

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Leiter: Prof. Dr. K. D. Zang)  
Fachbereich 3 (Theoretische Medizin)  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Subtelomer-Screening bei 70 pädiatrischen  
Patienten mit ungeklärter geistiger Behinderung  
-Diskussion von Genotyp-Phänotyp-Korrelation-**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

**2007**

vorgelegt von:  
Michaela Brand  
geboren am 07.09.1976, in Krefeld

1. Tag der Promotion:
2. Dekan:
3. Berichterstatter:

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Geistige Behinderung (Mentale Retardierung)	3
2.2	Subtelomerregion	6
2.3	Molekular-zytogenetische Verfahren	7
2.4	Eigene Fragestellungen	9
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
3.1.	Untersuchungsmaterial	10
3.2	Methoden	13
3.2.1	Chromosomenpräparation aus Vollblut	13
3.2.2	Prinzip FISH (Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung)	15
3.2.2.1	Spectral Karyotyping (SKY)	19
3.2.2.2	Chromoprobe Multiprobe T-System	23
3.2.2.3	ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panel	32
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1	Gesamtübersicht	38
4.2	Informative Fälle	41
4.2.1	Fall 1 (Patient 16)	41
4.2.2	Fall 2 (Patient 49)	49
4.2.3	Fall 3 (Patient 62)	55
4.2.4	Fall 4 (Patient 63)	60
4.3	Chromosomale Polymorphismen	64

---

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1.	Methodische Aspekte	67
5.1.1	Chromoprobe Multiprobe T-System	67
5.1.1.1	Praktische Durchführung und Zeitintensität	67
5.1.1.2	Störfaktoren und Qualitätseinschränkungen	68
5.1.1.3	Kosten/Nutzen-Relation	71
5.1.2	ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panel	71
5.1.2.1	Praktische Durchführung und Zeitintensität	71
5.1.2.2	Störfaktoren und Qualitätseinschränkungen	72
5.1.2.3	Kosten/Nutzen-Relation	73
5.1.3	Subtelomerische Sonden versus konventionelle Zytogenetik	73
5.1.4	Spectral Karyotyping (SKY)	75
5.1.4.1	Praktische Durchführung und Zeitintensität	75
5.1.4.2	Störfaktoren und Qualitätseinschränkungen	76
5.1.4.3	Kosten/Nutzen-Relation	77
5.1.5	Subtelomerische Sonden versus SKY	77
5.2	Bewertung der Ergebnisse	80
5.2.1	Diskrepanz der Prävalenzen	80
5.2.2	Checkliste	83
5.2.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	85
5.2.4	Ausblick	88
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>105</b>

## Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
abs	absolut
AK	Antikörper
Aqua dest	destilliertes Wasser
bds	beidseits
bio-16-dUTP	mit Biotin über eine Kohlenstoffkette verknüpft Desoxyuridintriphosphatmolekül
bp	Basenpaare
bphg	Banden pro haploides Genom
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cen	zentromernahes Heterochromatin
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylidol
deion	deionisiert
d.h.	das heißt
dig-11-dUTP	mit Digoxigenin über eine Kohlenstoffkette verknüpft Desoxyuridintriphosphatmolekül
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DOP	degenerate oligonucleotide primed
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälber Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTG/G-Bänderung	Giemsa-Trypsin -Bänderung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HR-CGH	Hochauflösende vergleichende genomische Hybridisierung
Hyb-Mix	Hybridisierungs-Mix
ISH	In situ- Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LOH	Loss of heterozygosity, Verlust eines Allels durch dessen heterozygote Deletion
M	Molar
MAPH	multiplex amplifiable probe hybridisation
M-FISH	multi-fluor Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-TEL	multiplex FISH telomere
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OT	Objektträger
p	kurzer Arm des Chromosoms
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGFB	platelet derived growth factor B
pg	Pikogramm
q	langer Arm des Chromosoms

---

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SHH-Gen	Sonic-Hedge-Hog-Gen
SKY	Spectral-Karyotyping
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
Tab	Tabelle
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vergl.	vergleiche
Vol	Volumen
VSD	Ventrikelseptumdefekt
W	Watt
WCP	whole chromosome paint
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WHS	Wolf-Hirschhorn-Syndrom
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 1. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass submikroskopische Chromosomenveränderungen in der Nähe der Telomere eine häufige Ursache für genetisch bedingte Fehlbildungen und Krankheiten sind. Besonders bei geistig mittel bis schwer behinderten Kindern ungeklärter Ursache wurden Aberrationen im Subtelomerbereich der Chromosomen mit einer Häufigkeit von bis zu 7,4% nachgewiesen (KNIGHT et al 1999). Ein Screening der Subtelomerregionen ist bislang allerdings eine sowohl methodisch als auch bezüglich der erforderlichen Arbeitszeit aufwendige Untersuchung. Im Bemühen um Kostenbegrenzung wurde daher versucht, schärfere Kriterien aufzustellen, die eine solche Untersuchung rechtfertigen. Die Arbeitsgruppe DE VRIES et al. (2001) hat eine solche Checkliste mit fünf Einschlusskriterien entwickelt, nämlich 1. familiäre geistige Behinderung, 2. pränatale Wachstumsretardierung, 3. postnatale Wachstumsstörung, 4. faziale Dysmorphiezeichen, 5. nicht-faziale Dysmorphiezeichen und Organfehlbildungen.

Nach diesen Kriterien haben auch wir unser Patientenkollektiv ausgewählt. Es besteht aus 70 Säuglingen, Kleinkindern und Jugendlichen mit einer geistigen Behinderung ungeklärter Ursache und mit unauffälligem GTG-gebänderten Karyogramm (550-Bandenniveau). Wir suchten mit drei unterschiedlichen auf Fluoreszenz-in-situ-Hybridierung (FISH) basierenden Nachweisverfahren, nämlich „SKY“ (Applied Spectral Imaging Inc.), „Chromoprobe Multiprobe T-System“ (Cytocell Ltd.) und „Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures“ (Vysis Inc.), nach subtelomerischen Veränderungen. In vier von 70 Fällen konnten wir ein entsprechendes Rearrangement nachweisen. Das entspricht einer Prävalenz von 5,7%. Fall1: 46,XX,der(4)t(4;20)(p16;q13); Fall2: 46,XY,del(8)(p23); Fall3: 46,XY,7p+;7q-; Fall4: 46,XX, der(1),t(1;22)(p36;q13). In drei der vier Fälle ergaben sich auch plausible Hinweise für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation der gefundenen Subtelomerveränderungen. Als aussagekräftigste und einfachste der in dieser Arbeit verwandten Nachweismethoden, stellte sich die FISH-Methode der Firma Vysis heraus.

Die Weiterentwicklung von Screeningmethoden für den Subtelomerbereich der Chromosomen ist in Hinblick auf die hohe Prävalenz struktureller Veränderungen gerechtfertigt und sinnvoll. Es ist allerdings anzunehmen, dass mittel- bis langfristig die Weiterentwicklung der FISH-Analyse als molekulare Karyotypisierung auf Basis der Array-Based Comparative Genomic Hybridisation (LUCITO et al, 2003, ISHKANIAN et al, 2004) wegen ihre Robustheit, Einfachheit, Schnelligkeit, Sensitivität, Automatisierbarkeit und einer

theoretisch möglichen Auflösung bis auf Einzelnukleotidebene, die heute üblichen (Subtelomer-) Screeningverfahren ablösen wird. Dieses Verfahren stand zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen noch nicht zur Verfügung.

### **Abstract**

In the past years, research has shown that submicroscopic changes in proximity to the telomeres of chromosomes frequently cause malformations and illnesses with a genetic aetiology. Aberrations in the subtelomeric area of chromosomes in children with moderate to severe mental retardation of unknown pathogenesis, have been shown to be at a frequency of up to 7,4% (KNIGHT et al 1999). Screening of the subtelomeric regions, however, is until now an elaborate as well as costly operation. In the interest of cost saving, an attempt has been made to establish more specific criteria to justify such a screening. The research group of DE VRIES et al. (2001) has established a checklist containing the following inclusion criteria 1.) familial mental retardation, 2.) prenatal growth retardation, 3.) postnatal growth retardation, 4.) facial signs of dysmorphism, 5.) non facial dysmorphism and organic malformations.

We selected our patients according to these criteria. The sample consists of 70 infants, children and adolescents with mental retardation of unknown aetiology and inconspicuous GTG-banded karyogram (550 band level). We applied three different fluorescence-in-situ-hybridisation (FISH) based methods, „SKY“ (Applied Spectral Imaging Inc.), „Chromoprobe Multiprobe T-System“ (Cytocell Ltd.) and „Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures“ (Vysis Inc.), in order to detect subtelomeric changes. In 4 of 70 cases we were able to show a chromosomal rearrangement. This corresponds with a prevalence of 5, 7%.

Case 1: 46,XX,der(4)t(4;20)(p16;q13); Case 2: 46,XY,del(8)(p23); Case 3: 46,XY,7p+;7q-; Case 4: 46,XX, der(1),t(1;22)(p36;q13). In 3 of the 4 cases there were plausible genotype-phenotype correlations of the shown subtelomeric changes. The FISH method of Vysis company was found to be the simplest and most valid method in this study.

Further development of screening methods for the subtelomeric region is important and justified in light of the high prevalence of structural changes in chromosomes. It is to be expected that middle to long term development of the FISH analysis as molecular karyotyping on the basis of Array-Based Comparative Genomic Hybridisation, due to its robust nature, simplicity, sensitivity, chance for automatization and a theoretically possible resolution down to single nucleotides, will eventually eliminate current subtelomeric screenings methods. This method was not yet available at the time of this study.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Geistige Behinderung (Mentale Retardierung)**

Die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neuropädiatrie (2001) definieren geistige Behinderung (mentale Retardierung) als Verzögerung der geistigen Entwicklung, welche sich in einem Rückstand von kognitiven, sprachlichen und sozialen Fähigkeiten äußert. Geistige Entwicklung vollzieht sich in stetem Wechselspiel zwischen genetisch-konstitutionellen und umweltabhängigen sowie sozialen Faktoren. Geistige Behinderung resultiert häufig in einer geistigen Behinderung mit Minderung von Intelligenzleistung und sozialen Fähigkeiten (IQ unterhalb der Normvariation). Man unterscheidet nach der ICD-10 Klassifikation psychischer Störungen (Weltgesundheitsorganisation kurz WHO, 2001) Lernbehinderung (IQ 85-70), leichte (IQ 69-50), mäßige (IQ 49-35), schwere (IQ 34-20) und schwerste (IQ<20) Intelligenzminderung. Die geistige Behinderung im Sinne einer Störung der primären geistigen Entwicklung ist abzugrenzen von der Demenz, bei welcher bereits erworbene kognitive und soziale Fähigkeiten in Folge eines Krankheitsprozesses verloren gehen. Ziel der Diagnostik bei unklarer geistiger Behinderung sollte zunächst die Bestimmung des kindlichen Entwicklungsstandes in verschiedenen Funktionsbereichen (Kognition, Sprache, Motorik, Wahrnehmungsverarbeitung, soziale Adaptation etc) sein. Dies ist klassischerweise das Aufgabengebiet der Pädiater/Neuropädiater. Daraufhin folgt die Klärung der Ätiologie und Pathogenese der Entwicklungsverzögerung. Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neuropädiatrie (2001) ist häufig schon nach Erhebung der ausführlichen Anamnese und des klinischen Befundes eine zureichende Stellungnahme möglich. Die Anamnese besteht aus den folgenden vier Säulen:

- 1) Familienanamnese: Stammbaumanalyse über mindestens drei Generationen.
- 2) Anamnese von Schwangerschaft, Geburt, und ersten Lebensmonaten: Schwangerschaftskomplikationen, Medikamenten- und Drogenexposition, pränatale Dystrophie und Mikrozephalie, extreme Frühgeburt, ausgeprägte perinatale Asphyxie, schwere neonatale Komplikationen.
- 3) Entwicklungsanamnese: Rekonstruktion des Entwicklungsverlaufes.
- 4) Aktuelle Anamnese: Fähigkeiten und Fertigkeiten des Kindes, Sozialverhalten, körperliche Befindlichkeit, Erkrankungen.

Bei der Erhebung des klinischen Befundes ist das Vorgehen jeweils dem Entwicklungsstand des Kindes anzupassen. Häufig sind wiederholte Untersuchungen nötig, um den Einfluß situativer Faktoren und die Entwicklungsdynamik zu beurteilen. Die klinische Untersuchung besteht aus den drei Säulen:

- 1) (Neuro)pädiatrische und kinderpsychiatrische Untersuchung: Anthropometrische Daten incl. Kopfumfang. Große und kleine phänotypische Besonderheiten, Dokumentation nach Qualität und Quantität. Internistisch-pädiatrischer Befund. Neurologischer Befund. Kontaktverhalten, Reaktionsfähigkeit, Aufmerksamkeit, Konzentration, Anweisungsverständnis, Sprache (Verständnis, Produktion) und affektive Reaktionen.
- 2) Weitere fachärztliche Untersuchungen z.B. zum Ausschluß/Nachweis von Hör- und Sehstörungen.
- 3) Entwicklungsdiagnostik: Entwicklungstests (z.B. Münchner Funktionelle Entwicklungsdiagnostik), Erfassung spezifischer Funktionen (z.B. Intelligenzleistung, sprachliche Fähigkeiten) und Motodiagnostik zur Beurteilung grob- und feinmotorischer Fähigkeiten.

