solcher Test kaum vor der sechsten Lebenswoche durchführbar, oft auch erst noch später). Der „Schweißtest“ ist ein wichtigstes diagnostisches Kriterium der CF, auch wenn in sehr seltenen Fällen auch andere Erkrankungen zu einem positiven „Schweißtest“ führen, und auch wenn einige CF Mutationen, wie z. B. die auch in Deutschland beobachtete Mutation 3849+10KbC→T (Highsmith et al., 1994), mit einem normalen „Schweißtest“ einhergehen können.

2.3 Verwandte von Betroffenen einer CF

Die Erstellung eines genauen Stammbaums ist notwendig, bevor eine molekulargenetische Untersuchung bei Verwandten von Betroffenen einer CF durchgeführt wird (die Angabe „Onkel“ oder „Tante“ eines Betroffenen ist nicht ausreichend, da eine der beiden Personen offensichtlich blutsverwandt mit dem Betroffenen ist, die andere Person aber nicht). Wenn möglich, sollten die Mutationen des Betroffenen bekannt sein, da nur so der Ausschluß der Genträgerschaft beim ratsuchenden Verwandten erreicht werden kann. Der Partner des Verwandten, der zumeist die in der jeweiligen Population übliche Genträgerwahrscheinlichkeit hat, sollte ebenfalls in die Untersuchung einbezogen werden, da die Wahrscheinlichkeit für eine CF bei gemeinsamen Nachkommen durch die Untersuchung des Partners häufig stärker gesenkt werden kann als durch die Untersuchung des Verwandten. Bei der Mitteilung von Genträger- oder Erkrankungs-Wahrscheinlichkeiten sollten möglichst a priori und posteriore Wahrscheinlichkeitswerte angegeben werden.

2.4 Allgemeine Population

Die Untersuchung der in Tabelle 1 genannten Mutationen erlaubt die Reduzierung der Genträgerwahrscheinlichkeit auf unter 1 %. Die a priori Genträgerwahrscheinlichkeit ist die gleiche wie für Partner von Verwandten von Betroffenen (siehe 2.3) und liegt in der deutschen Population bei ca. 4 %. Je nach ethnischer Herkunft der Testperson kann dieser Wert großen Schwankungen unterliegen. Zur Testung von Personen aus der Allgemeinpopulation sei hier auch auf die Stellungnahmen des Berufsverbandes Medizinische Genetik (1990) und der Kommission für ôffentlichkeitsarbeit und ethische Fragen der Gesellschaft für Humangenetik (1991) zum „CF-Heterozygotenscreening“ verwiesen, in denen insbesondere auch auf die Notwendigkeit der Sicherstellung einer genetischen Beratung verwiesen wird. Eine besondere Problematik stellen auch die Untersuchungen miteinander verwandter Partner dar (Pander und Schwinger, 1994). Hier gilt letztendlich die gleiche Schlußfolgerung wie auch für alle Personen aus der Allgemeinbevölkerung: wer aus freien Stücken im Rahmen einer genetischen Beratung um die Durchführung einer molekulargenetischen CF-Diagnostik bittet, dem kann sie nicht verwehrt werden.

2.5 Congenitale bilaterale Aplasie der Samenleiter (CBAVD)

Nicht zuletzt durch die zunehmende Möglichkeit der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) zur Erzielung einer Schwangerschaft bei Partnerinnen eines Betroffenen mit Azoospermie wird in immer stärkeren Maße auch bei Männern mit CBAVD die molekulargenetische Untersuchung des CFTR-Gens durchgeführt (siehe hierzu auch die gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, des Berufsverbandes der Frauenärzte und der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin, 1995). In den meisten Fällen liegen einer CBAVD ohne gleichzeitige Nierenbeteiligung (CBAVD mit Nierenbeteiligung stellt wohl ein von Mutationen im CFTR-Gen unabhängiges Krankheits-

