

Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen am Beispiel von Hämophilie A und Cystische Fibrose

Diana Tomi, Rixa Voigt, Eberhard Schwinger

Institut für Humangenetik,
Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein,
Lübeck

Zusammenfassung

Die Polkörperuntersuchung ist zum aktuellen Zeitpunkt die einzige Möglichkeit in Deutschland eine Präimplantationsdiagnostik (PID) durchzuführen. Einige Vor- und Nachteile der Polkörperdiagnostik sind gut bekannt. Ein deutlicher Nachteil besteht darin, dass nur mütterliche Allele untersucht werden können. Aufgrund der hohen Heterozygotierate und des Allel-dropouts stehen nach einer Diagnostik ausschließlich des ersten Polkörpers deutlich weniger Eizellen als Embryonen nach PID für den Transfer zur Verfügung.

In einem Überblick der bisherigen und der geplanten Untersuchungen wird ein kleines Spektrum der Erkrankungen dargestellt, die mit dieser Methode diagnostiziert werden können. Zusätzlich werden allgemeine Voraussetzungen für eine Polkörperuntersuchung und die entsprechenden Methoden vorgestellt. Anhand zweier Fallbeispiele werden wesentliche Aspekte und mögliche Fehlerquellen der Polkörperuntersuchung diskutiert.

Schlüsselwörter

Polkörperuntersuchung, Präimplantationsdiagnostik (PID), Cystische Fibrose, Hämophilie A.

Polar body analysis for monogenic disorders (Haemophilia A and cystic fibrosis as an example)

Summary

In Germany the only possibility to perform preimplantation genetic diagnosis is the analysis of polar bodies. Some advantages and disadvantages of polar body diagnosis are well known. In polar bodies only the maternal genome can be analysed which is one of the main disadvantages. Because of the high rate of heterozygosity and the allele dropout the number of oocytes suitable for transfer after analysis only of the first polar body is lower than after preimplantation genetic diagnosis.

An overview of the prepared, performed and planned diagnostic assays for diseases analysable by polar bodies is given. General conditions and methods are presented. By the description of two case reports the problems of polar body diagnosis and possible pitfalls are discussed.

Keywords

Polar body diagnosis, preimplantation genetic diagnosis, cystic fibrosis, haemophilia A.

Einleitung

Paare mit schwerwiegenden genetisch bedingten Erkrankungen oder der Anlageträgerschaft einer solchen stellen sich häufig zur genetischen Beratung vor. Nicht selten weist der Familienstammbaum von der Erkrankung betroffene oder verstorbene Kinder und/oder mehrere Schwangerschaftsabbrüche nach pränataler Diagnostik mit Nachweis der bekannten Genveränderungen auf. In solchen Fällen, aber auch bei gut informierten Anlageträgerinnen ohne betroffene Kinder, wird immer häufiger die Frage gestellt, ob es eine Alternative zur pränatalen Diagnostik mit der möglichen Konsequenz eines Schwangerschaftsabbruches gibt. Das deutsche Embryonenschutzgesetz erlaubt keine Präimplantationsdiagnostik im klassischen Sinne (Untersuchung eines oder zweier Blastomere) (Ludwig 2000, Schwinger 2002, Schwinger 2003). Die fehlende Möglichkeit einer Präimplantationsdiagnostik (PID), wie diese in einigen EU-Ländern, in Asien und in den USA praktiziert wird, ruft bei den Ratsuchenden Unverständnis und gelegentlich Empörung hervor. Eine Untersuchung der Polkörper, die vor der Verschmelzung der beiden Vorkerne abgeschlossen ist, steht jedoch nicht im Konflikt mit der gesetzlichen Regelung. Über die Alternative einer Polkörperuntersuchung werden Paare, die sich mit der Fragestellung einer Präimplantationsdiagnostik oder einer Polkörperdiagnostik an das Institut für Humangenetik in Lübeck wenden, ausführlich und kritisch beraten.

In den meisten Zentren weltweit, in denen eine PID durchgeführt wird, erfolgt eine Untersuchung einer oder zweier Blastomere für unterschiedliche molekulargenetische oder cytogenetische Fragestellungen (ESHRE PGD Consortium Steering Committee). In Chicago werden der Literatur zufolge umfangreiche Untersuchungen an Polkörpern und jetzt auch in Kombination mit der Untersuchung von Blastomeren als Alternative zu einer klassischen Präimplantationsdiagnostik durchgeführt (Verlinsky, 1990, 1996, 1997, Strom, 1998).