Nach der Anamneseerhebung und der Erhebung des klinischen Befundes wird eine Verdachtsdiagnose (mit eventuell zu bedenkenden Differentialdiagnosen) bezüglich der Ätiologie der geistigen Behinderung erstellt. Eine gute Übersicht zu möglichen Ätiologien bietet die Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1 (BRUNNHUBER et al, 2004)

<b>Pränatal entstandene Formen</b>	1) Genetisch bedingt  2) Exogen verursacht	z.B. durch Chromosomenanomalien wie partielle Trisomien/Monosomien, Gonosomale Aberrationen, Mikrodeletionssyndrome etc  z.B. durch Infektionen (z.B. Röteln) oder toxisch z.B. durch Alkohol oder Strahlen
<b>Perinatal entstandene Formen</b>	Geburtstraumata	z.B. durch Sauerstoffmangel oder Frühgeburt

<b>Postnatal entstandene Formen</b>	Schäden	z.B. durch Schädel-Hirn-Traumata, Entzündungen und Tumoren in den ersten Lebenswochen und -monaten
-------------------------------------	---------	--

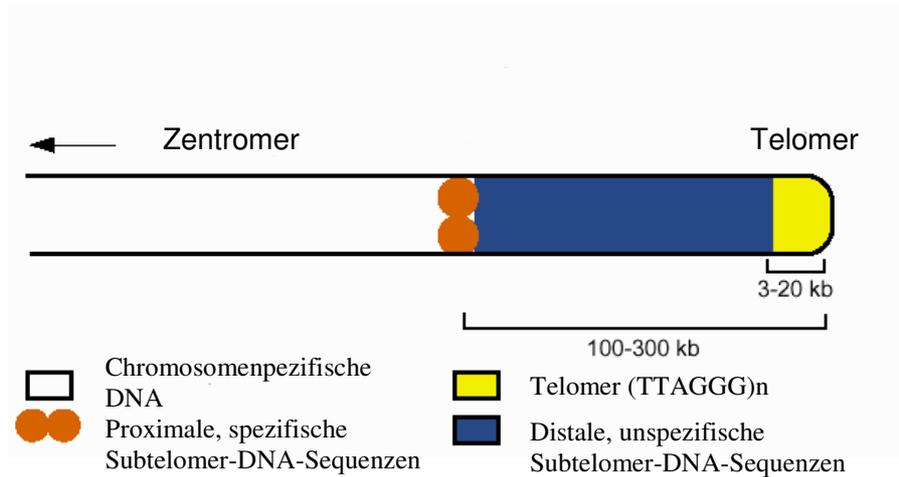
Unter den geistigen Behinderungen ist die leichte Intelligenzminderung mit 80% am häufigsten vertreten. Es folgen die mittelgradige Intelligenzminderung mit ca. 12%, die schwere Intelligenzminderung mit ca. 7% und die schwerste Intelligenzminderung mit weniger als 1% (BRUNNHUBER et al, 2004). In epidemiologischen Studien liegt der Anteil der geistig Behinderten in der deutschen Gesamtbevölkerung bei etwa 2-3% (für Kinder und Jugendliche differenziert nach Geschlechtern: 5,4% bei den Jungen und 2,9% bei den Mädchen). Trotz des medizinischen Fortschrittes ist die Ätiologie bei ca. 50% der von geistiger Behinderung betroffenen nicht bekannt (BRUNNHUBER et al, 2004). Die Epidemiologie der deutschen Daten deckt sich mit derer internationaler Daten. Diverse internationale Arbeitsgruppen (u.a. HAGBERG et al, 1981; LAMONT et al, 1988; BUNDEY et al 1989 und FLINT et al, 1995) stellten ebenfalls fest, dass die geistige Behinderung eine häufige Erkrankung darstellt (betroffen sind auch im internationalen Durchschnitt ca. 3% der Bevölkerung). Bei den ca. 50% ätiologisch sicher abgeklärten Patienten liegt die Ursache von ca. 40% der schwergradigen Intelligenzminderungen und von ca. 10-20% der leichtergradigen Intelligenzminderungen einerseits in numerischen Chromosomenanomalien, welche sich durch Abweichen der Anzahl der Chromosomen vom normalen diploiden Chromosomensatz erkennen lassen, andererseits in strukturellen Chromosomenanomalien, die zum Teil durch die zytogenetische Diagnostik mit GTG-gebänderten Karyogrammen (550-Bandenniveau) erkannt werden können (FLINT et al, 1995; KNIGHT et al, 1999 und 2000).

In den vergangenen Jahren kam die Hypothese auf, dass von den 50% der chromosomal nicht erkennbaren Patienten wiederum zwischen 0% und 23%, im Durchschnitt 5,8% (BIESECKER et al, 2002; WALTER et al, 2004), strukturelle Veränderungen im subtelomerischen bzw. telomerischen Bereich aufweisen, welche mit der zytogenetischen Routinediagnostik nicht erfasst werden kann. Die hohe Diskrepanz der genannten Prävalenzen (zwischen 0% und 23%) wird im Rahmen des Diskussionsabschnittes dieser Arbeit detailliert thematisiert (siehe ab S. 80).

## 2.2 Subtelomerregion

Anhand des Aufbaus dieses abstrahierten Chromosoms wird folgend der Begriff der Subtelomerregion erläutert.

Abb. 2.1



Die Enden der Eukaryonten-Chromosomen bestehen aus einem drei bis zwanzig Kilobasen langem Abschnitt aus TG-reicher repetitiver DNA (im Schaubild gelb), an den sich zunächst relativ unspezifische, distale (ebenfalls repetitive) DNA Sequenzen (im Schaubild blau) und dann relativ spezifische, proximale DNA Sequenzen (im Schaubild orange Punkte) anschließen. Das Telomer eines Chromosoms im eigentlichen Sinne ist der TG-reiche, „gelbe“ Abschnitt des Chromosoms. Bei Verlust dieses Abschnittes kommt es zu einem zunehmenden enzymatischen Abbau der Chromosomenenden und daraus resultierend zu einer Verkürzung der Lebensdauer der Zelle. Des Weiteren wird das Telomer benötigt, um eine komplette Replikation der DNA zu gewährleisten. Bei einer unvollständigen DNA-Replikation in der S-Phase der Meiose kann es gegebenenfalls zu genetisch defekten Tochterzellen kommen. Dies stellt damit einen limitierenden Faktor bezüglich der Lebensdauer der Tochterzellen dar (KNIGHT et al, 2000). Kommt es beispielsweise zum Verlust dieser telomerspezifischen Region, sind häufig auch die, wie oben beschriebenen, sich unmittelbar anschließenden distalen (im Schaubild blau) und proximalen (im Schaubild orange Punkte) DNA Sequenzen mitbetroffen (die sogenannte Subtelomerregion). Diese Tatsache kann man sich aus genetischer Sicht zu Nutze machen, denn der gezielte Nachweis des „isolierten“ Telomerverlustes ist in der Praxis zwar möglich, hat aber zwei Nachteile. Zum Einen ist der Nachweis verhältnismäßig schwierig, da sich der Abschnitt aus TG-reicher

repetitiver DNA in allen Chromosomen sehr ähnelt und somit nicht sehr spezifisch für ein bestimmtes Chromosomenende ist, und zum Anderen enthält die reine Telomerregion keine Gene, so dass die Aussagekraft eines isolierten Telomerverlustes an sich schon an Bedeutung verliert. Die proximale DNA Sequenz der Subtelomerregion dagegen ist spezifisch für jedes einzelne Chromosom, enthält dicht gepackte genetische Informationen, und kann daher gut nachgewiesen werden.

Man spricht in der Humangenetik bei morphologischen Abweichungen einzelner Chromosomen (wie z.B. bei Verlust von Telomerregionen bzw. Subtelomerregionen) von sogenannten strukturellen Chromosomenaberrationen. Diese strukturellen Chromosomenaberrationen können wiederum in mikroskopisch erkennbare (durch GTG 550 Bänderung) und submikroskopische erkennbare (durch Subtelomer-Analyse) Gruppen unterschieden werden. Im Gegensatz dazu stehen die numerischen Chromosomenaberrationen, bei denen die Zahl der Chromosomen vom normalen diploiden Chromosomensatz abweichen (z.B. Trisomie 21 oder Ullrich-Turner-Syndrom (Karyotyp 45,X0)). Relevant für diese Arbeit ist die Gruppe der strukturellen (insbesondere der submikroskopischen) Chromosomenaberrationen. Beispiele dafür sind unter anderem Translokationen, worunter man Änderungen von Chromosomensegmenten innerhalb eines Karyotyps versteht. Auch die Deletion, d.h. der Verlust eines Teils eines Chromosoms und die Inversion, d.h. die Drehung eines Chromosomenstückes innerhalb eines Chromosoms um  $180^\circ$ , sind weitere Beispiele für strukturelle Chromosomenaberrationen (BUSELMAIER et al, 1991). Um die strukturellen Chromosomenaberrationen, die in unserem Fall die Subtelomerregion betrafen, darstellen und nachweisen zu können, entwickelten im Verlauf der vergangenen zehn Jahre verschiedene Arbeitsgruppen vielversprechende Methoden. Wir entschieden uns in unserer Arbeitsgruppe für insgesamt drei Methoden, welche auf dem Prinzip der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (kurz FISH) basieren und an dieser Stelle nur kurz, aber im Methodenteil ausführlich beschrieben werden.

### **2.3 Molekular-zytogenetische Verfahren**

Befassten sich die methodischen Entwicklungen der Zytogenetik in den 60er Jahren noch mit Chromosomenpräparationen und im Anfertigen von Übersichtsfärbungen, so wurde in den 70iger Jahre Chromosomen-Bänderungstechniken eingeführt, die durch ihre stetige Weiterentwicklung in den 80iger Jahren in hochauflösenden Bänderungsverfahren endeten. Die Verbindung von molekularen und zytogenetischen Methoden in Form der Fluoreszenz- in

situ –Hybridisierung (FISH) führte schließlich Mitte der achtziger Jahre zur Entwicklung der molekularen Zytogenetik und damit zu einem wesentlichen Fortschritt in der Chromosomendiagnostik.

Die Chromosomen-Bänderung ist ein rein zytologisches Verfahren, dessen Auflösung weitgehend von der Qualität der jeweiligen Chromosomenpräparation abhängt. Im Gegensatz dazu verbindet die in-situ Hybridisierung, durch die direkte Visualisierung bereits molekular charakterisierter DNA-Abschnitte, in zellulären Präparaten zytologische und molekulare Informationen. Die Auflösungsgrenze ist dabei nicht nur von der Chromosomen-Präparation, d.h. der Länge der Chromosomen, sondern auch von den Eigenschaften der Hybridisierungssonden, wie Länge und genomische Distanz zu anderen Markern, abhängig. Die Fluoreszenz -in situ- Hybridisierung ist aufgrund der hohen Sensitivität, der räumlichen Auflösung der Signale und der Möglichkeit, verschiedene Sonden zu kombinieren und differentiell in zellulären Präparaten nachzuweisen, in zunehmendem Maße angewendet worden. Gerade in der Diagnose chromosomaler Aberrationen ist sie von großer Bedeutung.

Grundlage der FISH bildet die 1969 von Gall und Pardue entwickelte Technik der in-situ Hybridisierung (ISH), die zunächst nur den Nachweis und die Lokalisierung von radioaktiv markierten DNA-Sequenzen ermöglichte. Die ursprünglich verwendeten radioaktiv markierten Nukleotide wurden schließlich immer mehr durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkierten Nukleotiden verdrängt. Hierbei finden neben der indirekten Markierung mit den Haptenen Biotin, Digoxigenin und Estradiol, auch direkt Fluorochrom-gekoppelte Nukleotide Verwendung (vgl. S.16). Der Einsatz fluoreszierender Farbstoffe beschleunigt das Verfahren und liefert zugleich eine Verbesserung des Auflösungsvermögens.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine effektive Methode, um DNA-Sequenzen in Chromosomen oder Interphasezellkernen mikroskopisch nachzuweisen. Das Prinzip der FISH besteht in der Hybridisierung, also der sequenzspezifischen Doppelstrangbildung zwischen einzelsträngigen, fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenzen (Sonden) mit der zu Einzelsträngen denaturierten DNA der zu untersuchenden Zellen. Die in dieser Arbeit verwandten Nachweismethoden (SKY, Applied Spectral Imaging Inc.; Chromoprobe Multiprobe T-System, Cytocell Ltd.; Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures, Vysis Inc.) basieren alle auf dem Prinzip der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung. SKY, eine 24-Farben-FISH-Technik, ermöglicht die simultane Darstellung aller menschlicher Chromosomen in verschiedenen Falsch-Farben. Dies ist die einzige der drei verwandten Methoden, mit der nicht nur die Subtelomerregionen, sondern jeweils die gesamten Chromosomen mit Sonden (Painting probes) nachgewiesen werden konnten. Bei dem Chromoprobe Multiprobe-T

System (CYTOCELL) und den Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures handelt es sich jeweils um einen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungskit, der die gleichzeitige Hybridisierung der Subtelomerregionen aller 24 menschlichen Chromosomen mit direktmarkierten subtelomerspezifischen Sonden möglich macht. Mit diesen drei FISH-Methoden untersuchten wir ein Patientenkollektiv von 70 Kindern und Jugendlichen mit unauffälligem GTG-gebänderten Karyogramm (550-Bandenniveau) und einer geistigen Behinderung auf die im Folgenden dargestellten Fragestellungen hin.

### **2.4 Eigene Fragestellungen:**

Aus den vorangehenden Ausführungen und im Rahmen dieser prospektiven Studie ergaben sich eine Reihe interessanter Fragestellungen. Im Einzelnen wurden Untersuchungen zu folgenden Fragen durchgeführt:

- 1) Wie häufig finden sich Subtelomerveränderungen in unserem Patientenkollektiv unter Anwendung der Checkliste von de Vries und Mitarbeitern (DE VRIES et al, 2001)?  
Und wie kann man sich die große Diskrepanz der Prävalenzen (0 bis 23%) zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen erklären?
- 2) Welche der vier angewendeten Methoden (1) konventionelle Zytogenetik, (2) Spectral Karyotyping „SKY“, (3) Chromoprobe Multiprobe T-System und (4) ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panel, ist am informativsten bezüglich des Nachweises von Subtelomerveränderungen?
- 3) Lassen sich charakteristische Symptomkombinationen bzw. Syndrome einer bestimmten subtelomerischen Chromosomenaberration zuordnen und sich damit eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachweisen?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Untersuchungsmaterial**

Das Patientenkollektiv bestand aus 70 Säuglingen, Kleinkindern und Jugendlichen mit einer geistigen Behinderung (mentaler Retardierung) ungeklärter Ursache und mit unauffälligem GTG-gebänderten Karyogramm (550-Bandenniveau). Die Verteilung der Geschlechter innerhalb des Patientenkollektivs war relativ ausgeglichen. Von den 70 Patienten waren 39 weiblichen und 31 männlichen Geschlechts. Der/die jüngste Patient/in zum Zeitpunkt der Untersuchung war 6 Monate alt und der/die älteste 18 Jahre alt.

Zusätzlich war mindestens eines der fünf Einschlusskriterien nach der Checkliste von De Vries und Mitarbeitern (DE VRIES et al., 2001) vorhanden.

#### **Die fünf Einschlusskriterien:**

- 1) Familiäre geistige Behinderung
- 2) Pränatale Wachstumsretardierung
- 3) Postnatale Wachstumsstörungen
- 4) Mindestens zwei faziale Dysmorphiezeichen
- 5) Eine oder mehrere nicht-faziale Dysmorphiezeichen oder angeborene Anomalien  
(wie z.B. Organfehlbildungen)

Zur besseren Quantifizierung der vorhandenen Einschlusskriterien und zur übersichtlicheren Vergleichbarkeit der einzelnen Patienten, teilten wir jedem Patienten pro vorhandenem Einschlusskriterium eine festgelegte Punktzahl zu. Die Punkteverteilung erfolgte nach einer, auf der folgenden Seite befindlichen, Punktetabelle (siehe S.11). Pro Einschlusskriterium (je nach Stärke der Ausprägung) wurden ein oder zwei Punkte zugeteilt. Im Falle eines Vorhandenseins aller fünf Einschlusskriterien und deren maximaler Ausprägung, hätte sich somit eine Punktzahl von zehn Punkten ergeben. Im Durchschnitt erreichten unsere 70 Patienten 4,6 Punkte.