bild dar) Mutationen im CFTR-Gen zugrunde, wobei sich das Spektrum der Mutationen deutlich von dem der typischen CF unterscheidet (siehe Dörk et al., 1997). In Deutschland finden sich am häufigsten die Genotypen DF508/R117H (ca. 21,5 % aller untersuchten CBAVD-Patienten ohne Nierenbeteiligung) und DF508/IVS8-5T (ca. 8,6 % aller untersuchten CBAVD-Patienten ohne Nierenbeteiligung), so daß bei Betroffenen einer CBAVD die beiden Mutationen R117H und IVS8-5T auf jeden Fall in die Untersuchung einbezogen werden sollten. Aber auch bei Untersuchung dieser beiden Genveränderungen, sowie aller in Tabelle 1 genannten Mutationen lassen sich nur auf ca. 56 % der Allele von CBAVD-Patienten ohne Nierenbeteiligung entsprechende Veränderungen nachweisen, wohingegen sich mittels SSCP-Analyse des ganzen CFTR-Gens Mutationen auf ca. 87% der Allele von CBAVD-Patienten ohne Nierenbeteiligung finden (Dörk et al., 1997). Darüberhinaus finden sich gehäuft (allerdings deutlich weniger als bei der CBAVD) Mutationen im CFTR-Gen auch bei Betroffenen einer einseitigen Aplasie der Samenleiter (CUAVD) und bei Betroffenen einer obstruktiven Azoospermie mit beidseitig tastbaren Samenleitern.

3. Praktische Vorgehensweise

Da die Diagnostik der CF auf der Anwendung der PCR basiert, ist eine geringe Menge an DNA in den meisten Fällen ausreichend. In der Regel ist aus 2 bis 5 ml Blut genügend DNA für die molekulargenetische Untersuchung zu erhalten. In spezialisierten Labors kann die Untersuchung auch aus Mundspülflüssigkeit, Mundschleimhautabstrichen oder Guthrie-Karten erfolgen. Für die DNA-Präparation stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Die Qualität der DNA ist für die weitere Diagnostik von großer Bedeutung.

Die pränatale Diagnostik der CF wird zumeist im Rahmen einer Chorionzottenbiopsie während des ersten Trimesters der Schwangerschaft durchgeführt. Steht viel Material für die molekulargenetische Untersuchung zur Verfügung, können Anteile der präparierten Chorionzotten direkt durch Aufkochen in NaOH-Lösung und anschließender PCR untersucht werden. Der Rest des dissektierten Materials wird für die DNA-Isolierung mittels Proteinase K-Verdau und Phenol/Chloroform-Extraktion eingesetzt. Die Untersuchung mehrerer unabhängiger Proben (durch Teilen des Materials) verringert das Problem der maternalen Zell-Kontamination. Zur pränatalen Diagnostik aus Chorionzotten wird auch auf den entsprechenden Vorschlag für eine Leitlinie des Berufsverbandes Medizinische Genetik (Schmidtke, 1997; dieser Vorschlag ist inzwischen von der Mitgliederversammlung des Berufsverbandes Medizinische Genetik angenommen worden) verwiesen, in denen bei identischem fetalen und maternalen Genotyp der Versuch zum Ausschluß einer maternalen Zellkontamination gefordert wird. Zum pränatalen Nachweis der Mutation DF508 ist festzustellen, daß die Durchführung der PAGE in einem Teil der Fälle (im Gegensatz zu den anderen in den Abschnitten 2.1 und 3.1 genannten Testverfahren) auch die Entdeckung maternaler Zellkontaminationen ermöglicht (Stuhrmann et al., 1991).

Amnionzellen (sowohl native, als auch kultivierte) können ebenfalls für die molekulargenetische Diagnostik eingesetzt werden. Bei der direkten Analyse nativer Zellen ist die beinahe unausweichliche Beimengung maternaler Zellen zu beachten. Bei kultivierten Amnionzellen spielt Kontamination eine wesentlich geringere Rolle.