Einen Vorteil der Polkörperdiagnostik kann die indirekte Untersuchung der Eizelle darstellen (Verlinsky, 1990). Die Methode weist aber auch wesentliche Nachteile auf (Schwinger, 2002). Die Polkörperuntersuchung ermöglicht lediglich die Untersuchung mütterlicher Allele. Mittels Analyse der Polkörper können nur indirekt Rückschlüsse auf die Eizelle gezogen werden. Erbanlagen, die von dem Vater weitergegeben werden, können nicht untersucht werden. Bei autosomal rezessiven oder X-chromosomal rezessiven Erkrankungen ist der Anteil der Eizellen, die für einen Transfer in Frage kommen, statistisch um 50% geringer als bei der PID. Somit sinkt die Wahrscheinlichkeit, eine Schwangerschaft zu erzielen. Alle Eizellen, die eine Mutation tragen, müssen verworfen werden. Dieses trifft auch für Eizellen zu, die von einer Samenzelle mit einem Wildtypallel oder einem X-Chromosom befruchtet werden. Hierdurch würde ein Embryo entstehen, der klinisch gesunder Anlageträger wäre. Ein weiteres Problem stellt das Crossing-over dar. Der Austausch homologer Chromosomenabschnitte kann zu einer Heterozygotie des ersten Polkörpers führen. In diesen Fällen kann nur der zweite Polkörper Aufschluß darüber geben, ob die Eizelle die Mutation oder das Wildtypallel trägt. Ist eine Untersuchung des zweiten Polkörpers nicht möglich, müssen alle Eizellen, die eine Heterozygotie des ersten Polkörpers aufweisen, vom weiteren Transfer ausgeschlossen werden.

Allgemeine Voraussetzungen und Methoden

Für die Vorbereitung einer Polkörperdiagnostik müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Die meist über das Krankheitsbild und Vererbung gut informierten Ratsuchenden werden in einer genetischen Beratung über die Möglichkeiten und Grenzen der Polkörperdiagnostik ausführlich aufgeklärt. Die Kenntnis der die Krankheit verursachenden Mutation ist ebenso wichtig wie die Möglichkeit, die DNA eines oder mehrerer Betroffener in der Familie (Eltern, Kind oder Abortmaterial) zu untersuchen. Zusätzlich wird aus einer kleinen Hautprobe der Ratsuchenden eine Fibroblastenkultur zur Gewinnung von Einzelzellen angesetzt.

Aus Datenbanken werden bekannte polymorphe Marker und repetitive Di-Tri- oder Tetranucleotid Sequenzen ermittelt. Die DNA der Ratsuchenden wird auf Heterozygotie der Marker hin untersucht. Die Marker werden so ausgesucht, daß an beiden Seiten der bekannten Mutation mindestens zwei Marker so dicht wie möglich liegen. Eine multiplex-PCR wird etabliert, in der vier bis fünf geeignete informative polymorphe Marker amplifiziert werden. Dabei sollen nach Möglichkeit alle Marker gleich gut mit einer niedrigen Allel-Dropout (ADO)-Rate amplifiziert werden. Wegen des engen Zeitfensters für die Untersuchung erfolgt ein direkter Nachweis der Mutation nur in seltenen Fällen. Für die einzelnen Marker wird anschließend eine nested-PCR mit Fluoreszenz markierten Primern durchgeführt. Die Diagnostik muss an Einzelzellen der Ratsuchenden getestet werden. Hierfür werden in Lübeck einzelne Fibroblasten der Ratsuchenden verwendet.

Eine Polkörperdiagnostik erfolgt nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität zu Lübeck. Die ovarielle Stimulation, die Entnahme der Eizellen und die intracytoplasmatische Spermieninjektion (Schopper, 1999) werden entsprechend der üblichen Protokolle durchgeführt. Die Eröffnung der Zona pellucida und die Entnahme der Polkörper erfolgt wie bereits von Montag (1998) beschrieben. Die Polkörper werden lysiert (Schaaff,

1990) und mittels multiplex- und nested-PCR amplifiziert. Die PCR Produkte werden elektrophoretisch auf einem Sequenzer der Firma Li-Cor aufgetrennt und beurteilt. Eizellen, die zwei Vorkerne zeigen und das Wildtypallel tragen, werden transferiert, entsprechend üblicher Protokolle.

Wegen des experimentellen Charakters der Untersuchung wird Paaren bei Eintritt einer Schwangerschaft nach einer Polkörperuntersuchung zur Absicherung der Diagnostik dringend eine pränatale Diagnostik empfohlen.