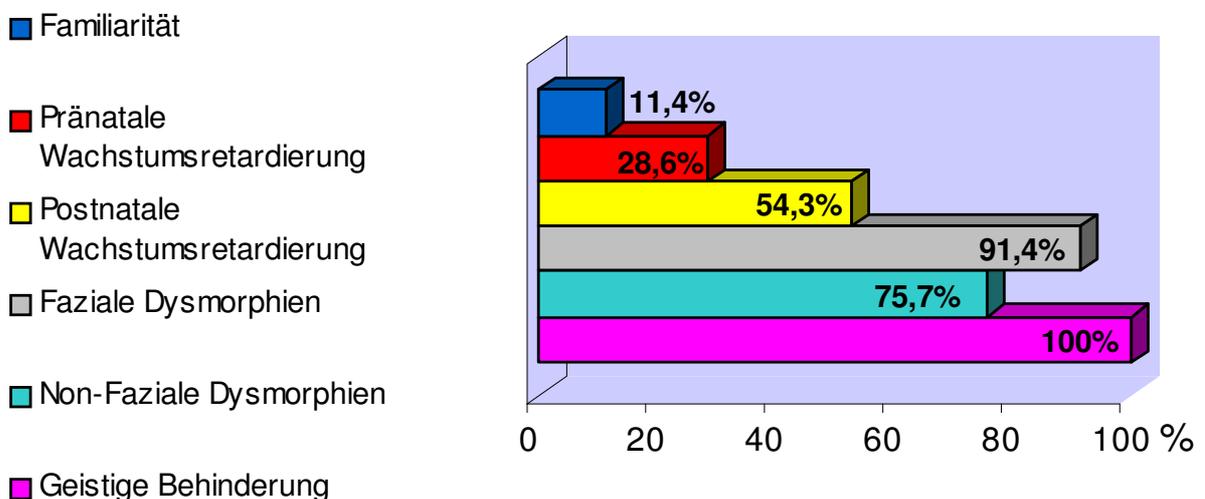
Die Punkteverteilung erfolgte nach folgendem Schema:

Punktetabelle 3.1

Einschlusskriterium	Punkte
Zu 1) Mendel'scher Erbgang	1
Nicht-Mendel'scher Erbgang	2
Zu 2) jede Form der pränatalen Wachstumsretardierung	2
Zu 3) für jedes der folgenden Symptome 1 Punkt (max 2)	max. 2
Mikrozephalus (1) Kleinwuchs (1)	
Makrozephalus (1) Hochwuchs (1)	
Zu 4) zwei oder mehr faziale Dysmorphiezeichen	2
Hypertelorismus nasale Anomalien Ohranomalien	
Zu 5) für jedes der folgenden Symptome 1 Punkt (max 2)	max. 2
Handanomalien (1) Herzfehlbildung (1) Hypospadie +/- Hodenhochstand bei Jungen (1) analog intersexuelles Genital bei Mädchen (1)	

Im Überblick gibt das folgende Balkendiagramm die prozentuale Häufigkeit eines jeden Einschlusskriteriums bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv wieder. Da die geistige Behinderung die Grundvoraussetzung für die Aufnahme in diese Studie war, wurde sie zusätzlich zu den 5 Einschlusskriterien in das Diagramm aufgenommen und hatte damit logischerweise eine prozentuale Häufigkeit von 100%.

Balkendiagramm 3.1



---

Das Patientenkollektiv war durch die Ärzte der Genetischen Beratungsstelle am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes in Zusammenarbeit mit den Ärzten der Kinderklinik der Universität des Saarlandes ausgewählt worden. Sämtliche Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte waren mit der Aufnahme in diese Studie einverstanden. Nach einer eingehenden körperlichen Untersuchung des jeweiligen Patienten durch die Ärzte des Institutes für Humangenetik der Universität des Saarlandes, wurde unter sterilen Bedingungen pro Patient ca. 5ml Venenblut entnommen. 0,8ml dieses heparinisierten Blutes wurden verwendet, um Lymphozyten-Kurzzeitkulturen zur Gewinnung von Metaphasepräparaten herzustellen. Das genaue Protokoll ist unter Punkt 3.2.1 nachzulesen.

Bei sämtlichen auffälligen Befunden untersuchten wir, sofern die Möglichkeit gegeben war, zusätzlich die Chromosomensätze der Eltern. Auf diese Weise konnte eine de-novo Entstehung oder eine Familiarität der chromosomalen Veränderung unterschieden werden. Lediglich in einem Fall war dies aus privaten Gründen der Eltern nicht möglich.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Chromosomenpräparation aus Vollblut**

Protokoll:

Es werden 8ml Nährmedium (RPMI) komplettiert mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin steril in ein Falcongefäß eingefüllt. Dann werden 0,2 bis 0,4ml Phytohämagglutinin steril hinzu gegeben und alles wird durchmischt. Das Gemisch läßt man im Gefäß auf Raumtemperatur akklimatisieren. Man benötigt pro Kultur 0,8ml steril gewonnenes Heparin-Vollblut und vermischt diese vorsichtig miteinander. Die Kulturen sollen bei 37°C im Brutschrank für 48 bis maximal 96 Stunden inkubieren. Das Optimum liegt bei 72 Stunden. Zum Abbrechen des Zellwachstums und zur Anreicherung der Metaphase-Zellen werden zu jeder Kultur 200µl sterile Colcemid-Lösung (10µg/ml) hinzu gegeben, durchmischt und weitere 20 bis 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Währenddessen wärmt man 1x PBS-Lösung und 0,4% KCl-Lösung auf 37°C vor. Danach wird Methanol und Eisessig im Verhältnis von 3:1 gemischt und bei -20°C auf <0°C vorgekühlt. Nach Überführung der Kulturen in ein Zentrifugenspitzenröhrchen werden diese bei 800 bis 1000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Den Überstand saugt man bis auf einen kleinen Rest (ca. 1ml) ab, überschichtet das Pellet mit 8ml warmer PBS-Lösung und resuspendiert. Die hypotone Lösung läßt die Zellen anschwellen, erleichtert das „Entwirren“ der Chromosomen, verbessert die Spreitung und damit die Präparation. Wiederum werden die Kulturen für 10 Minuten bei 800 bis 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgesaugt. Die Zellen werden nun im Restvolumen vorsichtig resuspendiert. Das Methanol-Eisessig-Fixans wird tropfenweise hinzugeben und dabei werden die Zellen ständig resuspendiert. Eine Luftblasenbildung sollte dabei weitestgehend vermieden werden. Die Zellen werden dann im kalten Fixans für ca. 30 Minuten inkubiert. Nach jeweiliger Zentrifugation wird die Fixierung 3 bis 4 mal wiederholt, bis das Pellet kompakt und hell erscheint. Je nach Versuchsprotokoll wird von diesem Schritt an unterschiedlich mit der Suspension weitergearbeitet.

Die Zellen für die Verwendung für SKY werden mit Hilfe einer Kolbenpipette und in ca. 15µl-Volumina aus einer Höhe von wenigen Zentimetern auf fettfrei gewaschene Objektträger aufgetropft. Da die Luftfeuchtigkeit im Raum einen großen Einfluß auf die Präparatequalität hat, kann das Unterlegen eines angefeuchteten Schwammtuches während des Auftropfens von Vorteil sein und die Spreitung der Chromosomen optimieren. Die

---

Präparate trocknen in der Folge an der Luft und werden anschließend im Phasenkontrast begutachtet.

Bei der Verwendung für das Chromoprobe Multiprobe-T-System werden die Zellen in 2µl-Volumina in die 24 vorgesehenen Quadrate des kommerziell gelieferten und durch Methanol gereinigten Objektträgers getropft (genaueres siehe unter Punkt 3.2.2.2).

Im Falle des Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures werden auf drei gewaschene Objektträger (für den Fall, dass alle 24 Chromosomen untersucht werden sollen) jeweils 5 Tropfen a 5µl Zellsuspension getropft (genaueres siehe unter Punkt 3.2.2.3).

G- Bänderung von Chromosomen:

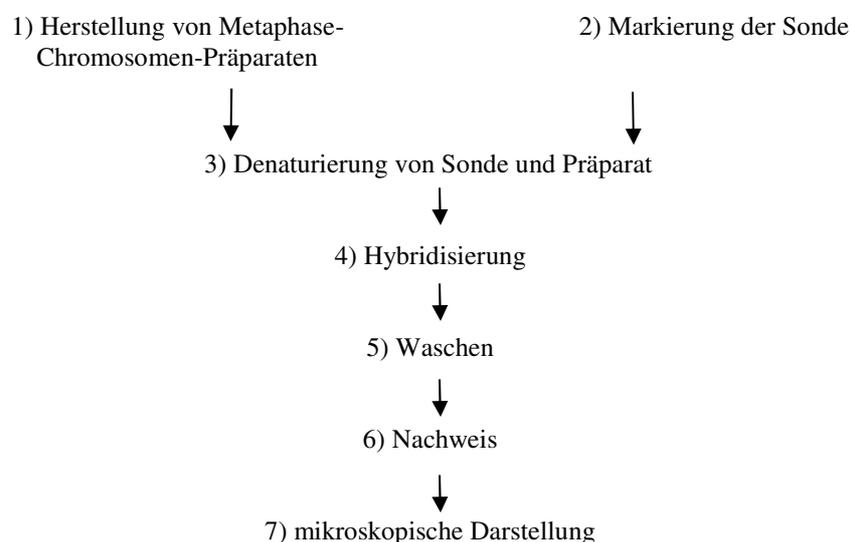
Die Chromosomenpräparate werden in einer Lösung von 0,04% Trypsin in PBS-Pufferlösung 20-40 Sekunden inkubiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen und in einer 8%igen Giemsalösung etwa 10 Minuten gefärbt. Ist die Differenzierung der Banden unzureichend, kann das Präparat in 70% Ethanol entfärbt und der Vorgang wiederholt werden.

### 3.2.2 Prinzip FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine Methode, um spezifische DNA-Sequenzen ab einer Länge von >1 kbp in Chromosomen oder Interphasezellkernen mikroskopisch nachzuweisen. Das Prinzip der FISH besteht in der Hybridisierung, also der sequenzspezifischen Doppelstrangbildung einzelsträngiger, fluoreszenzmarkierter DNA-Sequenzen (Sonden) mit der zu Einzelsträngen denaturierten DNA der zu untersuchenden Zellen. Bei der Sonden-DNA handelt es sich zumeist um rekombinante, z.B. in Bakterienplasmiden vermehrte, menschliche DNA von bis zu 30 kbp. Sie wird in Stücke einer Länge von optimalerweise 100-300 Basen zerschnitten. Kürzere Sonden bilden nicht so stabile Nucleinsäurepaare, längere Sonden (insbesondere solche, die größer als 1 kbp sind) dringen dagegen unter Umständen nur schlecht in das Gewebe ein (LEITSCH A.R., In situ-Hybridisierung, Spektrum 1994). Fluoreszenzmarkiert bedeutet, dass die Sonden mikroskopisch nachgewiesen werden, indem man die Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht der entsprechenden Wellenlänge anregt und die ausgestrahlte Fluoreszenz (emittiertes Licht) mit geeigneten Lichtfiltern einfängt und dokumentiert. In-situ bedeutet, dass die Hybridisierung direkt im biologischen Präparat, also am Schnitt oder in diesem Fall direkt an den präparierten Chromosomen, erfolgt. Die in dieser Arbeit verwandten Nachweismethoden (SKY, Applied Spectral Imaging Inc.; Chromoprobe Multiprobe T-System, Cytocell Ltd.; Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures, Vysis Inc.) basieren alle auf dem Prinzip der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung.

#### Schematischer Überblick über den Ablauf der in-Situ-Hybridisierung:

(nach In situ-Hybridisierung; A.R.Leitsch; Spektrum Akademischer Verlag)



### Zu 1) Herstellung von Metaphasenchromosomen-Präparaten:

Prinzipiell sind alle Suspensionskulturen geeignet, die sich teilende Zellen enthalten, wie z.B. kurzzeitig kultivierte Blutzellen. Ein ausführliches Protokoll zur Präparation der Blutkultur befindet sich unter Punkt 3.2.1. Es handelt sich im Prinzip um Auftropfpräparate, bei denen durch eine vorherige Colcemidbehandlung die Zahl der Metaphasezellen erhöht und durch die Behandlung mit einer hypotonen Lösung die Spreitung der Chromosomen verbessert werden.

In manchen Protokollen wird eine Vorbehandlung des Materials empfohlen, um eine Verbesserung des Hybridisierungsergebnisses zu erlangen. Mit der Hilfe von RNase wird störend wirkende einzelsträngige RNA abgebaut und damit eine unspezifische Hybridisierung der Sonde weitgehend vermieden. Eine weitere Möglichkeit zur Ergebnisverbesserung bietet die sogenannte Permeabilisierung. Durch die Inkubation mit dem proteinabbauenden Enzym Pepsin werden die Zellmembranen für Sonden und Lösungen besser durchlässig. Diese Vorbehandlungen sind fester Bestandteil des Protokolls für SKY. Für das Protokoll der Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures, wird lediglich die Pepsinbehandlung empfohlen. Beim Chromoprobe Multiprobe T-System dagegen wird keine Vorbehandlung gefordert.

### Zu 2) Markierung der Sonde:

Bei der FISH-Technik unterscheidet man eine direkte und eine indirekten Markierung der gewünschten DNA-Sequenz. Markermoleküle (zum Beispiel Biotin, Digoxigenin, Fluoreszenzfarbstoffe wie FITC=Fluorescein-Isothiocyanat oder Texas Red) werden dabei in Form von modifizierten Nucleotiden enzymatisch in DNA oder RNA eingebaut. Bei der direkten Markierung (z.B. beim Chromoprobe Multiprobe T-System) kann die Markierung der Nucleinsäure unmittelbar in Anschluß an die in situ-Hybridisierung detektiert werden. Das Markermolekül ist in diesem Fall einer der Fluoreszenzfarbstoffe selbst (z.B. FITC=Fluorescein-Isothiocyanat oder Texas Red). Bei der indirekten Markierung (zum Teil bei SKY) können die in die Sonde eingebauten Markermoleküle nicht ohne weiteres sichtbar gemacht werden. Erst ein zweites sogenanntes Reportermolekül, das sich an die Markierung heftet, ermöglicht dann die Lokalisierung der Hybridisierungsstelle. Biotin und Digoxigenin gehören zu den gebräuchlichen Linkermolekülen. Biotinmarkierte Sonden beispielsweise können durch die stufenweise Kopplung der Reportermoleküle Avidin-FITC, biotinylierter Anti-Avidin-Antikörper und nochmals Avidin-FITC verstärkt werden.

Die Markermoleküle selber können, wie schon erwähnt, in Form von modifizierten Nucleotiden enzymatisch in DNA-Sequenzen mittels DNA-Markierungsreaktionen (z.B. PCR oder Nick-Translation) eingebaut werden. Im Falle der drei Nachweismethoden dieser Arbeit wurden bereits vom Hersteller markierte Sonden verwandt. Bei SKY werden chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken (Painting-Probes) benutzt, die über die Subtelomerregion hinaus das gesamte Chromosom anfärben. Beim Chromoprobe Multiprobe T-System und bei den Vysis ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures dagegen arbeitet man mit subtelomerspezifischen DNA-Sonden.

Zu 3) Denaturierung von Sonde und Präparat:

Um die Sonde und das Präparat zu denaturieren, d.h. sie in ihre Einzelstränge zu zerlegen, benötigt man Temperaturen, die ca. 30 °C über den errechneten Schmelztemperaturen liegen. Erfahrungsgemäß befinden sich diese Temperaturen zwischen 75°C und 80°C. Es ist möglich das Präparat und die Sonde zusammen oder getrennt voneinander zu denaturieren. Bei SKY findet eine getrennte Denaturierung, bei den Methoden der subtelomerspezifischen Sonden finden kombinierte Denaturierungen statt.

Zu 4) Hybridisierung:

Nach der Denaturierung liegen die Sonde und die nachzuweisenden Nucleinsäuren einzelsträngig vor. Die anschließende Hybridisierung, d.h. die Paarung der homologen Nucleinsäuresequenzen, findet in den nächsten 12 bis 24 Stunden bei ca. 37°C in einer feuchten Kammer statt (meist über Nacht). Damit der Prozentsatz an richtig gepaarten Nucleotiden im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz möglichst hoch ist, arbeitet man mit formamidhaltigen Waschlösungen, welche die nur locker oder teilweise gebundenen Nucleotidpaare lösen. Den ungefähren Prozentsatz an richtig gepaarten Nucleotiden nennt man die Stringenz. Diese Stringenz sollte am Ende des Versuches mindestens 85% betragen.

