



Genetische Diagnostik bei Infertilität

Die Zahl der ungewollt kinderlosen Paare in Deutschland liegt bei ca. 15% (1). Die Fortschritte in der Reproduktionsmedizin, insbesondere seit der Einführung des direkten Mikroinjektionsverfahren von Spermien (ICSI), ermöglichen es nun auch prinzipiell einer Reihe von infertilen Paaren ihren Kinderwunsch zu erfüllen. Ist die Ursache der Infertilität allerdings eine Chromosomenaberration oder ein molekulargenetischer Defekt in einem Gen, ist eine Übertragung dieser genetischen Anomalie auf die Nachkommenschaft möglich. In der Routinediagnostik werden folgende drei zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungstechniken von der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin 2004 (2) empfohlen, um Betroffene erkennen und entsprechend beraten zu können.

Zytogenetische Aberrationen bei Männern

Ca. 13,1% der Männer mit Azoospermie und ca. 4,3% der Männer mit Oligozoospermie weisen chromosomale Anomalien auf. Bei Männern mit Azoospermie können 93% der chromosomalen Anomalien auf *Aberrationen der Geschlechtschromosomen* zurückgeführt werden, wobei hier 47,XXY (Klinefelter-Syndrom) dominiert. Infertilität ist bei 47,XXY Männern ohne Mosaik fast unvermeidlich. Männer mit Mosaiken XXY/XY können hingegen Spermien in variabler Anzahl produzieren. Bei Männern mit Oligozoospermie dominieren *Aberrationen der autosomalen Chromosomen*, wobei die Robertson - Translokationen (vor allem 13;14), gefolgt von reziproken Translokationen, überwiegen.

Die Vererbungsmuster von *Robertson-Translokationen* sind komplex und abhängig von den beteiligten Chromosomen und dem Geschlecht des Trägers. Im Gegensatz zu Frauen ist bei Männern mit einer Robertson-Translokation (13;14) das Risiko eines Nachkommens mit einer unbalancierten Translokation sehr gering (<1%), da die Produktion abnormer Spermatozoen wahrscheinlich selektionsbedingt gering ist.

Bei Trägern von *reziproken Translokationen* variiert die Wahrscheinlichkeit eines Nachkommen mit abnormalem Chromosomensatz zwischen 0-50% in Abhängigkeit von den beteiligten Chromosomen und der Größe der Rearrangements. Die Wahrscheinlichkeit für eine Chromosomenanomalie ist umso größer, je geringer die Spermienzahl ist. Es besteht jedoch kein

Zusammenhang zwischen Spermienmorphologie bzw. Spermienmotilität und dem Risiko für chromosomale Anomalien.

Ca. 2,5-4% der Frauen mit einer Indikation für eine IVF weisen Chromosomenaberration wie *numerische gonosomale Mosaik* (45,X/46,XX oder 45,X/47,XXX/46,XX etc.) oder *reziproke Translokationen* auf. Bei Paaren die ICSI (intracytoplasmic sperm injection) in Anspruch nehmen, weisen nicht nur die männlichen Partner (4,6%) sondern interessanterweise auch die Partnerinnen (1,8-5%) eine erhöhte Rate an Chromosomenanomalien auf.