Übersicht bisheriger Untersuchungen im Institut für Humangenetik in Lübeck

Auf Anfrage betroffener Familien wurde eine Polkörperdiagnostik für mehrere Erkrankungen etabliert: Zystische Fibrose, Fragiles-X-Syndrom, Hämophilie A und Mukopolysaccharidose Typ I (Hurler-Syndrom).

Für zwei Familien wurde eine Polkörperdiagnostik für Zystische Fibrose vorbereitet. Im ersten Zyklus konnte der Frau der ersten Familie nach Polkörperuntersuchung nur eine befruchtete Eizelle transferiert werden, ohne dass hieraus eine Schwangerschaft entstand. Im zweiten Zyklus war keine Eizelle für den Transfer geeignet. Die Frau der zweiten Familie bekam nach Polkörperuntersuchung eine Eizelle zurückgesetzt, ohne Entwicklung einer Schwangerschaft.

Für das Fragile-X-Syndrom konnten bei dem ersten Ehepaar nach ovarieller Stimulation lediglich zwei degenerierte Eizellen gewonnen werden. In der zweiten Familie mit Fragilem-X-Syndrom wurde die Ratsuchende spontan schwanger zu dem Zeitpunkt, als die ovarielle Stimulation geplant war. Für die beiden Fälle wurden unterschiedliche multiplex-PCR Assays etabliert, da für die Ratsuchenden verschiedene Marker informativ waren.

Bei der Hämophilie A konnte der Ratsuchenden nach Polkörperdiagnostik eine befruchtete Eizelle zurückgesetzt werden, wiederum ohne das Entste-

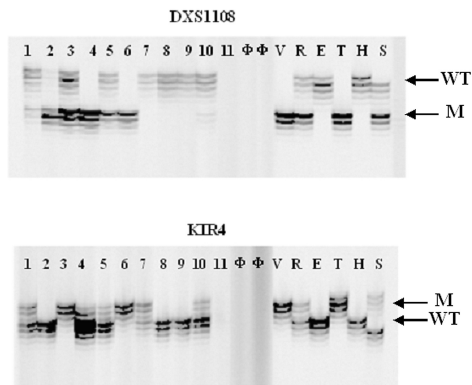


Abb 1 Ergebnisse der Marker DXS1108 und KIR4 an den ersten Polkörpern

1-11 = Polkörper
 Φ = Leerkontrollen der multiplex- PCR und der nested-PCR
 V = Vater der Ratsuchenden
 R = Ratsuchende
 M = mit der Mutation koppelndes Allel
 WT = Wildtypallel

E, T, H und S = DNAs der Untersucher (analysiert zum Kontaminationsausschluss)

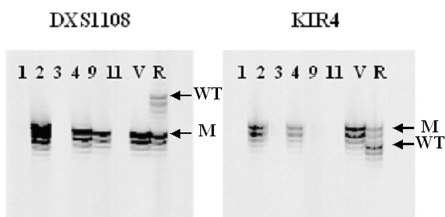


Abb 2 Ergebnisse der Marker DXS1108 und KIR4 an den zweiten Polkörpern

1-4, 9, 11 = Polkörper
 V = Vater der Ratsuchenden
 R = Ratsuchende
 M = mit der Mutation koppelndes Allel
 WT = Wildtypallel

hen einer Schwangerschaft (Tomi, 2004 in press).

Die Ratsuchende, bei der eine Polkörperuntersuchung hinsichtlich einer Mukopolysaccharidose durchgeführt wurde, wurde im ersten Zyklus nach Polkörperuntersuchung schwanger. Transferiert wurde eine Eizelle mit dem Wildtypallel. In der pränatalen Diagnostik wurde mittels Chorionzottenbiopsie (CVS) dieses Ergebnis bestätigt und eine mütterliche Kontamination ausgeschlossen (Daten sind zur Publikation eingereicht).

Für die folgenden Erkrankungen wird zur Zeit eine Polkörperdiagnostik im hiesigen Institut etabliert: Incontinentia pigmenti Bloch-Sulzberger, X-chromosomal Hydrocephalus und Myotone Dystrophie.