Mitunter wünscht ein Paar eine molekulargenetische Diagnostik erst dann, wenn bereits eine Schwangerschaft eingetreten ist. Das Paar hat möglicherweise bereits ein betroffenes Kind, so daß eine Wahrscheinlichkeit von 25% für eine CF bei weiteren Nachkommen besteht. Sind beide Mutationen beim betroffenen Kind bekannt, können diese nach Bestätigung bei den Eltern beim Feten untersucht werden. Ist der Genotyp des betroffenen Kindes unbekannt, sollte versucht werden, die häufigsten Mutationen schnell zu untersuchen. Falls die Familie für den direkten Mutationsnachweis nur teilweise oder gar nicht informativ ist, sollte umgehend mit der Durchführung eines indirekten Gentestes mittels intragenischer und/oder das CFTR-Gen flankierender polymorpher Marker begonnen werden. Am meisten Informativität wird durch die Untersuchung des Dinukleotidrepeats IVS17bTA (Zielenski et al., 1991) erreicht, doch auch andere Marker haben sich als sehr sinnvoll erwiesen. Die Richtigkeit der angegebenen Stammbauminformation ist für die Durchführung eines indirekten Gentests unverzichtbar; darauf sollte auch im Befundbericht hingewiesen werden.

Häufiger ist die Schwangere nachgewiesene heterozygote Genträgerin (oder hat aufgrund der Familienanamnese eine erhöhte Genträgerwahrscheinlichkeit) und der Partner stammt aus einer Familie ohne Betroffene einer CF (oder umgekehrt). Die Untersuchung letzterer Person kann in den meisten Fällen die Wahrscheinlichkeit für eine CF soweit senken, daß eine Pränataldiagnostik zumeist nicht mehr in Anspruch genommen wird.

In seltenen Fällen (z. B. wenn eine Schwangere obligate Trägerin einer weder direkt noch indirekt nachweisbaren Mutation und der Partner ebenfalls Träger einer Mutation im CFTR-Gen ist) kann durch einen Bürstensaumenzymtest in der 17. Schwangerschaftswoche, gegebenenfalls in Kombination mit einem Gentest, die Wahrscheinlichkeit für eine CF beim Feten deutlich modifiziert werden.

3.1 Methoden

Für die molekulargenetische Diagnostik der CF stehen eine Vielzahl zuverlässiger Testmethoden zur Verfügung. Der Untersucher muß im Befundbericht die eingesetzte Methode nennen und er muß die Möglichkeiten und Grenzen der eingesetzten Methode kennen und im Befundbericht darlegen. Wenn die Identität einer Mutation nicht durch Sequenzieren zweifelsfrei geklärt ist, sollte (je nach Mutation und Testverfahren) im Befund mitgeteilt werden, daß die entsprechende Mutation mit (großer, größter, mit an Sicherheit grenzender) Wahrscheinlichkeit vorliegt.

Bei der PAGE-Methode zum Nachweis der Mutation DF508 kann aufgrund

der typischen Heteroduplex-Bildung zumeist eine Unterscheidung zur Mutation DI507 getroffen werden. Bei allen weiteren Auffälligkeiten (Insertionen oder Deletionen) muß die Identität der jeweiligen Genveränderung durch ein spezifisches Testverfahren (z. B. Sequenzieren) gesichert werden.

Viele Mutationen lassen sich mittels PCR (mitunter unter Einsatz eines sog. mismatch-Primers), Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese nachweisen. Hierbei ist auf einen vollständigen Verdau des PCR-Produktes zu achten, da unvollständige Restriktionsverdaus eine häufige Fehlerquelle darstellen. In den Fällen, in denen durch die zu testende Mutation eine Restriktionsschnittstelle zerstört wird, muß darauf verwiesen werden, daß der Test nicht spezifisch für die entsprechende Mutation ist und auch andere Veränderungen der gleichen Restriktionsschnittstelle das gleiche Testergebnis liefern können. In derartigen Fällen sollte die Sicherung der entsprechenden Mutation durch ein spezifisches Testverfahren durchgeführt, bzw. veranlaßt werden. Beispiel: Die Mutationen G551D und R553X führen beide zur Zerstörung der gleichen Schnittstelle für das Enzym HincII im Exon 11 des CFTR-Gens. Zur Unterscheidung der beiden Mutationen wird ein Restriktionsverdau mit dem Enzym MboI durchgeführt, da die Mutation G551D eine MboI-Schnittstelle generiert. Liegt bei zerstörter HincII-Schnittstelle nicht die Mutation G551D (d.h. die MboI-Schnittstelle) vor, ist es zwar sehr wahrscheinlich, aber nicht bewiesen, daß die Mutation R553X vorliegt. Das Vorhandensein dieser Mutation läßt sich durch einen spezifischen Test sichern.