Indikation: Infertilität unklarer Genese

Material: 10 ml unzentrifugiertes Li-Heparinblut

Methode: Karyotypanalyse nach Kurzzeitkultivierung

Genefekte: Mutationen im CFTR-Gen

Bei ca. 2% aller Männer mit Infertilität ohne Zeichen einer Cystischen Fibrose (CF, Mukoviszidose), bei ca. 6% der Patienten mit obstruktiver Azoospermie und bei 99% aller männlichen, adulten CF-Patienten liegt eine ein- oder beidseitige Abwesenheit der Samenstränge (Congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD) vor (4,5). CF ist eine der häufigsten autosomal rezessiven Erkrankungen in der kaukasischen Bevölkerung (Trägerfrequenz 1:25), welche durch Mutationen im CFTR-Gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) hervorgerufen wird. Über 900 Mutationen des CFTR-Gens wurden beschrieben, wobei 88% der CF-Patienten Homozygot für zwei „schwere“ Mutationen und 11% compound (=zusammengesetzt) heterozygot für eine „schwere“ und eine „milde“ Mutation sind. Ca. 65% der Patienten mit CBAVD weisen Mutationen im CFTR-Gen auf und prägen entweder eine schwache Cystische Fibrose aus oder sind symptomfrei. Ca. 88% dieser CBAVD-Patienten sind compound heterozygot für eine „schwere“ und eine „milde“ CFTR-Gen-Mutation, 12% weisen „milde“ Mutationen auf beiden elterlichen CFTR-Allelen (Genkopien) auf. Allerdings findet man bei CBAVD andere Kombinationen von mutanten Allelen als bei CF. Neben einer compound Heterozygotie für R117H und Δ F508 besteht der häufigste, mit CBAVD assoziierte Genotyp aus dem 5T-Allel in Verbindung mit einer schwerwiegenden Mutation. Die Zahl der TG-

Repeats in der Nachbarschaft eines 5T-Allels hat einen Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps (6).

Das Risiko einer CF für Nachkommen von (ungetesteten) CBAVD Paaren, die sich ICSI unterziehen liegt zwischen 1:100 und 1:200, wenn man davon ausgeht, dass die meisten CBAVD-Patienten eine schwere CF auslösende CFTR-Mutation besitzen und die *a priori* Trägerfrequenz bei den Partnerinnen je nach Herkunft bis zu 1:25 beträgt. Daher sollte bei CBAVD auch die Partnerin auf Mutationen im CFTR-Gen getestet werden.

Indikation: Männer mit CBAVD und deren Partnerin, ggf. männliche Infertilität unklarer Genese

Material: 5 ml EDTA-Blut

Methode:

Stufe 1: Sequenzanalyse der häufigsten Mutationen im CFTR-Gen (gemäß EBM)
abhängig von dem Ergebnis in Stufe 1

Stufe 2: Komplettanalyse des CFTR-Gens (MLPA und Sequenzierung)

Y-Mikrodeletionen: Mutationen in dem Azoospermiefaktor

Der auf dem Y-Chromosom gelegene Azoospermiefaktor (AZF) ist für die Spermatogenese von essentieller Bedeutung und wird auf der Region Yq11 in 3 Subintervalle AZFa, AZFb und AZFc unterteilt. Ca. 4-14% der Patienten mit nicht-obstruktiver Oligozoospermie und ca. 11-18% der Patienten mit Azoospermie weisen mikroskopisch nicht erfassbare Mikrodeletionen in diesen Bereichen auf (7).

Die Y-Gene im AZFa Locus sind in der Embryogenese und im Kindesalter für die Bereitstellung und Differenzierung der Spermatozonen von Bedeutung, die Y-Gene im AZFb und AZFc Locus sind für Reifung der Spermatozonen wichtig. Eine AZFa Deletion ist häufig mit einem Fehlen von Keimzellen verbunden, so dass eine testikuläre Spermienextraktion (TESE) eher erfolglos sein wird. Bei einer AZFb Mikrodeletion ist die Chance für das Auffinden von Spermien sehr gering. Bei der am häufigsten vorkommenden AZFc Mikrodeletion findet sich ein sehr variabler Phänotyp von Azo- bis Oligozoospermie (8).

Im Falle einer AZF-Deletion sind männliche Nachkommen nach ICSI ebenfalls Träger dieser Deletion und werden mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls subfertil bzw. infertil sein. Dabei ist jedoch eine mögliche variable Expressivität zu beachten.