Fallbeispiel I

Eine 34 jährige gesunde Ratsuchende stellte sich mit ihrem Partner zur genetischen Beratung mit der Fragestellung einer Polkörperdiagnostik für die Hämophilie A vor. Ihr Vater hat eine Hämophilie A. Durch das Vorliegen einer Resistenz gegenüber dem Faktor VIII ist er schon bei kleinen Verletzungen auf eine intensivmedizinische Behandlung angewiesen. Die bei dem Vater vorliegende Mutation führt üblicherweise zu einer milden Verlaufsform einer Hämophilie A, weswegen für die Ratsuchende ein Schwangerschaftsabbruch nicht in Frage käme. Der durch die Resistenz bedingte schwerere klinische Verlauf beim Vater der Ratsuchenden bewegte das Ehepaar jedoch, nach Alternativen zu suchen.

Bei der Ratsuchenden wurde die väterliche Mutation nachgewiesen. Es wurde eine multiplex-PCR mit informativen polymorphen Markern etabliert. Zwei Marker (DXS1108, DXS8087) gehören zu den bekannten polymorphen Regionen des X-Chromosoms. Bei drei weiteren Markern (KIR3, KIR4, KIIR) handelt es sich um Dinukleotid-Repeats in der Nähe des Faktor VIII-Gens.

Nach ovarieller Stimulation konnten 13 Eizellen der Ratsuchenden gewonnen werden. Nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) wurden die ersten Polkörper der Eizellen 1-11 entnommen und in 0,5 µl PCR Reaktionsgefäße mit Lyse-Lösung transferiert. Nach multiplex-PCR und nested-PCR konnten 10 von 11 Polkörpern ausgewertet werden. Sieben der zehn beurteilbaren Polkörper waren heterozygot. Zwei Polkörper zeigten Allele, die mit dem Wildtypallel des Faktor VIII-Gens koppelten (8, 9). Ein Polkörper zeigte Allele, die mit dem mutierten Allel des Gens koppelten (6), so dass auf das Wildtypallel in der Eizelle geschlossen werden konnte (Abbildung 1). In der korrespondierenden Eizelle (6) waren zwei Vorkerne sichtbar. Die Eizelle wurde transferiert, ohne dass es zu einer Schwangerschaft kam (Tomi 2004, in press).

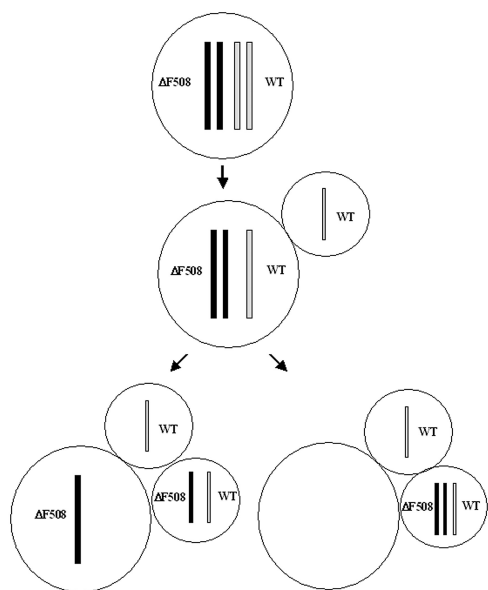
Aus wissenschaftlichem Interesse wurde von sechs der verworfenen Eizellen zusätzlich der zweite Polkörper untersucht. Im ersten Polkörper der Eizelle 9 konnten Allele, die mit dem Wildtypallel koppelten, nachgewiesen werden. In dem entsprechenden

zweiten Polkörper ließen sich wie erwartet Allele nachweisen, die mit der Mutation koppelten (Abbildung 2). Bei zwei weiteren Eizellen (2, 4) war im ersten Polkörper eine Heterozygotie zu sehen (Abbildung 1). Die zweiten Polkörper beider Eizellen zeigten Allele, die mit der Mutation koppelten (Abbildung 2). Somit ist davon auszugehen, daß in den Eizellen 2 und 4 das Wildtypallel vorlag.

Fallbeispiel II

Ein weiteres Ehepaar stellte sich zur genetischen Beratung vor mit der Fragestellung einer Polkörperdiagnostik bei Cystischer Fibrose. Der erstgeborene Sohn der Familie hat eine Mukoviszidose. Molekulargenetisch konnte bei ihm eine compound Heterozygotie für die Mutationen ΔF508 und G551D nachgewiesen werden. In drei aufeinander folgenden Schwangerschaften wurde bei der Ratsuchenden eine pränatale Diagnostik durchgeführt. In allen drei Fällen wurde ein Schwangerschaftsabbruch nach Nachweis beider Mutationen durchgeführt.