Bei den verschiedenen Verfahren der ASO-Hybridisierung (inclusive reverser Verfahren) besteht häufig ein Problem durch „Hintergrund"-Signale. Werden nur Mutations-spezifische ASOs eingesetzt, kann nur bei „compound"-Heterozygotie und/oder gleichzeitiger Untersuchung der Eltern eines Betroffenen zwischen Homozygotie und Heterozygotie unterschieden werden. Weiterhin existieren Mutationen im CFTR-Gen, die die Bindung eines Wildtyp-spezifischen ASOs verhindern und somit fälschlicherweise Homozygotie für eine bestimmte Mutation vorspiegeln können. Beispiel: die Mutation F508C im Exon 10 des CFTR-Gens verhindert die Bindung des Wildtyp-spezifischen ASOs für den entsprechenden Bereich des CFTR-Gens. Eine DF508/D508C compound-heterozygote DNA-Probe kann bei diesem Verfahren als DF508 homozygote Probe erscheinen. Zur Sicherung einer Homozygotie für DF508 ist daher die Durchführung eines zweiten Testverfahrens bzw. die Untersuchung der Eltern des Betroffenen notwendig.

Prinzipiell die gleichen Einschränkungen der diagnostischen Sicherheit wie bei der ASO-Hybridisierung gelten auch für die ebenfalls auf Oligonukleotid-Hybridisierungen beruhenden ASP (z. B. ARMS-Test) und Oligo-Ligations-Verfahren. Bei der Verwendung kommerzieller Kits müssen auf jeden Fall die zumeist auch in den Test-Manuals beschriebenen Fehlermöglichkeiten beachtet und bei der Befundabfassung berücksichtigt werden.

Bei den eher allgemeineren Screening-Verfahren wie der Suche nach single strand conformational polymorphism (SSCP) und der denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) muß die Identität der gefundenen Auffälligkeit ebenfalls zumeist durch ein spezifisches Testverfahren gesichert werden, da Mutationen zwar oft zu typischen Änderungen der Wanderungsgeschwindigkeit führen und somit durch den Vergleich mit Kontrollproben schon eine Vermutung über die vorliegende Mutation ausgesprochen werden kann, andererseits aber auch verschiedene Mutationen zu einem identischen Bandenmuster führen können. Es muß weiterhin berücksichtigt werden, daß insbesondere bei der SSCP, aber auch bei der DGGE keine vollständige Detektionsrate aller Mutationen (ca. 80 bis 85% bei der SSCP und ca. 90 bis 95 % bei der DGGE) besteht. Beide Verfahren (DGGE mehr als SSCP) erlauben auch die simultane Untersuchung mehrerer Exons.
Die direkte Sequenzierung stellt wohl die genaueste Möglichkeit zur Identifizierung einer Mutation dar. Es muß allerdings beachtet werden, daß mitunter die Entdeckung heterozygoter Mutationen schwierig ist und daß es auch zu Artefakten bei der Sequenzierung kommen kann. Insbesondere bei der Identifikation seltener oder gar noch nicht beschriebener Mutationen sollte die Identität der gefundenen Auffälligkeit durch Sequenzierung beider Stränge oder ein zweites Verfahren gesichert werden.