Zu 5) Waschen nach der Hybridisierung:

Die Stringenzbedingungen der Posthybridisierungs-Waschung sind etwas stärker als bei der Hybridisierung selbst. So wird gewährleistet, dass locker gebundene Sonden entfernt werden und nur nahezu perfekt gepaarte Hybridmoleküle übrig bleiben. Die optimale Temperatur für diesen Schritt beträgt ca. 45°C.

#### 6) Nachweis der Hybridisierungsstellen:

Die direkt fluoreszenzmarkierten Sonden können an dieser Stelle unmittelbar mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die indirekt markierten Sonden müssen mit mehrstufigen immunologischen Nachweisverfahren, beispielsweise mit Antikörpern (Reporter-molekül), nachgewiesen werden. Das letzte der Reporter-moleküle trägt seinerseits einen Fluoreszenzfarbstoff und kann analog zu den direktmarkierten Sonden mikroskopisch ausgewertet werden. Beispiele für in dieser Arbeit relevante Fluoreszenzfarbstoffe sind FITC und Texas Red.

#### 7) Mikroskopische Darstellung der Signale:

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass ein Photon einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) ein Elektron im Fluoreszenzfarbstoff anregt, so dass es in eine äußere Elektronenhülle springt. Dieser angeregte Zustand ist instabil, und das Elektron kehrt bald in seinen (stabilen) Grundzustand zurück, wobei die verloren gegangene Energie in Form von Licht (Fluoreszenz) abgestrahlt wird. Als Lichtquelle dient im Fluoreszenzmikroskop eine Quecksilberdampfampe von 100W. Durch Anregungsfilter im Mikroskop wird die geeignete Wellenlänge für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff eingestellt. Das Licht der gewählten Wellenlänge fokussiert man durch das Objektiv auf das Präparat. Das emittierte Licht fällt durch einen Langwellensperrfilter, der nur für Licht oberhalb einer bestimmten Grenze durchlässig ist. Damit das Prinzip funktioniert, muß zwischen den zwei Filtern ein dichromatischer Teilerspiegel angebracht sein, welcher kurzwelliges, anregendes Licht zurück auf das Präparat reflektiert. Längereswelliges Fluoreszenzlicht passiert den Teilerspiegel dagegen nahezu vollständig und trifft auf den Sperrfilter. (In situ-Hybridisierung; A.R.Leitsch; Spektrum Akademischer Verlag)

Bei der Aufnahme der Bilder unterscheidet man zwei Ansätze. Der erste Ansatz (z.B. bei den subtelomerspezifischen FISH-Techniken) basiert darauf, dass von jeder emittierten Fluoreszenzfarbe ein Bild mit einem schmalen Filter und einer CCD-Kamera (Kamera mit gekühltem ladungsgekoppeltem Bildsensor; charge-coupled device) aufgenommen wird. Die zweite Technik (SKY) kombiniert einen Interferometer und eine CCD-Kamera, um für jedes Pixel eines Bildes das gesamte Spektrum mittels Fourier-Analyse zu bestimmen (siehe dazu auch Punkt 3.2.2.1). Mit der entsprechenden Software werden die emittierten Spektren digitalisiert und bestimmten Falschfarben zugeordnet.

Die mikroskopische Darstellung aller verwendeten Techniken wird in jedem Methodenkapitel (3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.2.3) ausführlich und im Einzelnen erläutert.

### 3.2.2.1 Spectral Karyotyping „SKY“ (nach Schröck et al.1996)

#### 1.) Das Prinzip:

SKY, eine 24-Farben-FISH-Technik, ermöglicht die simultane Darstellung aller menschlicher Chromosomen in verschiedenen Farben. Dafür ist eine, bis dahin nicht möglich gewesene, gleichzeitige Detektion von 24 DNA-Sonden mit unterschiedlichen Fluorochromverhältnissen notwendig. Bei den Sonden handelt es sich um chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken (Painting probes). Sie sind entweder direkt mit Fluorochromen oder indirekt mit Haptenen wie Biotin oder Digoxigenin markiert, welche wiederum durch immunogene Nachweisverfahren mit Fluorochromen gekoppelt werden. Da es weniger unterscheidbare Fluorochrome als chromosomenspezifische Sonden gibt, wird eine kombinatorische Markierungstechnik angewandt. Hierbei ergibt sich die Anzahl der benötigten Fluorochrome für 24 Farben daraus, dass die Anzahl der brauchbaren Booleschen Kombinationen für N Fluorochrome  $2^N - 1$  ist. Um also alle 24 menschlichen Chromosomen in verschiedenen Farben darzustellen, benötigt man mindestens fünf Fluorochrome ( $2^5 - 1 = 31$ ). Für SKY gilt diesbezüglich die Tabelle 3.2.

Tab 3.2: Kombinatorisches Markierungsschema der SkyPaint-Sonden

Chromosom		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Rhodamin	A			X		X				X	X		X		X				X	X	X		X	X	
TexasRed	B	X				X	X	X					X		X	X	X		X					X	
Bio-Cy5	C	X		X	X			X	X		X	X				X		X		X			X		X
FITC	D	X		X	X	X	X		X	X		X		X			X		X				X		X
Dig-Cy5.5	E		X	X		X	X			X	X		X										X	X	X

Die Fluoreszenzaufnahmen werden gewonnen, indem ein Interferometer und eine CCD-Kamera kombiniert werden, um für jedes Pixel eines Bildes das gesamte Spektrum mittels Fourier Analyse zu bestimmen (siehe auch Bildaufnahme und Auswertung).

## 2.) Die Methode im Detail:

Komponenten des Kits:

- Sky-Solution 1 Sky Paint Sonden Mix
- Sky-Solution 2 Blocking Reagenz
- Sky-Solution 3 Pufferlösung I (anti-Dig-Cy5.5)
- Sky-Solution 4 Pufferlösung II (Streptavidin-Cy5)
- Sky-Solution 5 DAPI/Antifade

### *SKY Versuchsprotokoll:*

#### A) Chromosomenpräparation

(siehe 2.2.1)

#### B) Vorbehandlung der Objektträger

Im ersten Schritt werden die Objektträger für 20 Minuten mit 100µl RNase (100µg/ml) eingedeckt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach folgt eine drei Mal fünfminütige Waschung in 2xSSC bei Raumtemperatur. Der Proteinverdau findet in einer Glasküvette gefüllt mit 100ml 0,05%igem Pepsin in 0,01M HCl bei 37°C im Wasserbad statt und dauert zwischen 60 und 120 Sekunden. Man taucht die Objektträger kurz in PBS (bei Raumtemperatur) und kontrolliert im Phasenkontrast die Qualität der Präparate. Sind diese übermäßig angedaut, kann man sie nicht mehr verwenden. Befindet sich noch zu viel Plasma im Präparat, kann der Proteinverdau wiederholt werden bis das erwünschte Ergebnis erzielt ist. Bei befriedigender Qualität werden die Objektträger für 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Danach werden die Chromosomen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Postfix (37% Formaldehyd und 1xPBS) nachfixiert und nochmals für 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80% und 100%) bei 4°C schließt sich an, danach eine Lufttrocknung der Objektträger.

#### C) Chromosomendenaturierung

In diesem Schritt werden die Präparat- und die Sonden-DNA getrennt voneinander denaturiert. Die Objektträger werden dabei mit 100µl Denaturierungsmix (70% Formamid/2xSSC, pH 7,0) bedeckt, für 90 Sekunden bei 73°C auf einer Heizplatte denaturiert, sofort in eiskalten 70%iges Ethanol überführt, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert und luftgetrocknet. Zeitlich etwa um eine Stunde nach vorne versetzt werden pro Objektträger 3µl des Sky Paint Sonden Mixes (Sky-Solution 1) für 7 Minuten bei 80°C im

Wasserbad denaturiert und danach zum „Preannealen“ der repetitiven DNA-Abschnitte 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Preannealen bedeutet, daß ein Großteil der sich störend auswirkenden, unspezifischen repetitiven DNA-Abschnitte sich vor der eigentlichen Hybridisierung wieder paaren und somit möglichst viele unspezifische Paarungen bei der Hybridisierung vermieden werden. Anschließend wird das Sky Paint Sonden Mix auf den jeweiligen Objektträger gegeben, ein rundes Deckglas (12 mm Ø) aufgelegt und mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer für 36 bis 48 Stunden bei 37°C.

#### D) Stringenzwaschung und Detektion

Die Stringenzwaschungen nach der Hybridisierung erfolgt dreimal 5 Minuten in 50% Formamid/2xSSC bei 45°C und zweimal 5 Minuten in 1xSSC bei 45°C. Die Objektträger werden kurz in 4xSSC/Tween bei 45°C eingetaucht. Das anschließende Abblocken repetitiver Sequenzen mit 80µl Blocking-Reagenz (SKY-Solution 2) erfolgt 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Die Detektion der Biotin- bzw. DIG-markierten Nukleotide erfolgt durch Zugabe von je 30µl SKY-Solution 3 (anti-Dig-Cy5.5) bzw. 30µl SKY-Solution 4 (Streptavidin-Cy5) und einer Inkubation für jeweils 45min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach jedem Inkubationsschritt wird je dreimal 5 Minuten bei 45°C in 4xSSC/Tween gewaschen. Danach werden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert, luftgetrocknet und in einer mitgelieferten Antifade-Lösung mit DAPI (Sky-Solution 5) eingedeckt.

#### E) Bildaufnahme und Auswertung

Grundlage der Auswertung der Spectral Karyotyping Technik ist die Methode des Spectral Imaging (Malik et al., 1996, Garini et al., 1996). Spectral Imaging kombiniert die Spektroskopie und moderne digitale Bildverarbeitung. Der Hauptunterschied zur konventionellen Aufricht-Fluoreszenzmikroskopie liegt darin, dass die Messung (bzw. Detektion) der Einzelintensitäten, der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen, nicht auf der Verwendung von Fluorochrom-spezifischen optischen Filtern basiert, sondern die Bildinformation durch die Messung (bzw. Analyse) des gesamten Lichtspektrums von jedem Pixel (Lichtpunkt) des Bildes erzeugt wird.

Für die Analyse verwendet wurde ein Aufrichtfluoreszenzmikroskop (wir verwendeten ein Axioskop, Zeiss) mit einem speziellen Interferometer (SpectraCube SD 200, Applied Spectral Imaging), eine gekühlte CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics) und eine

Auswertungssoftware (SkyVision 1.6, Applied Spectral Imaging). Die Präparate werden mit einer HBO100 Hg-Höchstdruck-Dampflampe beleuchtet und mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv betrachtet. Mit dem Triple-Band-Pass-Filter (Chroma Technology, USA) werden alle Fluorochrome gleichzeitig angeregt, so dass ein durch einen Filterwechsel verursachter Shift, nicht auftreten kann. Das breite Emissionsfenster garantiert ebenso ohne Filterwechsel die exakte Messung des emittierten Lichtspektrums. Die Filterspezifikationen sind in Tab. 3.3 angegeben.

Tab. 3.3: Filtercharakteristika des SKY – Triple Band-Pass-Filter (Chroma Technology)

Anregungsfilter	468/28nm	565/16nm	642/22nm
Emissionsfilter	542/44nm	600/38nm	720/113nm
Strahlenteiler			
Reflexion	421-480nm	561-572nm	631-651nm
Transmission	495-564nm	580-680nm	660-740nm

Die Aufnahmezeiten sind stark abhängig von der Signalintensität, der Größe des Bildes, der gewünschten spektralen Auflösung und dem Signal/Rausch-Verhältnis. Eine typische Aufnahmezeit für mit SkyPaint-Sonden hybridisierte Metaphasen beläuft sich auf circa 120-180 Sekunden, bei einer spektralen Auflösung von 15nm. Die seitliche Auflösung der Messung liegt am Objekt bei  $\sim 0.24\mu\text{m}$  und ist im Bild durch die Pixelgröße der CCD-Kamera ( $15\mu\text{m}$ ) aber auch durch die Vergrößerung des Objektivs (63x) vorgegeben.

Nach der Messung werden die Daten mit einem in der Software integrierten Fourier transformierenden Algorithmus (Brigham, 1988) in das Spektralbild umgewandelt. Die eindeutige Klassifikation der Chromosomen ist erst nach der Fourier Transformation möglich. Die Zuordnung der Klassifikations-Falschfarbe basiert einzig auf dem gemessenen Spektrum jedes Bildpunktes. Der auf den Spektraldaten basierende Klassifikations-Algorithmus ermöglicht es, die sehr unterschiedlichen Summations-Spektren des Bildes zu identifizieren und in den, den einzelnen Chromosomen zugeordneten, Klassifikations-Falschfarben darzustellen. Die Falschfarbe jedes Chromosoms entspricht seinem Spektrum. Der für die Spektral- Klassifizierung verwendete Algorithmus liefert ein Bild, in dem alle Bildpunkte mit dem gleiche Spektrum die gleich Klassifikations-Falschfarbe zeigen.

### 3.2.2.2 Chromoprobe Multiprobe T-System (Knight et al., 1999)

#### 1.) Das Prinzip:

Mit Hilfe des Chromoprobe Multiprobe-T Systems (CYTOCELL), einem Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierungskit, ist die gleichzeitige Hybridisierung der proximalen Subtelomerregionen aller 24 menschlichen Chromosomen mit direktmarkierten subtelomerspezifischen Sonden möglich. Bei der auf FISH basierenden Methode markieren Sonden die subtelomerspezifischen Bereiche der langen Arme (q-Arme) eines jeden einzelnen Chromosoms mit Texas Red (rote Signale) und die der kurzen Arme (p-Arme) mit FITC (grüne Signale). Eine dritte Fluoreszenzfarbe, das DAPI, dient der Darstellung der Chromosomensilhouette. Die beiden fluoreszierenden Subtelomersonden Texas Red und FITC lagern sich entsprechend an die DAPI-gefärbten Chromosomensilhouetten an. Die Ausnahme bilden die fünf akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22), bei denen jeweils nur die q-Arme (lange Arme) rot markiert werden, da die telomernahen Regionen der p-Arme aus überwiegend repetitiver und ribosomaler DNA bestehen, welche bei den akrozentrischen Chromosomen überwiegend identisch sind (KNIGHT et al, 1999). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Sonden der q-Arme der Geschlechtschromosomen (X und Y) und analog die Sonden der p-Arme der Geschlechtschromosomen die jeweiligen pseudoautosomalen Regionen markieren und aus diesem Grund jeweils identisch sind.

Bei den Sonden handelt es sich um ein Set subtelomerspezifischer PAC- oder P1-Klone und Cosmide (genauere Angaben siehe Tab.3.4 Details der subtelomerspezifischen Sonden, S. 25). Die maximale physikalische Distanz der Sonden zum jeweiligen Telomer beträgt zwischen weniger als 8 kb (7q) und bis zu 500 kb (4q und 19 p).

Die Hybridisierungssignale für jedes einzelne Subtelomerpaar wurden am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen und mit der ISIS Software der Firma MetaSystems ausgewertet und dokumentiert.