Für die Ratsuchende wurde eine multiplex-PCR mit der ΔF508-Mutation und weiteren polymorphen Markern etabliert. Nach Stimulation wurden zwölf Polkörper untersucht. Von elf auswertbaren Polkörpern waren neun heterozygot. Ein Polkörper zeigte das Wildtypallel. In einem Polkörper konnte die Mutation nachgewiesen werden, so dass von einem Wildtypallel in der entsprechenden Eizelle auszugehen war. Diese Eizelle war befruchtet und konnte transferiert werden.



Tab 1 Darstellung der einzelnen Allele des ersten und zweiten Polkörpers der Eizelle 3, sowie der Allele der Mutter, des betroffenen Kindes und des Vaters.

	$\Delta F508$	IVS6	D7S480	D7S486	D7S1842
PB I	WT/-	1/-	9/4!	4/-	5/-
PB II	WT/-	1/2	9/3	4/6	-/-
Mutter	WT/ ΔF	1/2	9/3	4/6	5/8
Kind	WT/ ΔF	1/2	1/3	1/6	5/8
Vater	WT/WT	1	1/5	1/9	5/5

PB I = erster Polkörper
 PB II = zweiter Polkörper
 WT = Wildtypallel
 ΔF = $\Delta F508$ Mutation

Abb 3 Schema einer möglichen Non-disjunction nach vorzeitiger Trennung der Chromatiden. Eine vorzeitige Trennung der Chromatiden kann die Hemizygotie des ersten Polkörpers und die Heterozygotie des zweiten Polkörpers erklären.

Die Ratsuchende wurde nicht schwanger (Tomi, 2003). Aus wissenschaftlichem Interesse wurden sechs zweite Polkörper für weitere Untersuchungen entnommen. Drei konnten ausgewertet werden. Im ersten Polkörper der Eizelle 3 zeigte sich eine Hemizygotie für das Wildtypallel. Überraschenderweise wurde im zweiten Polkörper eine Heterozygotie nachgewiesen (Tabelle 1). Zusätzlich lag bei einem einzelnen Marker eine Kontamination im ersten Polkörper vor.

Diskussion

Aus den Abschnitten der allgemeinen Voraussetzungen und Methoden und den Fallbeispielen geht hervor, dass sich außer den eingangs erwähnten Einschränkungen der Polkörperanalyse weitere Aspekte ergeben, die bei der Etablierung und Auswertung eine wichtige Rolle spielen. Einige ergeben sich aus der Rekombination während der Prophase der ersten meiotischen Teilung. Durch das Crossing-over werden homologe Chromosomenabschnitte zwischen zwei Chromatiden ausgetauscht. Dies kann zu einer Heterozygotie in dem untersuchten Bereich des Chromosoms führen.

Bemerkenswert bei den dargestellten Fällen war die hohe Rate der Heterozygotie der ersten Polkörper (7 von 10 für die Hämophilie und 9 von 11 für die Cystischen Fibrose). Bei isolierter Betrachtung der ersten Polkörper wird die Anzahl der evtl. zu transferierenden Eizellen stark reduziert. Durch eine Beurteilung des zweiten Polkörpers könnte eine sicherere Aus-

sage über die Eizellen gemacht werden, was zum jetzigen Zeitpunkt aus technischen und zeitlichen Gründen nur schwer möglich ist. Die Heterozygotierate war in unseren Fällen höher als in einigen Fällen in der Literatur (mit ca. 50%) beschrieben (Strom, 1998, Verlinksky, 1997). Eine andere Arbeit von Verlinksky et al. (1999) beschreibt je nach untersuchter Erkrankung Heterozygotieraten zwischen 50 und 73%. Vom Standpunkt der diagnostischen Sicherheit aus kann die Heterozygotie des ersten Polkörpers nur in Verbindung mit einem Allele-Dropout (ADO) problematisch sein.

Das ADO ist ein gefürchtetes und viel diskutiertes Phänomen bei der Amplifikation von Einzelzellen. In den im hiesigen Institut untersuchten Fällen zeigten sich sehr unterschiedliche ADO-Raten in Abhängigkeit von den untersuchten Markern. ADO bezieht sich auf den Ausfall eines oder beider Allele. Im Polkörper 11 des Fallbeispiels I (Abbildung 1) konnte kein Allel nachgewiesen werden, wodurch die Eizelle nicht beurteilt werden konnte. Es ist unklar, ob der Verlust des Polkörpers bei dem Transfer in das PCR-Reaktionsgefäß, eine Fragmentierung oder eine Degeneration des Polkörpers in solchen Fällen für den ADO verantwortlich sind.