Indikation: Infertile Männer mit nicht obstruktiver, idiopathischer Azoospermie, Oligozoospermie, Kryptospermie, Sertoli Cell Only-Syndrom, OAT (Oligoasthenoteratozoospermie)-Syndrom

Material: 5ml EDTA-Blut

Methode: DNS-Isolierung mit anschließender Amplifikation von 6 nicht-polymorphen STS-Markern aus den Regionen AZFa, AZFb und AZFc

des Y-Chromosoms. Nachweis einer Deletion mittels Gelelektrophorese

Zytogenetische Aberrationen bei Frauen

Chromosomenstörungen bei der Frau finden sich bei ca. 3,3-9,8 % aller infertilen Paare. Als häufigste Aberration ist das Ullrich-Turner-Syndrom (45,X) zu nennen. Bis zu 50% der Trägerinnen zeigen Mosaikbefunde unter anderem mit strukturellen Aberrationen des X-Chromosoms (39%), mit einem derivativen Y-Chromosom (6%) oder mit numerischen Aberrationen (7%). Bei einigen Mosaikbefunden (z.B. mos 45,X/46,XX) kann es zur Keimzellbildung kommen. Da das Risiko für eine prämatüre Ovarialinsuffizienz (POI) bei Betroffenen erhöht ist, sollte eine rechtzeitige Realisierung eines Kinderwunsches empfohlen werden, beziehungsweise die Abklärung der ovariellen Reserve und gegebenenfalls Asservierung von Eizellen. Im Fall eines Mosaiks mit Anteilen des Y-Chromosoms unter Beteiligung des SRY-Gens ist ein erhöhtes Gonadoblastom-Risiko zu berücksichtigen.

Bei Frauen mit **47,XXX-Karyotyps** (Inzidenz etwa 1:1000) ist die Fertilität in jungen Jahren gegeben, doch liegt ein erhöhtes Risiko für eine POI vor.

Bei infertilen/subfertilen Frauen werden auch vermehrt strukturelle Chromosomenaberrationen gefunden, allerdings seltener als bei infertilen Männern. Betreffen sie das X-Chromosom, können sie ein erhöhtes Risiko für eine POI bedingen.

Das Risiko für chromosomal kranke Kinder bei elterlichen strukturellen Chromosomenveränderungen muss je nach Art der Chromosomenaberration beurteilt werden. Bei gonosomalen numerischen Aberrationen liegt in der Regel kein gegenüber der Durchschnittsbevölkerung erhöhtes Wiederholungsrisiko vor.

Indikation:

Infertilität unklarer Genese

Material:

5 ml unzentrifugiertes Heparinblut

Methode:

Karyotypisierung nach Kurzzeitkultivierung

Gendiagnostik:

FMR1 (Fragile X mental Retardation 1)-Gen

Als Ursache für einen frühen Eintritt der Menopause vor dem 40. Lebensjahr findet sich bei ca. 10-15% der betroffenen Frauen eine Verlängerung eines Tripletrepeats im FMR1-Gen im Sinn einer Prämutation. In der Eizellreifung kann es zur weiteren Verlängerung des CGG-Tripletrepeats in den Bereich der Vollmutation kommen. Dieses Gen ist ursächlich für das Fragile-X-Syndrom (fra(X)-Syndrom), der häufigsten monogen bedingten Ursache einer Entwicklungsverzögerung und mentalen Retardierung. Aufgrund der X-chromosomalen Vererbung findet sich das Vollbild der Erkrankung bei betroffenen Jungen und Männern, seltener bei Mädchen und Frauen.

FMR1-Prämutationsträgerinnen haben ein Risiko von ca. 20% für eine POI. Außerdem ist das Risiko

für ein „Fragile X Related Tremor/Ataxia Syndrome“ (FXTAS) erhöht. Prämutations-trägerinnen haben ein erhöhtes Risiko für Nachkommen mit einer mentalen Retardierung (fra(X)-Syndrom).