4. Bestätigung
Jede molekulargenetische Diagnostik hängt von der klinischen Diagnose und der guten Kommunikation zwischen Klinik und Labor ab. Das Labor möchte keine extensiven Anstrengungen zur CFTR-Mutationsdetektion unternehmen, nur um später darüber informiert zu werden, daß die Verdachtsdiagnose CF nur sehr vage war und daß eigentlich nur der (nicht mögliche) Ausschluß gewünscht war. Kliniker sollten sich der Bedeutung der Indikation und des Wertes der Durchführung eines „Schweißtestes" oder der (in einigen Zentren möglichen) Messung der Nasalepithel-Potential-Differenz bewußt sein. Wie oben erwähnt, kann in rund 2/3 bis 3/4 aller Fälle „klassischer CF" die Diagnose gesichert werden, und es gibt stets grenzwertige Fälle, in denen eine Diagnostik sehr sinnvoll ist.

5. „Stammbaum-Risiko"
Das Labor sollte die Inzidenzen und Genträgerhäufigkeiten in den Populationen der jeweilig untersuchten Familien in Erfahrung bringen (z. B. in Welsh et al., 1995). Liegen für die entsprechende Population keine Berichte vor, so sollte für kaukasische Populationen von einer mittleren Inzidenz von 1/2500 und einer Heterozygotenrate von 4 % ausgegangen werden. Für andere Populationen sollte anhand der Daten in Welsh et al. (1995) oder anderer Literaturstellen eine ungefähre Schätzung vorgenommen werden. Aus der Inzidenz und der Heterozygotierate kann in der üblichen Weise die a priori Genträgerwahrscheinlichkeit errechnet werden. Durch die Testung der entsprechenden Mutationen (deren Häufigkeit für die jeweilige Population bekannt sein sollte) wird diese Wahrscheinlichkeit verändert und kann entsprechend dem Bayes' schen Theorem berechnet werden.

6. Nomenklatur/Befund
Die Nomenklatur der CFTR-Mutationen ist einfach, so daß nur wenige Probleme bestehen. Ein solches Problem entsteht durch die Möglichkeit identischer Aminosäureaustausch-Mutationen durch verschiedene Einzelbasenaustausche. Als Beispiel hierfür sei die Mutation S549R genannt, die sowohl durch einen A→C Substitution an dem Nukleotid 1777, als auch durch eine T→G Substitution am Nukleotid 1779 verursacht werden kann. Die entsprechenden Genveränderungen werden daher mit S549R(A→C) und S549R(T→G) bezeichnet. Ein anderes, eher profanes Problem besteht in der Tatsache, daß einige Textverarbeitungsprogramme, Drucker oder Schreibmaschinen Probleme beim Drucken des Buchstaben „D“ haben. Eine akzeptable Alternative ist das Wort Delta oder delta.

Aminosäureaustausch (missense)-Mutationen
Diese Mutationen können stets als eine dreiteilige Abkürzung wiedergegeben werden:
Der erste Teil besteht aus dem Einzelbuchstaben-Code für die Wildtype-Aminosäure.
Der zweite Teil bezeichnet die Position der Aminosäure (Codon-Nummer).
Der dritte Teil besteht aus dem Einzelbuchstaben-Code für die neue (substituierende) Aminosäure.
Beispiel: G551D bezeichnet die Substitution eines Glycins (G) durch Asparaginsäure (D) an der Position 551 des CFTR-Gens.

Nonsense-Mutationen
Diese werden in der gleichen Art wie Aminosäureaustausch-Mutationen geschrieben, wobei der dritte Teil aus einem „X“ (für ein Translations-Terminations-Codon) besteht.
Beispiel: R553X bezeichnet die Substitution eines Arginins (R) durch ein Translations-Terminations-Codon (X) an der Position 553 des CFTR-Gens.