Für den Marker DXS1108 war in den Polkörpern 4 und 7 und für den Marker KIR4 in den Polkörpern 2 und 3 ein ADO durch den Ausfall eines Allels zu sehen (Fallbeispiel I). Durch die isolierte Betrachtung des ersten Markers (DXS1108) erscheinen die ersten

Polkörper 4 und 6 hemizygot für die Mutation und die Polkörper 7, 8 und 9 hemizygot für das Wildtypallel (Abbildung 1). Unter gemeinsamer Betrachtung des ersten Markers mit dem Marker KIR4 ist eine klare Heterozygotie der Polkörper 4 und 7 zu erkennen. Dieses zeigt, wie wichtig die gemeinsame Betrachtung aller untersuchten Marker ist, um eine Heterozygotie zu erkennen und das Risiko einer Fehldiagnose so weit wie möglich zu minimieren. Das Risiko eines ADO eines einzelnen Allels bei den unterschiedlichen Polkörpern und Markern erfordert den gleichzeitigen Einsatz mehrerer polymorpher Marker. Unterschiedliche ADO-Raten in Abhängigkeit von den untersuchten Zelltypen (Rechitsky, 1998), den untersuchten Regionen (Dreesen, 1996) oder den Lyse- und PCR-Bedingungen sind in der Literatur beschrieben (Gitlin, 1996, Ray, 1996). Versuche an einzelnen Fibroblasten, die Lyse- und PCR-Bedingungen zu optimieren, zeigten keine nennenswerten Verbesserungen der ADO-Rate bei den dargestellten Fällen. Es wurde anfänglich versucht, die multiplex-PCR an Polkörpern zu testen. Hierfür standen nur Polkörper zur Verfügung, die drei Tage nach der Befruchtung gewonnen wurden. Aufgrund des Alters der Polkörper war eine Amplifikation in den seltensten Fällen möglich. Die ADO-Rate war äußerst hoch.

Eine weitere, wenn auch sehr unwahrscheinliche Fehlerquelle, kann das ADO des Wildtypallels bzw. der Allele, die mit dem Wildtypallel koppeln, bei allen vier oder fünf unter-

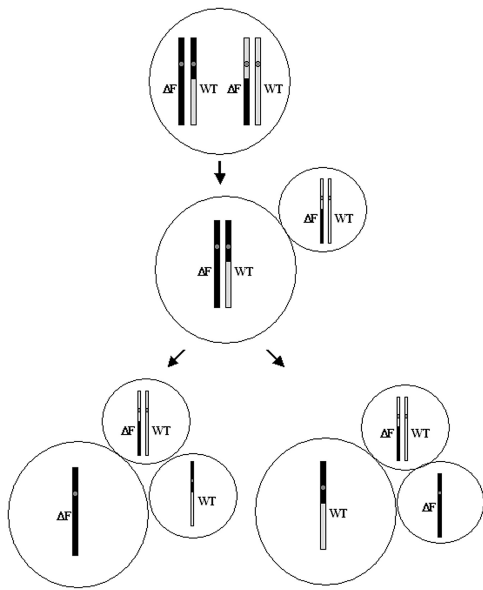


Abb 4 Schema der Verteilung unterschiedlicher Allele in den Polkörpern nach crossing-over in der Prophase der ersten meiotischen Teilung am Beispiel der Cystischen Fibrose

Bei einer Heterozygotie des ersten Polkörpers ist eine Aussage über die Eizelle nur nach Untersuchung des zweiten Polkörpers möglich.

WT = Wildtypallel
 ΔF = ΔF508 Mutation

suchten Markern in einem Polkörper sein. In einem solchen Fall bliebe eine Heterozygotie unentdeckt. Der Polkörper würde als Träger der Mutation identifiziert und die Eizelle (als vermeintlicher Träger des Wildtypallels) transferiert.