Indikation:

Frauen mit Fertilitätsstörungen und erhöhten FSH-Werten vor dem 40. Lebensjahr oder POI/Menopause bei zwei Familienmitgliedern bei unauffälligem Karyogramm

Material:

10 ml EDTA-Blut

Methode:

DNA-Amplifikation (PCR) des variablen Bereichs im Exon 1 des FMR1-Gens zum Nachweis einer CGG-Expansion, Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese, gegebenenfalls Southern Blot nach EcoRI / EagI-Restriktionsverdau

21-Hydroxylase-Defizienz (CYP21A2-Gen)

Beim Adrenogenitalen Syndrom (AGS) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die überwiegend durch Mutationen im 21-Hydroxylase-Gen (CYP21A2) auf Chromosom 6p21.3 verursacht wird. Klinisch unterscheidet man das klassische kongenitale AGS von der late-onset Form (Prävalenz 1:1000), wobei sich Letzteres bei erwachsenen Frauen vor allem durch polyzystische Ovarien, Zyklusstörungen und Oligo-Amenorrhoe, Hirsutismus und Akne manifestieren kann. Verursacht wird das late-onset AGS durch Homozygotie einer "milden" Mutation oder durch kombinierte (compound) Heterozygotie einer "milden" und einer "schweren" Mutation im 21-Hydroxylase-Gen.

Indikation:

Verdacht auf 21-Hydroxylase-Defizienz (late-onset Form)

Material:

5 ml EDTA Blut

Methode:

Sequenzierung des CYP21A2-Gens, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplifikation (MLPA)

Empfehlung:

Im Fall einer Homozygotie oder Compound-Heterozygotie sollte unbedingt der Partner untersucht werden, da die Heterozygotenfrequenz in Zentraleuropa bei 1:50 liegt. Erhält ein Kind von beiden Elternteilen eine „schwere“ Mutation, kann es an der klassischen Form eines kongenitalen AGS erkranken. Bei spezifischen Fertilitätsstörungen oder Syndromverdacht können weitere gezielte Analysen angezeigt sein.

Weiterführende laboratoriumsmedizinische Differentialdiagnostik

- Spermogramm
- Endokrine Störungen: Testosteron, Östradiol, DHT, LH, FSH, TSH, Prolaktin
- Ggf. bakteriologische und virologische Abklärung
- Antikörper gegen Spermien

Begriffserklärungen

Unauffälliger Chromosomensatz: 44 Autosomen und 2 Gonosomen (Karyotyp 46,XY bzw. 46,XX)

Numerische Chromosomenanomalien: die Zahl betreffend

Strukturelle Chromosomenanomalien: Umbauten innerhalb eines Chromosoms oder zwischen verschiedenen Chromosomen.

- **Balanciert:** ohne Verlust und/oder Zugewinn von chromosomalem Material;
->meist keine klinische Symptomatik
- **Unbalanciert:** mit Verlust und/oder Zugewinn;
->Ursache einer syndromalen Erkrankung
- **Reziproke Translokation:** wechselseitiger Austausch von Chromosomensegmenten ohne erkennbaren Materialverlust.
- **Robertson Translokation:** Fusion der langen Arme zweier akrozentrischen Chromosomen mit Verlust der kurzen Arme. Da die kurzen Arme keine Einzelgene enthalten, bedingt der Verlust keine phänotypischen Veränderungen; z. B.,erbliche“ Trisomie 21, Sterilität.

Literatur:

- 1.) Bruckert E.; How frequent is unintentional childlessness in Germany?; Andrologia, 1991, 23 (3): 245-50
- 2.) Ludwig M. et al.: Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin: Empfehlungen zur genetischen Diagnostik bei Kinderwunschpaaren. J Reproduktionsmed. Endokrinol, 2004, 1(3): 190-3
- 3.) Mau U.A.: Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenet Genome Res, 2005, 111: 317-336
- 4.) Jarzabek K. et al.: Cystic fibrosis as a cause of infertility. Reproductive Biology, 2004, 4 (2): 119 – 129
- 5.) Dohle G. R. et al.: The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical, electrophysiological and genetic data. Human Reproduction, 1999, 14: 371-374
- 6.) Cuppens H. et al.: CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. Int J Androl, 2004, 27: 251-256
- 7.) Vogt P. H. : Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. Reproductive BioMedicine Online, 2005, 10 (1): 81-93
- 8.) Foresta C. et al.: Y Chromosome micordeletions and alterations of spermatogenesis. Endocr Rev , 2001, 22: 226-239