Zweifelhafte oder pathologische Resultate überprüften wir mit dem Vysis ToTelVysion Probe Panel, bei dem 2 bis 3 subtelomerspezifische Sonden in einem fertigen Hybridisierungsmix vorliegen. (Prinzip und Protokoll siehe unter Kapitel 2.2.2.3)

## 2.) Die Methode im Detail:

- Komponenten des Kits:
- Glass Multiprobe devices bedeckt mit 41 direkt markierten Sonden (später im Text als Sondenträger bezeichnet)
  - Glasobjektträger mit quadratischer Schabloneneinteilung
  - Hybridisierungslösung B : Formamid, Dextransulfat, SSC
  - Gegenfärbungslösung : DAPI ( ES : 0.125  $\mu\text{l/ml}$  ) , Antifade
  - Cytocell Thermometer in Form eines Objektträgers
  - Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisierungskammer
  - Deckglas ( 24 mm  $\times$  60 mm )

Tab.3.4 Details der subtelomerspezifischen Sonden (CYTOCELL)

**Telomere specific probe details**

Probe	Mode of Isolation	Vector	Clone name	sts Marker name	Max. physical distance from telomere (kb)	D Number
1p	terminal VNTR (CEPH)	cosmid	CEB1O8		<300 *	
1q	sts screen	PAC	160H23	1qtel19	80	D1S3739
2p	sts screen	PAC	dJ892G2O	2ptel27	330	D2S2983
2q	sts screen	PAC	dJ1011O17	2qtel47	240	D2S2986
3p	sts screen	PAC	dJ1186B18	3ptel25	450	D3S4559
3q	sts screen	PAC	196F4	3qtel06	450	D3S1272
4p	sts screen	PAC	36P21	4ptel04	73	D4S3360
4q	sts screen	PAC	dJ963K6	4qtel11	275-500	
5p	sts screen	PAC	189 N21	5ptel48	Unknown	
5q	sts screen	PAC	240G13	5qtel70	245	D5S2097
6p	TAGGG screen	PAC	62111	6ptel48	300	
6q	RM2158 VI sts	PAC	57H24	6qtel54	280	D6S2522
7p		Cosmid	109A6		<255	
7q		Cosmid	2000a5		<8	
8p	sts screen	PAC	dJ580L5	8ptel91	250	D8S2333
8q	sts screen	PAC	489D14	8qtel11	170	D8S1925
9p	sts screen	PAC	43N6	9ptel30	600	
9q	sts screen	PAC	112N13	9qtel33	65	D9S2168
10p	sts screen	PAC	306F7	10ptel45	320	D10S2488
10q	sts screen	PAC	137E24	10qtel24	270	D10S490
11p	sts screen	PAC	dJ908H22	11ptel03	125	D11S2071
11q	sts screen	PAC	dJ770G7	11qtel38	65	D11S4974
12p	TAGGG screen	PAC	496A11	12ptel27	Unknown	
12q	RM2196V1sts	PAC	221K18	12qtel87	190	D12S2343
13q	sts screen	PAC	163C9	13qtel56	170	D13S1825
14q	stsscreen	PAC	dJ820M16	14qtel01	200	D14S1420
15q	sts screen	PAC	124O5	15qtel56	300	
16p	sts screen	PAC	121I4	16ptel05	160	D16S3400
16q	sts screen	PAC	240G10	16qtel48	200	Z96319
17p	sts screen	PAC	202L17	17ptel80	60	D17S2199
17q	sts screen	PAC	362K4	17qtel13	90	D17S2200
18p	RM2102V1sts	P1	52M11	18ptel02	220	
18q	sts screen	PAC	dJ964M9	18qtel11	290	D18S1390
19p	sts screen	PAC	dJ546C11	19ptel29	250-500	
19q		Cosmid	F21283	19qtel82	*	
20p	sts screen	PAC	dJ1061L1	20pthy33	180	D20S502
20q	TAGGG screen	PAC	81F12	20qtel14	50	
21q	sts screen	PAC	63H24	21qtel07	175	D21S1446; D21S1575
22q	sts screen	PAC	99K24	22qtel31	120	D22S1726
XpYp		Cosmid	CY29		<25	

*Chromoprobe Multiprobe Versuchsprotokoll nach CYTOCELL:*

Einen kurzen orientierenden Überblick gibt das am Ende dieses Kapitels eingefügte stark schematisierte Kurzprotokoll (siehe Abbildung 3.1).

**A) Objektträgervorbereitung**

In einer Küvette gefüllt mit 100%igem Methanol werden die Objektträger für zwei Minuten gereinigt. Die vorbereitete Zellsuspension wird in Volumina von 2µl pro chromosomenspezifisches Areal und in zwei Arbeitsschritten auf die gesäuberten Objektträger getropft. Im ersten Arbeitsschritt werden in der oberen der drei Schablonenreihen ausschließlich auf die chromosomenspezifischen Areale mit ungerader Nummerierung getropft, in der mittleren Reihe auf die gerade nummerierten chromosomenspezifischen Areale und in der unteren Reihe auf die ungerade nummerierten chromosomenspezifischen Areale. Analog dazu werden, nach einer kurzen Unterbrechung zwecks Lufttrocknung der ersten Tropfen, die im ersten Arbeitsschritt ausgelassenen chromosomenspezifischen Areale im zweiten Arbeitsschritt vervollständigt. Im Phasenkontrast wird genau überprüft, ob die Zelldichte den Ansprüchen genügt. Im Sehfeld muß eine Mindestanzahl von 20 Kernen bei Verwendung eines 10er Objektivs zu finden sein. Dann können die benötigten mindestens 5 Metaphasen pro Quadrat erwartet werden. Bei einer zu hohen Zelldichte, verdünnt man die Suspension mit frischem Fixativ. Bei einer zu niedrigen Zelldichte ist eine erneute Zentrifugation notwendig, um eine höhere Zelldichte im nächsten Auftropfdurchgang zu gewinnen. Das minimale Zellsuspensionsvolumen, welches auf die einzelnen Kammern verteilt wird, beträgt 60 µl. Neben der Zelldichte spielen sich als störend auswirkende Zytoplasmareste ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Optimierung der Untersuchungsbedingungen. Es wird empfohlen, unmittelbar nach dem Auftropfen der 2µl Zellsuspension deren Ausbreitung genau zu beobachten und im Moment der maximalen Ausbreitung ggf. mit Hilfe einer zweiten Pipette einen Tropfen reines Fixativ nachzupipettieren und dadurch die Zytoplasmareste zu verdünnen.

**B) Vorbereitung des Sondenträgers und des Objektträgers**

Die Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisierungskammer wird in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad gelegt. Durch wiederholtes Pipettieren wird die Hybridisierungslösung gemischt und danach werden 30µl dieser Lösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert und ebenfalls bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Der

Sondenträger wird mit seiner beschrifteten Seite nach unten auf die auf 37°C vortemperierte Heizplatte gelegt. Dabei wird sorgsam darauf geachtet, nicht die Oberfläche des Sondenträgers zu berühren. Den getropften und luftgetrockneten Objektträger wäscht man für zwei Minuten in 2 x SSC bei Raumtemperatur. Im folgenden Schritt durchläuft der Objektträger drei jeweils zweiminütige Dehydrierungsschritte bestehend aus 70%igem, 85%igem und 100%igem Ethanol. Daraufhin lässt man den Objektträger lufttrocknen und neben dem Sondenträger auf der Heizplatte auf 37°C erwärmen. Jeweils 1 µl der erwärmten Hybridisierungslösung pipettiert man auf jedes der 24 markierten Areale des Sondenträgers, während dieser weiterhin auf der temperierten Heizplatte liegt.

C) Positionierung des Objektträgers auf den Sondenträger (siehe auch Abb. 3.1 schematisiertes Kurzprotokoll)

Der Objektträger wird von der Heizplatte genommen und gewendet, so dass sich das Quadrat mit der nun spiegelbildlichen Nummer 1 in der rechten oberen Ecke des Objektträgers befindet. Vorsichtig positioniert man das Quadrat Nummer 1 auf den gelben Punkt des Sondenträgers. Die Korrektheit dieses Schrittes ist von größter Bedeutung und verlangt genaues und ruhiges Arbeiten. Erst wenn man sich davon überzeugt hat, dass die Positionen von Objektträger und Sondenträger zueinander absolut korrekt sind, vermindert man langsam den Abstand beider Träger und presst sie unter leichtem Druck und ohne Verrutschen zusammen. Unter optimalen Bedingungen, wird sich nun die Hybridisierungslösung gleichmäßig in jedem Areal bis zu ihren jeweiligen Rändern ausbreiten und nicht in die benachbarten Areale fließen. Jetzt fasst man den entstandenen „Sandwich“ möglichst an dem Ende an, an dem der ca. 1 cm längere Objektträger übersteht und wendet den „Sandwich“, so dass sich der Objektträger unten und der Sondenträger oben befinden. Auch in diesem Schritt ist darauf zu achten, dass die einmal eingenommenen Positionen der Träger exakt beibehalten werden. Die folgenden 10 Minuten liegt der „Sandwich“ auf einer auf 37°C temperierten Heizplatte.

D) Gebrauchsanweisung zur Benutzung des Cytocell Thermometers

Die Temperatur der Heizplatte sollte unbedingt mit dem im Kit mitgelieferten Cytocell Thermometer vor der Denaturierung exakt überprüft werden. Dafür plaziert man das Cytocell Thermometer auf der Oberfläche der Heizplatte und wartet bis die verschiedenen Segmente aufhören, ihre Farben zu ändern. Die korrekte Temperatur ist erreicht, wenn die

zuletzt angezeigte Farbe blaßgrün ist. Das Cytocell Thermometer ist zum Mehrfachgebrauch geeignet, sollte aber nach maximal zehnfacher Verwendung ersetzt werden.

#### E) Co-Denaturierung

Wiederum wird der „Sandwich“ am überstehenden Ende des Objektträgers angefasst und auf die auf 75°C (+/- 1°C) vorgeheizte Heizplatte plaziert. Man sollte sich davon überzeugen, dass der untenliegende Objektträger guten Kontakt zur Oberfläche der Heizplatte hat. Die Denaturierungsdauer bei 75°C beträgt genau 120 Sekunden.

#### F) Hybridisierung

Nach der Denaturierung legt man den „Sandwich“ vorsichtig in die auf 37°C vortemperierte Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisierungskammer. Die durch einen Deckel verschlossene Hybridisierungskammer schwimmt die folgende Nacht in einem unverschlossenen, auf 37°C erwärmten Wasserbad.

#### G) Stringenzwaschung nach der Hybridisierung

In einer von zwei vorbereiteten Glasküvetten befindet sich eine 0,4 x SSC Lösung in einem 72°C heißem Wasserbad, in der anderen eine 2 x SSC und 0,05% Tween 20 Lösung bei Raumtemperatur (20-25°C). Man öffnet am nächsten Morgen die Hybridisierungskammer und nimmt den „Sandwich“ heraus. Der Sondenträger wird seitlich angefasst und von dem Objektträger abgehoben. Der Objektträger wird für 120 Sekunden in die heisse Glasküvette gestellt, anschließend für 30 Sekunden in die kühle Glasküvette getaucht.

#### H) Sichtbarmachen der Ergebnisse

Um die restlichen Lösungen vom Objektträger weitgehend zu entfernen, stellt man den Objektträger für ca. 20 Sekunden auf eine seiner vier Ecken auf ein Papiertuch und lässt möglichst viel abfließen. Der Objektträger soll dabei allerdings nicht trocknen. Dann tropft man 20 µl der mitgelieferten DAPI-Antifade Lösung auf den Objektträger und bedeckt diesen mit einem großen (24mm x 60mm) Deckglas. Eine Luftblasenbildung zwischen Objektträger und Deckglas sollte verhindert und gegebenenfalls durch Ausstreichen in einem Filterpapierblock beseitigt werden. Bevor man mit dem Mikroskopieren beginnt, bleibt der Objektträger noch für mindestens 10 Minuten abgedunkelt liegen.

### I) Bildaufnahme und Auswertung

Für die Aufnahme der Bilder der drei Fluoreszenz-Emissionen von FITC, Texas Red und DAPI, werden die in Tab. 3.5 beschriebenen Filter und Mikroskopeinstellungen verwendet (Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 60).

Tab. 3.5 Optimale Mikroskopeinstellung und Filterwahl:

Allgemeine Mikroskopeinstellung	
100 Watt Hg-Hochdruck-Lampe	60x Plan-Apochromat Objektiv

Filter Spezifizierung	
FITC/DAPI/Texas-Red Dreifachfilter zur simultanen Darstellung aller Fluoreszenzen	
FITC Einfachfilter zur alleinigen Darstellung der p-Arme	
Texas Red Einfachfilter zur alleinigen Darstellung der q-Arme	

Für die Digitalisierung der Fluoreszenzbilder wurde eine hochauflösende Schwarz/Weiss-CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, Arizona), die mit einem PC mit dem Softwareprogramm ISIS 3.0 der Firma MetaSystem verbunden ist, benutzt. Die Belichtungszeiten hängt von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab und liegen für FITC zwischen 1 und 5s, für Texas Red zwischen 1 und 3s und für DAPI zwischen 0,1 und 0,3s.

Die Auswertung wird mit Hilfe der ISIS 3.0 Software der Firma MetaSystems durchgeführt. Es wird für jede der drei eingesetzten Fluoreszenzen (FITC, Fluoresceinisothiocyanat – grün/ Texas-Red – rot / DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol-blau) – blau) unter Verwendung der selektiven Filtern getrennt ein Schwarz-Weiss-Bild aufgenommen und am Bildschirm mit einer Falschfarbe dargestellt, die der Farbe der entsprechenden Fluoreszenz entspricht.

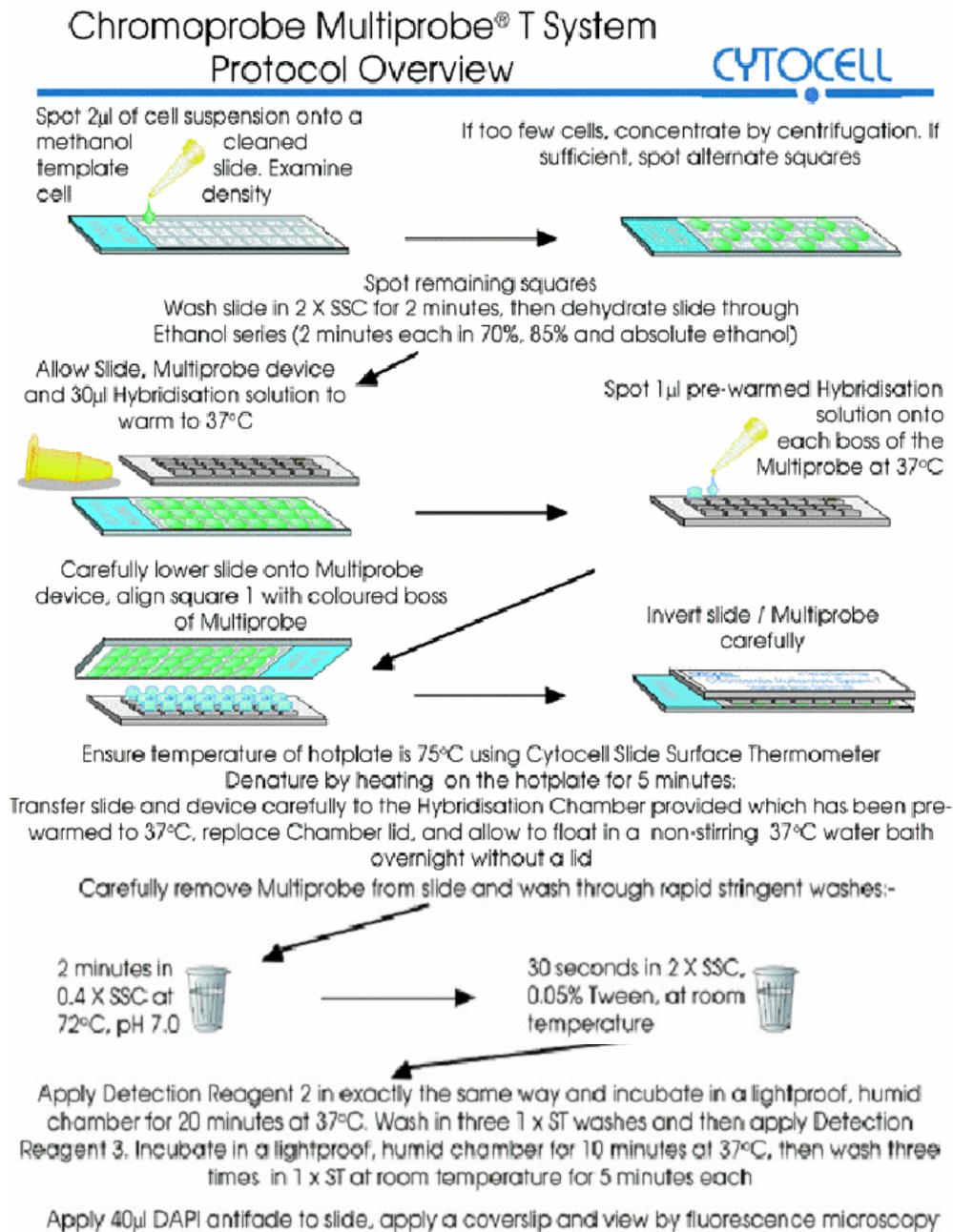
Die manuelle Auswertung erfolgt quadratweise und in jedem Quadrat stellen sich demnach die entsprechenden p-Arme grün (FITC) und die q-Arme rot (Texas-Red) dar. Die