Die gemeinsame Betrachtung des ersten und zweiten Polkörpers der Eizelle 3 (Fallbeispiel II) zeigt eine andere Fehlerquelle auf. In dem ersten Polkörper der Eizelle 3 wurde eine Hemizygotie für das Wildtypallel nachgewiesen. Es wurde erwartet, dass in dem zweiten Polkörper die Mutation vorliegt. Wider Erwarten war der zweite Polkörper heterozygot (Tabelle 1). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist eine Non-disjunction während der ersten Meiose mit einer vorzeitigen Trennung der Chromatiden wie von Angel (1991) beschrieben. In diesem speziellen Fall wird nach der ersten meiotischen Teilung mit großer Wahrscheinlichkeit das Chromatid mit dem Wildtypallel im ersten Polkörper sein. Nach der zweiten meiotischen Teilung wird dann entweder ein Chromatid mit dem Wildtypallel und eines mit der Mutation in den zweiten Polkörper ausgeschleust, und ein Chromatid mit der Mutation bleibt in der Eizelle oder alle drei Chromatiden gelangen in den Polkörper (zwei mit der Mutation und eines mit dem Wildtypallel), so dass keines in der Eizelle bleibt (Abb. 3). Mangels einer quantitativen Beurteilung der PCR-Produkte kann zwischen den beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden.

Die Untersuchung der zweiten Polkörper wäre insbesondere bei der beobachteten hohen Heterozygotierate der ersten Polkörper sehr sinnvoll. Da die etablierte Diagnostik ca. 10 Stunden in Anspruch nimmt, kann ein Abschluß der Untersuchung der zweiten Polkörper vor der Verschmelzung der Vorkerne nicht gewährleistet werden. Darüber hinaus macht die Entnahme des zweiten Polkörpers eine weitere Manipulation an der zona pellucida erforderlich, wodurch die Entwicklung der Eizelle weiter beeinträchtigt werden könnte. In den geschilderten Fallbeispielen erfolgte eine Untersuchung der zweiten Polkörper aus wissenschaftlichem Interesse. Im Fallbeispiel I wurden sechs zweite Polkörper gewonnen. Eine diagnostische Aussage war in drei Fällen möglich. In den zweiten Polkörpern der Eizellen 2 und 4 (Abbildung 2) wurden Allele nachgewiesen, die mit der Mutation koppelten. Die ersten Polkörper zeigten eine Heterozygotie. Hätte diese Untersuchung in Rahmen einer Diagnostik erfolgen können, wären zwei weitere Eizellen für den Transfer geeignet gewesen. Ist der erste Polkörper heterozygot, entscheidet sich nach der zweiten meiotischen Teilung, ob die Eizelle die Mutation oder das Wildtypallel trägt (Abbildung 4). Es ist zu erwarten, dass durch Verbesserung der Techniken eine Untersuchung des ersten und zweiten Polkörpers auch für monogene Erkrankungen generell möglich werden wird.

Die Möglichkeit einer Rekombination muss auch bei der Auswahl der polymorphen Marker berücksichtigt wer-

den. Je größer die Entfernung zwischen zwei Markern auf einem Chromosom ist, um so höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Austausch der beiden homologen Chromosomen in der eingegrenzten Region stattfindet. Aus diesem Grund müssen die verwendeten Marker so dicht wie möglich an der zu untersuchenden Genregion liegen. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die genaue Lokalisation einzelner Marker auf einem Chromosom oft nicht bekannt ist und sie bei bekannten Markern je nach verwendeter Datenbank variieren kann.

Bei Untersuchungen an Einzelzellen, Blastomeren oder Polkörpern muß besonders streng auf die Vermeidung einer Kontamination geachtet werden. Unterschiedliche Maßnahmen wurden bei allen durchgeführten Polkörperuntersuchungen eingesetzt, um eine Kontamination zu vermeiden (Tomi, 2004 in press). Dennoch konnte bei dem geschilderten Fallbeispiel II in einer einzelnen Reaktion eine Kontamination nachgewiesen werden. Bei dem Polkörper 3 zeigte sich für den Marker D7S480 ein fremdes Allel (Tabelle 1). Die Auswertungen der Polkörper bei der Hämophilie (Fallbeispiels I) zeigten keinerlei Kontaminationen.

Schlußfolgerungen

Eine Polkörperuntersuchung stellt in Deutschland die einzige Möglichkeit für die Durchführung einer Präimplantationsdiagnostik dar. Im Vergleich zur Untersuchung von Blastomeren ist die Polkörperdiagnostik aber als eine

Art Notlösung zu betrachten. Bei dieser Untersuchung kann nur das weibliche Genom untersucht werden. Durch die hohe Heterozygotierate des ersten Polkörpers wird die Anzahl der Eizellen, die transferiert werden können, eingeschränkt. Um das Risiko einer Fehldiagnose zu minimieren, sollten mehrere polymorphe Marker gleichzeitig eingesetzt werden. Trotz der hohen diagnostischen Sicherheit ist aufgrund des experimentellen Zustandes eine Pränataldiagnostik im Falle einer Schwangerschaft zu empfehlen. Durch die Untersuchung des zweiten Polkörpers kann eine höhere Sicherheit in der Beurteilung der Eizellen erreicht werden mit evtl. folgender Erhöhung der Schwangerschaftsrate.