Deletionen, die den Leserahmen erhalten
Deletionen einzelner Aminosäuren resultieren aus Drei-Basenpaar-Deletionen und sind durch ein „D“ repräsentiert, gefolgt von dem Einzelbuchstaben-Code der Aminosäure und der entsprechenden Position.
Beispiel: DF508 bezeichnet die Deletion von Phenylalanin (F) an Position 508 des CFTR-Gens.

Deletionen/Insertionen einer oder zweier Nukleotide
In diesen Fällen wird nicht die Codon-Nummer, sondern die Nukleotidposition angegeben. Bei Deletionen wird das deletierte Nukleotid bezeichnet, z.B. liegt bei der Mutation 300delA die Deletion eins Adenins an der Nukleotid-Position 300 vor. Handelt es sich um die Deletion einer Base in einer Abfolge mehrerer identischer Basen, wird die Position der ersten Base dieser Abfolge angegeben. Sind zwei Nukleotide deletiert, werden beide Nukleotide angegeben, z.B. handelt es sich bei der Mutation 394delTT um die Deletion zweier Thymidine beginnend an Position 394.

Im Falle von Insertionen wird eine ähnliche Nomenklatur verwandt, mit dem Unterschied, daß hier die Position des Nukleotides angegeben wird, hinter dem die Insertion stattgefunden hat, d. h. 1138insG bezeichnet die Insertion eines Guanins hinter dem Nukleotid Nr. 1138. Im Falle einer Insertion zweier Nukleotide werden beide angegeben, d. h. 1154insTC bezeichnet die Insertion eines Thymidins und eines Cytosins hinter dem Nukleotid an Position 1154 des CFTR-Gens.

Komplexe Deletionen/Insertionen
Es gibt mehrere frameshift-Mutationen die in einer Deletion oder Insertion von vier oder mehr Nukleotiden bestehen. Diese werden üblicherweise mit der Anzahl der deletierten oder inserierten Nukleotide bezeichnet, so handelt es sich bei der Mutation 1461ins4 um die Insertion von vier Nukleotiden (in diesem Fall AGAT) hinter der Nukleotidposition 1461. Bei der Mutation 1949del84 handelt es sich um eine Deletion von 84 Basenpaaren, beginnend an Nukleotidposition 1949. Weiterhin gibt es einige größere Deletionen die ganze Exons des CFTR-Gens entfernen und entsprechend z. B. als CFTRdel2 (Deletion des Exons 2 des CFTR-Gens) bezeichnet werden.

Spleißmutationen
Bei diesen Mutationen handelt es sich üblicherweise um die Substitution eines Nukleotids in den hoch-konservierten Spleiß-Akzeptor (einem AG Dinukleotid am 3' Ende des Introns) oder Spleiß-Donor (einem GT Dinukleotid am 5'Ende des Introns)-Stellen. Die Position des mutierten Nukleotids wird auf das erste oder letzte Nukleotid des Exons bezogen, da Intronsequenzen nicht numeriert werden. Bei der Mutation 621+1G→T handelt es sich um die Substitution eines Guanins durch ein Thymidin am ersten Nukleotid des Introns 4 (das letzte Nukleotid des Exons 4 hat Position Nr. 621 und das erste Nukleotid des Introns 4 wird mit 621+1 bezeichnet). Dem vergleichbar, handelt es sich bei der Mutation 621+2T→C um die Substitution des zweiten Nukleotids im Intron 4. Mutationen der Akzeptor-Spleißstellen werden vom 5' Ende des Exons ausgehend bezeichnet, so handelt es sich bei der Mutation 1717-1G→A um die Substitution des letzten Nukleotids des Introns 10 (einem Guanin) durch ein Adenin.

Um eine ungewöhnliche Spleißmutation handelt es sich bei der Mutation 3849+10KbC→T, bei der eine kryptische Spleiß-Akzeptor-Stelle, die 10Kb vom Ende des Exons 19 im Intron 19 liegt, durch eine Cytosin zu Thymidin Substitution aktiviert wird. Dies führt zu einem teilweisen Einbau eines zusätzlichen Exons, welches ein Translations-Terminations-Codon enthält.