Chromosomen selbst sind blau (DAPI). Als sehr störend, und im Folgenden noch detailliert beschrieben (unter Punkt 5), stellten sich die zahlreichen Kreuzhybridisierungen und Polymorphismen heraus, die zum Teil bereits vom Hersteller beschrieben und somit nachvollziehbar waren. Siehe Tab.3.6 (CYTOCELL)

Tab.:3.6 Kreuzhybridisierungen und Polymorphismen

Template slide square	Probe	Probe Label	Probe Brightness #	Cross-hybridisations (& Polymorphism) of probe clones	
1	1p	Green	3	2q polymorphism*	
	1q	Red	3		
2	2p	Green	2		
	2q	Red	3		
3	3p	Green	3		
	3q	Red	3		
4	4p	Green	3		
	4q	Red	3		
5	5p	Green	2		
	5q	Red	3		
6	6p	Green	3		
	6q	Red	3		
7	7p	Green	2		
	7q	Red	2		
8	8p	Green	2		8p with 1p and 3q (both faint)
	8q	Red	3		
9	9p	Green	3		9q with 10p and 16p, 18p, XqYq (all faint)
	9q	Red	3		
10	10p	Green	2		
	10q	Red	2		
11	11p	Green	3		11p with 17p
	11q	Red	3		
12	12p	Green	2		11q with 12q (interstitial)
	12q	Red	2	12p with 6p, 20q (both faint)	
13	13q	Red	3	15q with 1q, 15q (both interstitial)	
14	14q	Red	3		
15	15q	Red	3	17p with 17q (two interstitial sites)	
16	16p	Green	3		
17	16q	Red	3	17q with 1p, 6q (both faint)	
	17p	Green	3		
18	17q	Red	3		
	18p	Green	2		
19	18q	Red	3		
	19p	Green	3		
20	19q	Red	3		
	20p	Green	2	20q with 6p (faint)	
21	20q	Red	3		
	21q	Red	3		
22	22q	Red	3	22q with 2q (interstitial)	
	22q	Red	3		
23	XpYp**	Green	2		
	XqYq***	Red	2		

Abb. 3.1: Schematisiertes Kurzprotokoll (Originalprotokoll von CYTOCELL):



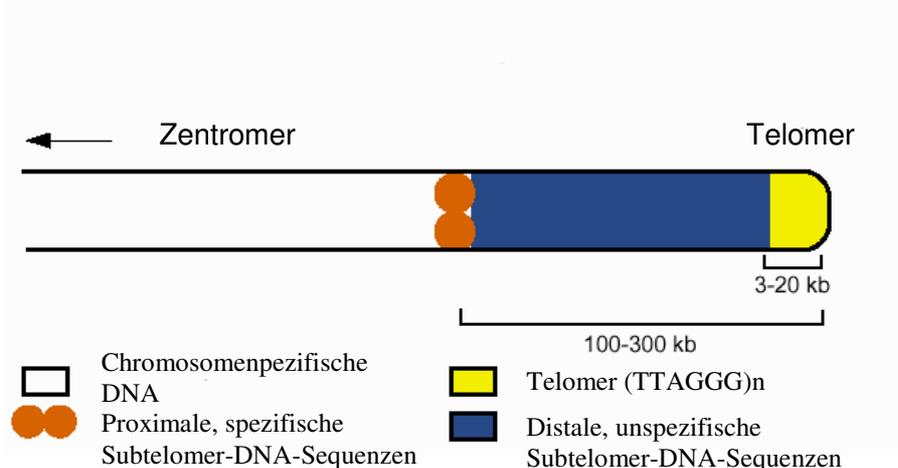
### 3.2.2.3 ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panel

#### 1.) Das Prinzip:

Die ToTelVysionMulti-color DNA Probe Mixtures bestehen aus 15 Mischungen mit insgesamt 62 direkt markierten DNA-Sonden. Das zugrundeliegende Prinzip der Methode ist auch die einer Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung. Zum einen befinden sich in der Mischungen 41 subtelomerspezifische Sonden (YAC-Klone) und zum anderen 21 zentromerspezifische Sonden (CEP-Einzelsequenz- oder LSI-alpha-satellite-Sonden). Die zuletzt genannten Sonden sind lediglich zur Erleichterung der Identifizierung einiger Chromosomen innerhalb der einzelnen Mischungen vorhanden und sind durchgängig mit dem Fluorochrom SpectrumAqua markiert. Die subtelomerspezifischen YAC-Sonden (ToTelVysion probes) für die p- und q-Arme der Chromosomen sind entweder mit SpectrumOrange und/oder SpectrumGreen markiert. Analog zu dem ChromoprobeMultiprobeT-System gibt es auch in dieser Sonden- Mischungen keine Sonden für den p-Arm der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22) und nur jeweils eine gemeinsame Sonde für den p-Arm und den q-Arm der X- bzw. Y-Chromosomen.

Die schematische Darstellung eines Chromosoms (Abbildung 3.2) soll verdeutlichen, daß sich die ToTelVysion probes maximal in einer physikalischen Distanz von 300 kb von der Telomerregion entfernt befinden. Die ToTelVysion probes (subtelomerspezifischen Sonden) sind als zwei orange Punkte dargestellt. Die Telomerregion (tandem repeat DNA-Sequenz) ist dort gelb gefärbt und beträgt zwischen 3 und 20 kb.

Abb. 3.2



Die folgende Tabelle 3.7 gibt detaillierte Informationen über die ToTelVysion probes (subtelomerspezifischen Sonden)

Tabelle 3.7 Details der subtelomerspezifischen Sonden

Telomer Probe	Locus/Clone ID	Location	Probesize	Bibliography
TelVysion 1p	CEB108/T7	1p	90 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 1q	VII yRM2123, 1QTEL10 (D1S3738), 1QTEL19 (D1S3739)	1q	100 kb	Negorev et al., Genomics 22:569-578, 1994; Rosenberg et al., Genome Research 7(9):917-923, 1997
TelVysion 2p	VII yRM1051 (GenBank U31389)	2p	175 kb	Macina et al., Genome Research 5:225-232, 1995
TelVysion 2q	VII yRM2112 (D2S447), 2QTEL47	2q	60 kb	Macina et al., Hum Mol Genet 3:1847-1853, 1994
TelVysion 3p	3PTEL25 (D3S4559)	3p	80 kb	Rosenberg et al., Genome Research 7(9):917-923, 1997; Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 3q	3QTEL05 (D3S4560)	3q	95 kb	Rosenberg et al., Genome Research 7(9):917-923, 1997; Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 4p	GS10K2/T7	4p	145 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 4q	AFM A224XH1 (D4S2930)	4q	130 kb	Dib, C. et al., Nature 380:152-154 (1996)
TelVysion 5p	C84C11/T3	5p	191 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 5q	GS35o8/T7, 5QTEL70	5q	105 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 6p	6PTEL48	6p	80 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 6q	VII yRM2158, 6QTEL54	6q	100 kb	Macina et al., Genome Research 5:225-232, 1995; Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 7p	VII yRM1185 (GenBank G31341)	7p	60 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 7q	VYJ yRM2000 (STS 2000H), 7QTEL20	7q	95 kb	Riethman et al., Genomics 17:25-32, 1993; Macina et al., Mamm Genome 5:596, 1994
TelVysion 8p	AFM 197XG5 (D8S504)	8p	135 kb	Dib, C. et al., Nature 380:152-154 (1996)
TelVysion 8q	VII yRM2053	8q	100 kb	Macina et al., Genome Research 5:225-232, 1995
TelVysion 9p	305J7-T7	9p	115 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 9q	VII yRM2241 (D9S325)	9q	95 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 10p	10PTEL006 (GenBank:Z96139)	10p	80 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 10q	10QTEL24 (D10S2490)	10q	75 kb	Rosenberg et al., Genome Research 7(9):917-923, 1997
TelVysion 11p	D11S2071 (GenBank U12896), 11PTEL03, VII yRM2209	11p	110 kb	Browne et al., Genomics 25:600-601, 1995
TelVysion 11q	VII yRM2072	11q	160 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 12p	8M16/SP6	12p	100 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 12q	VII yRM2196 (Genbank 011838)	12q	165 kb	Macina et al., Genome Research 5:225-232, 1995; Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 13q	VII yRM2002 (D13S327)	13q	75 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 14q	sts-X58399; SHGC-36156; sts-AA034492, telomeric IGHV segments	14q	160 kb	Matsuda et al., J. Exp. Med. 188:2151-2162, 1998

TelVysion 15q	WI-5214 (D15S936)	15q	100 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 16p	SHGC-15336, 16PTEL03 (D16S3399), 16PTEL05 (D16S3400), alpha globin gene cluster (HBZ,HBA2,HBA1,HBQ)	16p	110 kb	Rosenberg et al., Genome Research 7(9):917-923, 1997
TelVysion 16q	16QTEL013 (GenBank Z96319)	16q	110 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 17p	282M15/SP6	17p	70 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 17q	AFMZ17yD10 (D17S928, GenBank Z23646)	17q	160 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 18p	VII yRM2102 (D18S552)	18p	160 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 18q	VII yRM2050, 18QTEL11 (D18S1390), STSG193, AFM254VD5, STS-F04195, TIGR-A008P37, stSG52963	18q	170 kb	Ning et al., Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 19p	129F16/SP6	19p	80 kb	<a href="http://www-bio.llnl.gov/genome/html/chrommap.html">Http://www-bio.llnl.gov/genome/html/chrommap.html</a> ; Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 19q	D19S238E	19q	160 kb	Ashworth et al., Nat Genet 11(4): 422-427, 1995; <a href="http://www-bio.llnl.gov/genome/html/chrommap.html">http://www-bio.llnl.gov/genome/html/chrommap.html</a>
TelVysion 20p	20PTEL18 (D20S1157)	20p	160 kb	Rosenberg et al., Genome Research 7(9):917-923, 1997
TelVysion 20q	20QTEL14	20q	140 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion 21q	VII yRM2029, S100B3, 21QTEL08	21q	170 kb	Reston et al., Genomics 26:31-38, 1995; Ning et al., D21S1575 (21QTEL07), D21S1146, HRMTIL; Nat Genet 14:86-89, 1996
TelVysion 22q	MS607 (GenBank X58044), ACR, 22QTEL31 (D22S1726)	22q	80 kb	Armour, J. A. L., et al., Nucl Acid Res 19:3158, 1991; Wong, A.C.C., et al., Am J Hum. Genet.,60:113-120, 1997
TelVysion Xp/Yp	DXYS129	Xp/Yp	175 kb	Knight & Lese, et al., Am J. Hum. Genet.,67:320-332, 2000
TelVysion Xq/Yq	EST Cdy 16c07 (Genbank Z43206)	Xq/Yq	170 kb	D'Esposito et al, Nat Genet 13:227-229, 1996; Kvaloy et al., Human Mol Genet 3:771-778, 1994

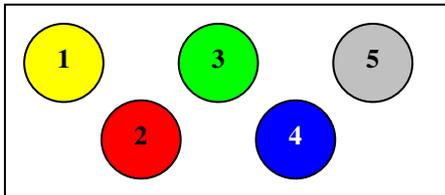
Die Hybridisierungssignale für jedes einzelne Subtelomerpaar und die Zentromere werden am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen und mit der ISIS Software der Firma MetaSystems ausgewertet und dokumentiert.

## 2.) Die Methode im Detail:

Komponenten des Kits: • 15 Gefäße mit jeweils 30µl Sonden-Mischung (Abb. 3.3 liefert die genaue Zusammensetzung der 15 Mischungen und deren späteres Auftropfschema auf die drei Objektträger)

Abb. 3.3

Objektträgernummer	Fluorochromzusammensetzung der einzelnen Mixturen
--------------------	---

**Objektträger 1**

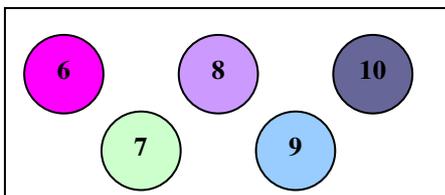
Mischung 1: 1p = SG 1q = SO Xp/Yp = GO CEP X = SA

Mischung 2: 2p = SG 2q = SO Xq/Yq = GO CEP X = SA

Mischung 3: 3p = SG 3q = SO 22q = GO LSI 22 = SA

Mischung 4: 4p = SG 4q = SO 21q = GO LSI 21 = SA

Mischung 5: 5p = SG 5q = SO

**Objektträger 2**

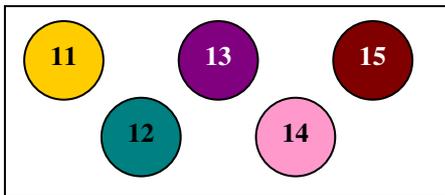
Mischung 6: 6p = SG 6q = SO 13q = GO LSI 13 = SA

Mischung 7: 7p = SG 7q = SO 14q = GO LSI 14 = SA

Mischung 8: 8p = SG 8q = SO 17p = GO CEP 17 = SA

Mischung 9: 9p = SG 9q = SO 17q = GO CEP 17 = SA

Mischung 10: 10p=SG 10q=SO 15q = GO LSI 15 = SA

**Objektträger 3**

Mischung 11: 11p=SG 11q=SO 18p = GO CEP 18 = SA

Mischung 12: 12p=SG 12q=SO 18q = GO CEP 18 = SA

Mischung 13: 16p=SG 16q=SO

Mischung 14: 19p=SG 19q=SO

Mischung 15: 20p=SG 20q=SO

LEGENDE: SG=SpektrumGreen SO=SpektrumOrange GO=SpektrumGreen/SpektrumOrange  
SA=SpektrumAqua

*ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panel-Versuchsprotokoll:***A) Objektträgervorbereitung**

Für den Fall, daß alle 24 menschlichen Chromosomen untersucht werden sollen, benötigt man drei Objektträger. Diese werden mit jeweils 5 Tropfen á 5µl wie im oben gezeigten Schema (Abbildung 3.3) präpariert. Jeder Tropfen soll im Phasenkontrast auf seine Qualität untersucht werden. Es ist darauf zu achten, daß die Metaphasen weit genug gespreitet sind und der Hintergrund (v.a. Zytoplasma) möglichst gering ist. Es folgt die Markierung (Ø 12mm) eines jeden der 15 Areale (Tropfen) mit einem Diamantschreiber.