Literatur

- Angell RR (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86: 383-387.
- Dreesen JC, Bras M, Coonen E, Dumoulin JC, Evers JL, Geraedts JP (1996) Allelic dropout caused by allele-specific amplification failure in single-cell PCR of the cystic fibrosis DF508 deletion. *J Assist Reprod Genet* 13: 112-114.
- ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium data collection III (Maij 2001). *Hum Reprod* 17: 233-246.
- Gitlin SA, Lanzendorf SE, Gibbons WE (1996) Polymerase chain reaction amplification specificity: incidence of allele dropout using different DNA preparation methods for heterozygous single cells. *J Assist Reprod Genet* 13: 107-111.
- Ludwig M, Pergament D, Schwinger E, Diedrich K (2000) The situation of preimplantation genetic diagnosis in Germany: legal and ethical problems. *Prenat Diagn* 20: 567-570.
- Montag M, van der Ven K, Delacretaz G, Rink K, van der Ven H (1998) Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril* 69:539-42.
- Ray PF, Winston RM, Handyside AH (1996) Reduced allele dropout in single-cell analysis for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *J Assist Reprod Genet* 13: 104-106.
- Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukhareno V, Kuliev A, Verlinsky Y (1998) Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 15: 253-257.
- Schaaff F, Wedemarm H, Schwinger E (1996) Analysis of sex and DF508 in single amniocytes using primer extension preamplification. *Hum Genet* 98: 158-161.
- Schopper B, Ludwig M, Edenfeld J, Al-Hasani S, Diedrich K (1999) Possible applications of lasers in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 14 Suppl: 186-193.
- Schwinger E (2002) Present state and possibilities for the further development of prefertilization and preimplantation genetic diagnosis in Germany. In: Editors: Milan Macek Sr., Diana W. Bianchi, Howard Cuckle; *Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother*. Prague: Charles University in Prague, The Karolinum Press, 228-230.
- Schwinger E, Tomi D, Voigt R, Eckhod J, Hinrichs F, Diedrich K (2003) Why using polar bodies for aneuploidy and cystic fibrosis diagnosis for pre-implantation genetic diagnosis in Germany? *Balkan Journal of Medical Genetics* 6 Suppl: 15-16.
- Strom CM, Ginsberg N, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, Moise J, Valle J, Kaplan B, White M, Barton J, Kuliev A, Verlinsky Y (1998) Three births after preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis with sequential first and second polar body analysis. *Am J Obstet Gynecol* 178: 1298-1306.
- Tomi D, Voigt R, Eckhold J, Hinrichs F, Griesinger G, Schulze-Mosgau A, Schöpfer B, Al-Hasani S, Diedrich K, Schwinger E (2003) Pre-Implantation genetic diagnosis using polar bodies. *Balkan Journal of Medical Genetics* 6 Suppl: 17-24.
- Tomi D, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Eckhold J, Schöpfer B, Al-Hasani S, Diedrich K, Schwinger E (2004) *J. Histochem. Cytochem* (in press)
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 5: 826-829.
- Verlinsky Y, Kuliev A (1996) Preimplantation Polar Body Diagnosis. *Biochem Mol Med*. 58:13-17.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Walle J, White M, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1997) Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med*. 62:182-187
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Borkowski A, Nefedova J, Goltsman E, Strom C, Kuliev A (1999) Prepregnancy testing of single-gene disorders by polar body analysis. *Genet Testing* 3: 185-190

Korrespondenzadresse

Dr. Diana Tomi
Institut für Humangenetik
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck
Tel. 0451-500 2621
Fax 0451-500 4187
dianatomi@hotmail.com

Links

Reproduktionsgenetik Reproduktionsmedizin

Einbecker Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Medizinrecht (DGMR) e.V. zu

Rechtsfragen der präimplantationsgenetischen Diagnostik (2004)

unter: <http://www.medizin.uni-koeln.de/dgmr/empfehlungen/empf11.html>

Deutsche Gesellschaft für Reproduktionsmedizin

<http://www.repromedizin.de/>

AG Reproduktionsgenetik

<http://www.repromedizin.de/ag-reproduktionsgenetik/index.html>