7. Definition des Begriffs Mutation
Das Konzept von Mutationen als einfache „Schwarz oder Weiß“ Beziehung kann in der molekularen Humangenetik nicht länger aufrechterhalten werden; insbesondere die Studien zur mRNA-Produktion und -Expression ergaben eine Vielfalt phenotypischer Effekte bei einer Reihe von Mutationen. Das große Spektrum der klinischen Ausprägung der CF suggeriert, daß manche Mutationen „schwerwiegend“ (severe) und andere „milder“ (mild) sind. Es sollte beachtet werden, daß Mutationen, die mit erhaltener Pankreasfunktion (pancreatic sufficiency, PS) einhergehen, nicht notwendigerweise „mild“ sind. Patienten mit schwerwiegenden respiratorischen Symptomen können PS sein. Es gibt einige Assoziationen zwischen Geno-

typ und Pankreasfunktion, und einige Mutationen finden sich vorwiegend bei Patienten mit geringer pulmonaler Symptomatik. Allerdings sind aufgrund der zunehmenden Untersuchungen von Patienten mit „grenzwertiger CF“ und „CF-assoziierten“ Erkrankungen wie CBAVD, disseminierten Bronchiektasien und chronischer Pankreatitis (Erkrankungen, die zusammenfassend als „CFTRopathien“ oder CFTR-Gen-Erkrankungen bezeichnet werden können) Mutationen entdeckt worden, deren Status als definitiv CF-verursachende Mutationen zweifelhaft ist.

Es ist eine Vielzahl von Kriterien zu berücksichtigen, bevor eine DNA-Sequenzveränderung als krankheitsverursachende Mutation bezeichnet werden kann:

a) Ist die ursprüngliche Aminosäurenzusammensetzung des Genproduktes verändert worden, entweder durch eine Substitution oder durch Spleißeffekte? Bei Aminosäuresubstitutionen muß gefragt werden, ob die betreffende Aminosäure hochkonserviert ist (in vergleichbaren Proteinen oder in verwandten Species). Wurde durch die Aminosäuresubstitution die Ladung, die Größe oder die hydropathische Eigenschaft verändert?

b) Wurde die Mutation nur auf CF-Chromosomen und nicht auf nachgewiesenen non-CF-Chromosomen oder CF-Chromosomen, auf denen eine andere Mutation bereits gefunden wurde, identifiziert?

c) Betrifft die Mutation eine Spleißstelle und konnte aberrantes Spleißen nachgewiesen werden (z.B. durch RNA-Untersuchungen)?

Viele dieser Fragen sind bis jetzt unbeantwortet und Sequenzveränderungen werden empirisch als Mutationen eingestuft, da sie auf mehreren CF-Chromosomen gefunden werden.

8. Internetadressen

CF Home Page: http://CF-web.mit.edu/
CF Mutationsdatenbank (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium): http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/

9. Literatur

Ballabio A, Gibbs RA, Caskey CT (1990) PCR test for cystic fibrosis deletion. Nature 343: 220

Berufsverband Medizinische Genetik e. V. (1990) Stellungnahme zu einem möglichen Heterozygoten-Screening bei zystischer Fibrose. Med. Genet. 2: 6

Berufsverband Medizinische Genetik e. V. (1996) Leitlinien zur Erbringung humangenetischer Leistungen: 4. Leitlinien zur molekulargenetischen Labordiagnostik. Med. Genet. 8: Heft 3, Sonderbeilage S. 4

Cuppens H, Buyse I, Baens M, Marynen P, Cassiman JJ (1992) Simultaneous screening for 11 mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex amplification and reverse dot-blot. Mol. Cell. Probes 6: 33–39

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Berufsverband der Frauenärzte, Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (1995) Gemeinsame Stellungnahme. Assistierte Reproduktion: Mikroinjektion (ICSI) - Fehlbildungsrisiko, ovarielle Stimulation und Ovarialkarzinomrisiko. Der Frauenarzt 36: 614–616