### B) Objektträgervorbereitung

Die Objektträger werden für 10 Minuten bei 37°C in 2xSSC inkubiert. Danach werden die Chromosomen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer 3,7%Formaldehyd/1xPBS-Lösung (Postfix) nachfixiert und anschließend für 5 Minuten in PBS gewaschen (beides bei Raumtemperatur). Der Proteinverdau findet in einer Glasküvette gefüllt mit 100ml 0,05% Pepsin in 0,01M HCl bei 37°C im Wasserbad statt und dauert zwischen 60 und 120 Sekunden. Wiederum schließt sich eine fünfminütige Waschung der Objektträger in PBS bei Raumtemperatur an. In einer aufsteigenden Ethanol-Reihe 70%-85%-100% werden die Objektträger (jeweils 2 Minuten) dehydriert und auf einer 42°C temperierten Heizplatte für 2 bis 4 Minuten getrocknet.

### B) Sonden-Mixtur-Vorbereitung

Jeweils 2µl aus jedem der 15 Sonden-Mixturen werden auf die vorher markierten Areale getropft und sofort mit einem runden Deckglas (Ø 12mm) eingedeckt. Dabei ist genauestens darauf zu achten, daß die Sonden-Mixturen exakt mit den richtigen Arealen übereinstimmen. Jedes Deckglas wird mit Fixogum abgedichtet.

### C) Co-Denaturierung und Hybridisierung

Die Denaturierung findet auf einer Heizplatte bei 70°C statt und dauert genau 3 Minuten. Anschließend werden die Objektträger unverzüglich in eine feuchte Kammer gelegt und dort bei 37°C über Nacht (12 bis 16 Stunden) hybridisiert.

### D) Rapid Wash Procedure

Nachdem die Deckgläser von den Objektträgern entfernt sind, schließt sich eine zweiminütige Waschung der Objektträger in 73°C heißen 0,4xSSC/0,3%NP-40 an. Danach werden die Objektträger unverzüglich für ebenfalls 2 Minuten in 2xSSC/0,1%NP-40 bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgt eine aufsteigende Ethanol-Reihe, die dreimalig 2 Minuten dauert. Man läßt die Objektträger im Dunkeln lufttrocknen und deckt sie anschließend mit DAPI/Antifade ein.

### E) Bildaufnahme und Auswertung

Das Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX 70) muß mit den passenden Filtern für die vier Fluorochrome ausgestattet sein.

Für die Digitalisierung der Fluoreszenzbilder wird eine CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, Arizona), die mit einem PC mit dem Softwareprogramm ISIS 3.0 der Firma MetaSystem verbunden ist, benutzt. Die Belichtungszeiten hängen von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab und liegen für SpecrumAqua, SpectrumGreen und SpectrumOrange zwischen 1 und 5s und für DAPI zwischen 0,1 und 0,3s.

Die Auswertung wird mit Hilfe der ISIS 3.0 Software der Firma MetaSystems durchgeführt. Es wird für jedes der vier eingesetzten Fluorochrome (SpecrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumOrange und DAPI) unter Verwendung der selektiven Filtern getrennt ein Schwarz-Weiss-Bild aufgenommen und am Bildschirm in Falschfarbendarstellung mit der Farbe der entsprechenden Fluoreszenz dargestellt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Gesamtübersicht**

Bei den ersten 25 der insgesamt 70 Fälle untersuchten wir die Subtelomerregionen aller 24 menschlichen Chromosomen mit zwei unterschiedlichen Methoden parallel, um eventuelle Vorteile der jeweiligen Methode zu erkennen und gezielt einzusetzen. Wir entschieden uns zum Einen für das Chromoprobe Multiprobe-T System, ein Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierungskit der Firma Cytocell, mit dem die gleichzeitige Detektion der Subtelomerregionen der kurzen und langen Arme aller 24 menschlichen Chromosomen mit direktmarkierten subtelomerspezifischen Sonden möglich war. Zum Anderen arbeiteten wir mit SKY, einer 24-Farben-FISH-Technik, welche die simultane Darstellung aller menschlichen Chromosomen in verschiedenen Farben ermöglichte. Somit bestand theoretisch die zusätzliche Möglichkeit, Aussagen über eventuell vorhandene strukturelle Umbauten von Chromosomen, evtl. auch in den Subtelomerregionen, zu machen. Nach dem ersten Screening von 25 Patienten stellte sich allerdings heraus, dass durch SKY weder zusätzlich Informationen gewonnen werden konnten, noch dass die Auflösung von SKY, bezüglich des Erkennens von subtelomerischen Veränderungen, den hohen Ansprüchen eines effizienten Subtelomerscreenings entsprach (siehe Abschnitt 4.2). Somit entschieden wir uns für die anschließende Gruppe von 45 Patienten für das alleinige Anwenden des Subtelomerscreenings mittels des Chromoprobe Multiprobe-T Systems (Cytocell) und/oder subtelomerspezifischen Sonden (ToTelVysion probes) (Vysis Inc.). Zusätzlich untersuchten wir den Chromosomensatz beider Elternteile chromosomal auffälliger Kinder mit subtelomerspezifischen Sonden, um eine weitestgehend genaue Aussage bezüglich einer Familiarität und einem eventuellen Wiederholungsrisiko der Aberration bei fortbestehendem Kinderwunsch geben zu können.

Die Tabelle 4.1 gibt einen Überblick und geht der detaillierten Darstellung sämtlicher auffälligen Befunde voraus. Die vier pathologischen Befunde sind in der Tabelle mint-grün hervorgehoben. Ferner sind die fünf (unter Punkt 4.6 genau beschriebenen) gefundenen chromosomalen Polymorphismen, die trotz ihrer genotypischen Veränderung nicht für die geistige Behinderung, also nicht für den Phänotyp verantwortlich gemacht werden können, gelb gekennzeichnet. Außerdem sind in der Kopfzeile der Tabelle die fünf Einschlußkriterien und in der Fußzeile die prozentualen Häufigkeiten eines jeden Einschlußkriteriums violett unterlegt. Die durchschnittliche Gesamtpunktzahl aller Patienten ist in Grau hervorgehoben.

### Ergebnistabelle 4.1

Patienten-Nr.	MR	Familiarität	Pränatale WR	Postnatale WR	Faciale Dys.	Non-Faciale Dys.	Gesamtpunktzahl	Karyogramm	Subtelomere
Patient 1	schwer		2	1	2		5	46 XX	ohne pathol.
Patient 2	mittel	1	2	2	2	2	9	46 XY	ohne pathol.
Patient 3	schwer				2	1	2	46 XY	ohne pathol.
Patient 4	schwer				2	2	4	46 XY	ohne pathol.
Patient 5	schwer				2	2	4	46 XX	ohne pathol.
Patient 6	schwer				2	2	4	46 XX	ohne pathol.
Patient 7	schwer		2	2	2	2	8	46 XY	ohne pathol.
Patient 8	mittel		2	2	2	2	8	46 XX	ohne pathol.
Patient 9	schwer			1		2	3	46 XY	ohne pathol.
Patient 10	mittel	1		2	2	1	6	46 XY	ohne pathol.
Patient 11	schwer				2	2	4	46 XX	ohne pathol.
Patient 12	mittel		2	1	2	1	6	46 XY	ohne pathol.
Patient 13	mittel		2	2	2	2	8	46 XY	ohne pathol.
Patient 14	mittel		2	2	2		6	46 XX	Xp-Poly
Patient 15	schwer				2	1	3	46 XX	ohne pathol.
Patient 16	schwer		2	2	2	2	8	46 XX	Mono4p
Patient 17	mittel			2	2	2	6	46 XY	ohne pathol.
Patient 18	mittel			2	2	2	6	46 XX	ohne pathol.
Patient 19	schwer		2	1	2	1	6	46 XX	ohne pathol.
Patient 20	mittel				2	1	3	46 XX	ohne pathol.
Patient 21	mittel		2	1		2	5	46 XX	ohne pathol.
Patient 22	leicht		2	2	2	2	8	46 XX	ohne pathol.
Patient 23	schwer				2	1	3	46 XY	ohne pathol.
Patient 24	mittel			1	2		3	46 XY	ohne pathol.
Patient 25	mittel				2	2	4	46 XX	ohne pathol.
Patient 26	mittel			1	2	2	5	46 XX	2q- Poly
Patient 27	schwer					2	2	46 XX	ohne pathol.
Patient 28	schwer		2	2	2	2	8	46 XX	ohne pathol.
Patient 29	schwer				2	1	3	46 XX	ohne pathol.
Patient 30	mittel				2	2	4	46 XX	ohne pathol.
Patient 31	mittel			1	2	2	5	46 XY	ohne pathol.
Patient 32	schwer	1		2	2	1	6	46 XY	ohne pathol.
Patient 33	mittel				2	2	4	46 XY	ohne pathol.
Patient 34	leicht	1			2		3	46 XY	ohne pathol.
Patient 35	mittel				2	1	3	46 XX	ohne pathol.
Patient 36	schwer	1			2		3	46 XY	ohne pathol.

**Legende:** MR = Mentale Retardierung WR = Wachstumsretardierung Dys. = Dysmorphien Mono = Monosomie Tris = Trisomie pathol. = pathologisch

### Ergebnistabelle 4.1

Patient 37	schwer	1		2		2	5	46 XX	ohne pa
Patient 38	leicht			2	2	2	6	46 XX	ohne pa
Patient 39	schwer				2	1	3	46 XY	ohne pa
Patient 40	mittel			1	2	1	4	46 XX	ohne pa
Patient 41	schwer				2		2	46 XY	ohne pa
Patient 42	schwer				2		2	46 XX	ohne pa
Patient 43	mittel		2	2	2	2	8	46 XY	ohne pa
Patient 44	schwer				2	2	4	46 XX	ohne pa
Patient 45	mittel				2		2	46 XY	ohne pa
Patient 46	schwer		2	2	2	1	7	46 XY	ohne pa
Patient 47	leicht			1	2	2	5	46 XX	ohne pa
Patient 48	mittel			1	2		3	46 XY	ohne pa
Patient 49	mittel			1	2	2	5	46 XY	8p Dele
Patient 50	schwer			1	2		3	46 XY	ohne pa
Patient 51	schwer			2	2		4	46 XY	ohne pa
Patient 52	schwer			2	2	2	6	46 XX	ohne pa
Patient 53	schwer		2			2	4	46 XX	ohne pa
Patient 54	schwer				2		1	46 XX	ohne pa
Patient 55	mittel	1			2		3	46 XX	ohne pa
Patient 56	mittel				2	1	3	46 XX	ohne pa
Patient 57	schwer			2			2	46 XX	2q- Poly
Patient 58	leicht			1	2	1	4	46 XX	ohne pa
Patient 59	schwer			1	2		3	46 XY	ohne pa
Patient 60	schwer		2	2	2		6	46 XY	2q- Poly
Patient 61	schwer				2	2	4	46 XY	ohne pa
Patient 62	schwer		2		2	2	6	46 XY	Mono7c
Patient 63	schwer		2	2	2	2	8	46 XX	Mono1p
Patient 64	schwer	1	2	1	2	2	8	46 XX	ohne pa
Patient 65	mittel		2	2	2	2	8	46 XY	ohne pa
Patient 66	schwer				2		2	46 XX	ohne pa
Patient 67	schwer				2	1	3	46 XX	ohne pa
Patient 68	mittel				2	2	4	46 XY	2q- Poly
Patient 69	schwer				2	1	3	46 XX	ohne pa
Patient 70	schwer				2	1	3	46 XX	ohne pa
Häufigkeit in %		11,4%	28,6%	54,3%	91,4%	75,7%	4,6	entspricht der Durchschnittspunk	

**Legende:** MR = Mentale Retardierung WR = Wachstumsretardierung Dys. = Dysmorphien Mono = Monosomie Tris = Trisomie pathol. = pathologisch

## 4.2 Informative Fälle

### 4.2.1 Fall 1 (Patient 16)

#### Anamnese:

Die im Januar 1993 geborene Patientin fiel bereits bei ihrer Geburt durch deutlich unter der 3er Perzentile liegender Körperlänge, Kopfumfang und Gewicht auf. Dies änderte sich im Laufe der Kinderfrüherkennungsuntersuchungen U1 bis U9 nicht wesentlich und war ebenfalls bei der letzten Vorstellung der Patientin im Oktober 2001 (also im Alter von acht Jahren und neun Monaten) im Institut für Humangenetik nachvollziehbar. Bei ihrer Geburt lag ein kleiner Ventrikelseptumdefekt und eine mittlerweile operierte Weichgaumenspalte mit fraglicher Kieferspalte links vor. Ferner fiel eine Klinodaktylie am 5.Finger beider Hände auf. Sie litt bis zum letzten Vorstellungstermin an zerebralen Krampfanfällen. Ihre Ohren waren leicht nach hinten rotiert und die Ohrmuscheln groß und nur wenig geformt. Es bestand eine Balkonstirn, ein kleines Kinn und beidseits ein geringer Epikanthus. Insgesamt war sie ein hypotrophes Kind mit deutlicher muskulärer Hypotonie. Eine Sprachentwicklung hatte bis dato nicht stattgefunden. Ferner fiel sie stets durch eine hohe Infektanfälligkeit auf, die mittels Immunglobulin-Infusionen behandelt wird. Ein weiteres ähnlich betroffenes Familienmitglied sei laut Elternaussagen in beiden Familien nicht bekannt.

#### Zusammenfassung der Einschlußkriterien:

- 1) Familiäre geistige Behinderung: **nein**
- 2) Pränatale Wachstumsretardierung: **ja** (Geburtsgewicht unter dem 3er Perzentil)
- 3) Postnatale Wachstumsstörung: **ja** (Mikrozephalus, Kleinwuchs, musk. Hypotonie)
- 4) Faziale Dysmorphiezeichen: **ja** (bds Epikanthus, Balkonstirn, Ohranomalie)
- 5) Nicht-faziale D. +/- Organmißbildung: **ja** (Ventrikelseptumdefekt, Klinodaktylie)

Abb. 4.1: Beide Fotos zeigen die Patientin im Alter von knapp neun Jahren.