Dörk T, Mekus F, Schmidt K, Boßhammer J, Fislage R, Heuer T, Dziadek V, Neumann T, Kälin N, Wulbrand U, Wulf B, Hard H von der, Maas G, Tümmler B (1994) Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients. Hum. Genet. 94: 533–542

Dörk T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Wieczorek D, Böhm I, Mayerova A, Seydewitz HH, Nieschlag E, Meschede D, Horst J, Pander HJ, Sperling H, Ratjen F, Passarge E, Schmidtke J Stuhrmann M (1997) Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. Hum. Genet. 100: 365–377

Eggerding FA, Iovannisci DM, Brinson E, Grossman P, Winn-Deen ES (1995) Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. Hum. Mutat. 5: 153–165

Estivill X, Bancells C, Ramos C, and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. Hum. Mutat. 10: 135–154

Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M, Malone G, Little S (1992) Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. Am. J. Hum. Genet. 51: 251–262

Highsmith WE Jr., Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TF, Spock A, Gorvoy JT, Quittel L, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Knowles M (1994) A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. N. Engl. J. Med. 331: 974–980

Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti,A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073–1080

Kommission für ôffentlichkeitsarbeit und ethische Fragen der Gesellschaft für Humangenetik e. V. (1991) Stellungnahme zum Heterozygoten-Bevölkerungsscreening. Med. Genet. 3: 11

Kommission für Öffentlichkeitsarbeit und ethische Fragen der Gesellschaft für Humangenetik e. V. (1995) Stellungnahme zur genetischen Diagnostik bei Kindern und Jugendlichen. Med. Genet. 7:358–359

Pander HJ, Schwinger E (1994) Blutsverwandtschaft als Indikation für einen CF-Heterozygotentest? Med. Genet. 6: 205–209

Rommens JM, Kerem BS, Greer W, Chang P, Tsui LC, Ray P (1990) Rapid non-radioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. Am. J. Hum. Genet. 46: 395–396

Schmidtke J (1997) Vorschlag für die Leitlinie zur molekulargenetischen Diagnostik nach CVS. Med. Genet. 9: 132

Stuhrmann M, Spangenberg A, Böhm I, Reis A, Schmidtke J (1991) Application of PCR for prenatal diagnosis of cystic fibrosis (CF). In: Rolfs A, Schumacher HC, Marx P (Hrsg.). PCR Topics. Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Seiten 89–-91, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Stuhrmann M, Krawczak M, Schmidtke J (1995) Möglichkeiten und Grenzen der molekulargenetischen Diagnostik der Mukoviszidose. Monatsschr. Kinderh. 143: 835–838

The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1994) Population variation of common cystic fibrosis mutations. Hum. Mutat. 4: 167–177

Wagner M, Schlösser M, Reiss J (1990) Direct gene diagnosis of cystic fibrosis by allele-specific polymerase chain reaction. Mol. Biol. Med. 359–364

Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL (1995) Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W und Valle D (Hrsg.): The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7. Auflage, Band III, Seiten 3799-3876, McGraw Hill Inc. Verlag (New York)

Will K, Schmidtke J, Stuhrmann M (1994) Genetische Aspekte der Cystischen Fibrose – Die Aufklärung der molekularen Grundlagen ist gelungen. Med. Genet. 6: 320–324

Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland F, Rommens J, Tsui LC (1991) A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Am J Hum Genet 49: 1256–1262

Anmerkung
1 Als federführende Autoren und Autorinnen zeichnen sich:
Manfred Stuhrmann-Spangenberg (1), Christa Aulehla-Scholz (2), Bernd Dworniczak (3), Jochen Reiss (4).

1) Institut für Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover; 2) Abteilung für Klinische Genetik, Frauenklinik Berg, Stuttgart; 3) Institut für Humangenetik, Universität Münster; 4) Institut für Humangenetik, Universität Göttingen

Zitierhinweis
Berufsverband Medizinische Genetik e.V., Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (1997) Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose. medgen 9: 553–559.