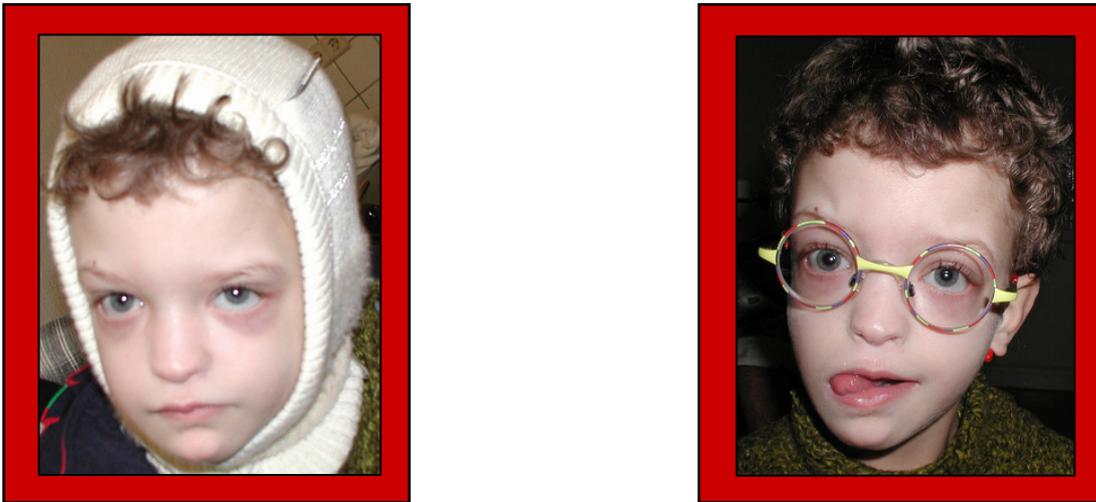
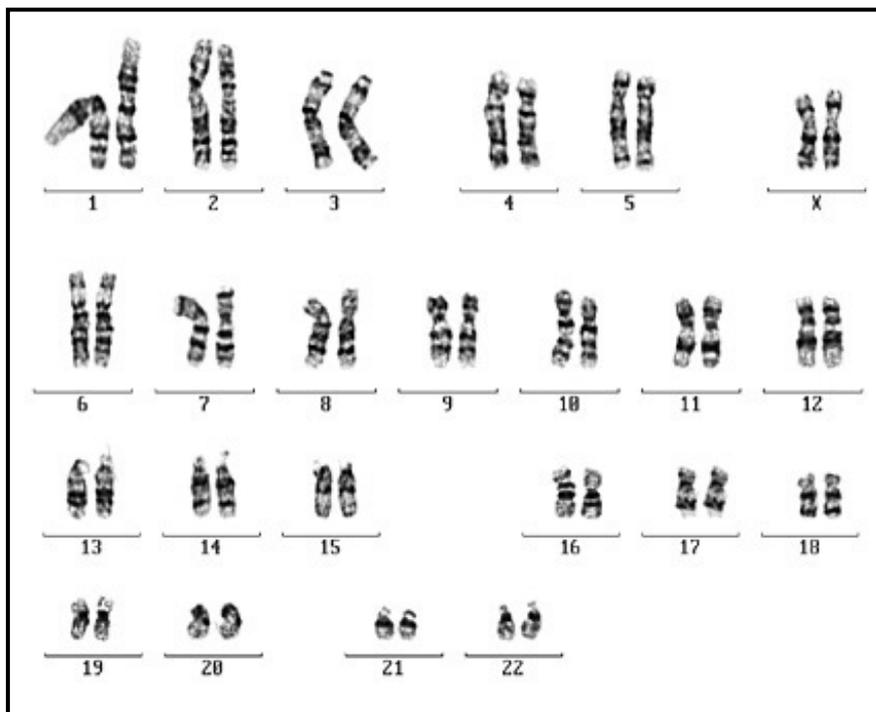


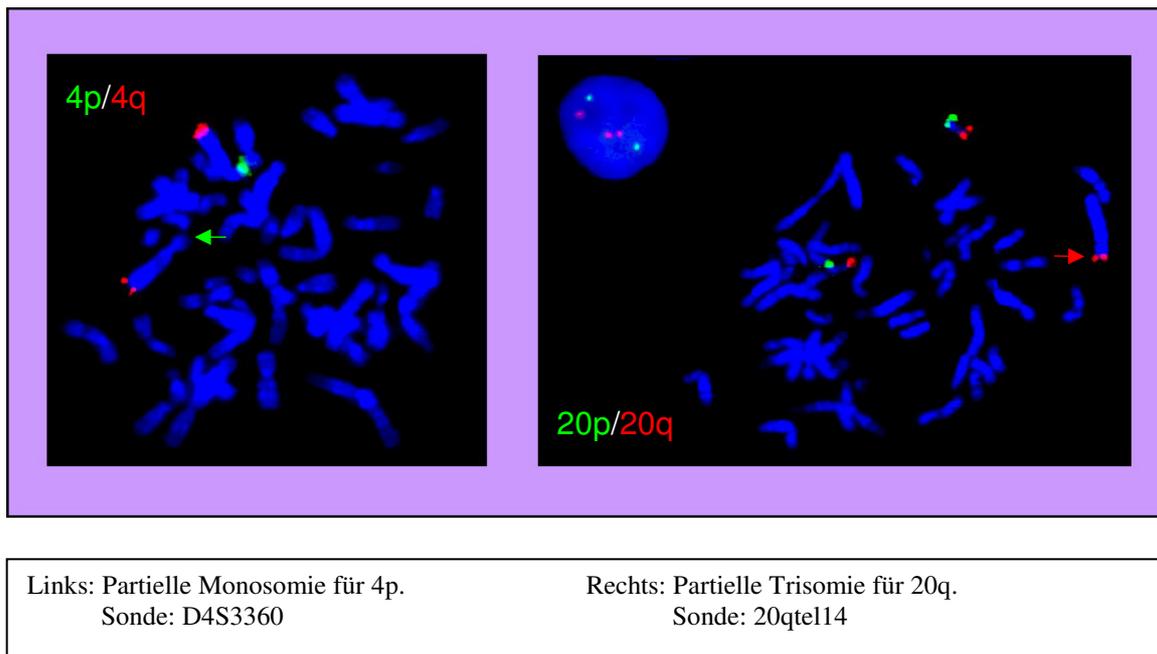
Abb. 4.2: Karyogramm: 46,XX



Strukturell unauffälliger weiblicher Karyotyp.

Nachdem wir bei der durchgeführten Chromosomenanalyse der kleinen Patientin einen, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, sowohl numerisch als auch strukturell unauffälligen weiblichen Chromosomensatz gefunden hatten, erfolgte anschließend eine erweiterte zytogenetische Diagnostik mit den subtelomerspezifischen Sonden der Firma Cytocell und den SKY-Paintproben der Firma ASI.

Abb. 4.3: Ergebnisse des Chromoprobe Multiprobe T-Systems (Cytocell):



Bei der Auswertung der Signale der subtelomerspezifischen Sonden der Firma Cytocell fiel im Hybridisierungsareal für Chromosom 4 in sämtlichen ausgewerteten Mitosen der Verlust der Subtelomerregion jeweils eines der beiden kurzen Arme von Chromosom 4 auf (grünes Signal fehlt). Damit lag eine partielle Monosomie für den kurzen Arm des Chromosoms 4 vor. Im weiteren Verlauf ergab die Auswertung sämtlicher Mitosen im Hybridisierungsareal für Chromosom 20 ein zusätzliches Signal für die Subtelomerregion des langen Arms von Chromosom 20 (drei rote Signale). Somit war eine partielle Trisomie des langen Armes eines Chromosoms 20 detektiert.

Daraus ergab sich folgender **Karyotyp**: 46,XX, der(4)t(4;20)(p16;q13)

Bei der kleinen Patientin liegt eine Variante eines Wolf-Hirschhorn-Syndroms vor (Abkürzung: WHS), basierend auf einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 20. Klinisch überwiegen die durch die Deletion 4p verursachten Symptome mit dem Phänotyp eines WHS. Dabei handelt es sich um ein Krankheitsbild, welches neben einer schweren geistigen Behinderung, vor allem durch drei weitere Hauptprobleme charakterisiert ist. Zum einen sind es die epileptische Anfälle, die bei 50-100% der Patienten anzutreffen sind, zum anderen ist es die Schwierigkeit, das betroffene Kind im Säuglings- und Kleinkindalter zu füttern. Weiterhin ist bei einem Teil der betroffenen Kinder ein Antikörpermangel beschrieben, mit daraus resultierender stark erhöhter Infektneigung. Im Zusammenhang mit dem WHS Phänotyp wurden ferner gehäuft

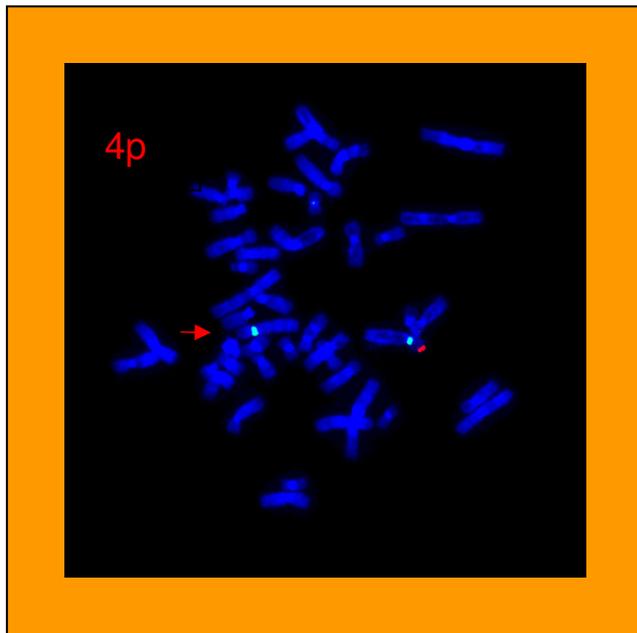
Herzfehler beschrieben. Bei unserer Patientin waren diese charakteristischen Symptome in verschieden starker Ausprägung vorhanden. Sie leidet unter einer schweren geistigen Behinderung, zerebralen Krampfanfällen, erhöhter Infektneigung und einem angeborenen Ventrikelseptumdefekt.

Auffällig ist, dass bei der hier vorliegenden partiellen Monosomie 4p, die die Wolf-Hirschhorn-Region umfasst, und der vorliegenden partiellen Trisomie 20q, die WHS-Symptomatik das Krankheitsbild zu dominieren scheint. Eine Abgrenzung einer möglicherweise auf die partielle Trisomie 20 zurückzuführenden Symptomatik ist im Einzelfall nicht möglich.

#### Kontrollsonden:

Die FISH-Ergebnisse des Chromoprobe Multiprobe T-Systems wurden zum einen mittels FISH mit der Wolf-Hirschhorn-Sonde (D4S96) und zum anderen mittels SKY überprüft und bestätigt.

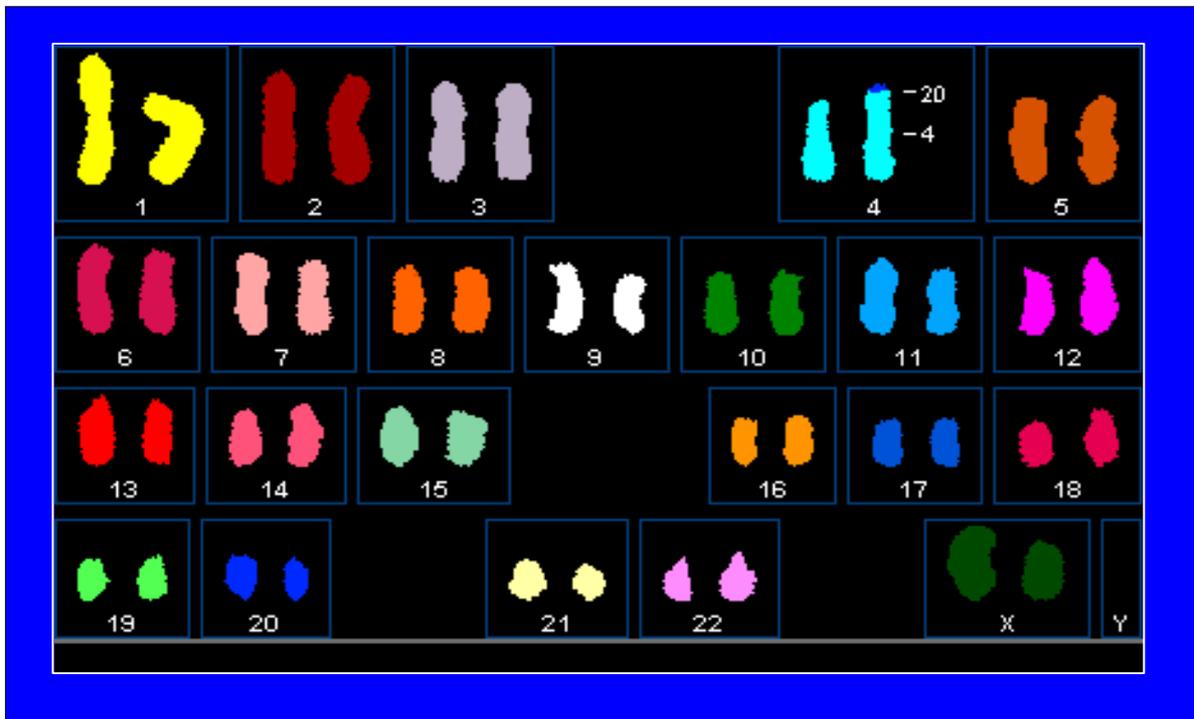
Abb. 4.4: Kontrollergebnis der Wolf-Hirschhorn-Sonde (D4S96)



Nachweis einer Deletion 4p16.3 (Sonde D4S96)

Durch den Nachweis der Deletion 4p16.3 in den untersuchten Mitosen konnte bei der Patientin die klinische Verdachtsdiagnose eines Wolf-Hirschhorn-Syndroms bestätigt werden.

Abb. 4.5: Kontrollergebnis der SKY-Paint-probes (ASD):



Am kurzen Arm eines Chromosoms 4 erkennt man transloziertes Material des Chromosoms 20.

In der Mehrzahl der ausgewerteten Mitosen (also nicht wie bei Chromoprobe Multiprobe T-System in sämtlichen ausgewerteten Mitosen) war am terminalen kurzen Arm eines Chromosoms 4 eine abweichende Farbmarkierung zu erkennen, die als Material des Chromosoms 20 identifiziert wurde. Umgekehrt zeigte sich am Chromosom 20 kein Material des Chromosoms 4 transloziert. Damit entsprach auch der SKY-Befund einer unbalancierten Translokation 4;20.

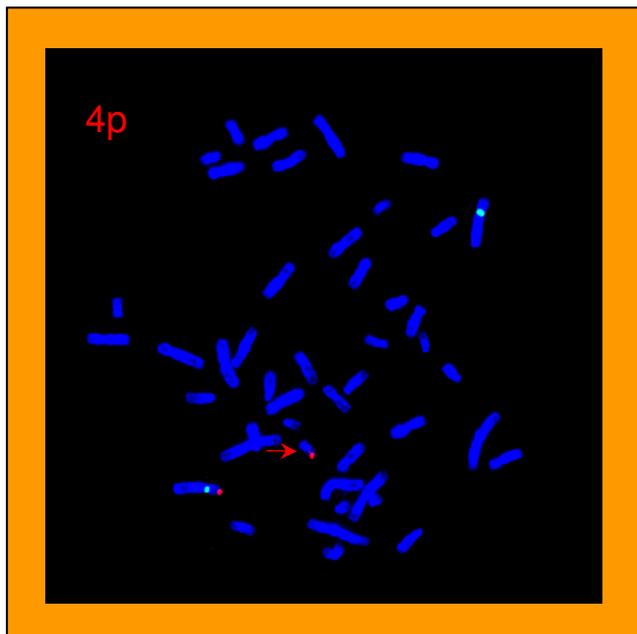
An diesem Punkt der Befunderhebung war der logische Folgeschritt die zytogenetische Untersuchung der Eltern, um eine eventuelle Familiarität, d.h. eine balancierte Translokation t(4;20) bei einem Elternteil von einer de-novo Entstehung zu unterscheiden.

Eltern-Befunde:

Vater: Numerisch und strukturell, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, unauffälliger männlicher Chromosomensatz mit dem Karyotyp 46,XY. Die Chromosomenuntersuchung des Vaters mittels der lokusspezifischen DNA Sonde WHS (D4S96) ergab ebenfalls regelrechte Signale an beiden kurzen Armen der 4er Chromosomen. Damit war der Vater als Verursacher für die unbalancierte Translokation ausgeschlossen.

Mutter: Der zytogenetische Untersuchungsbefund mittels der WHS-Sonde (siehe nächstes Bild) zeigte jeweils ein regelrechtes Signal an einem Chromosom 4 sowie an einem Chromosom der F-Gruppe als Hinweis auf eine Translokation zwischen einem Chromosom der F-Gruppe und einem Chromosom 4.

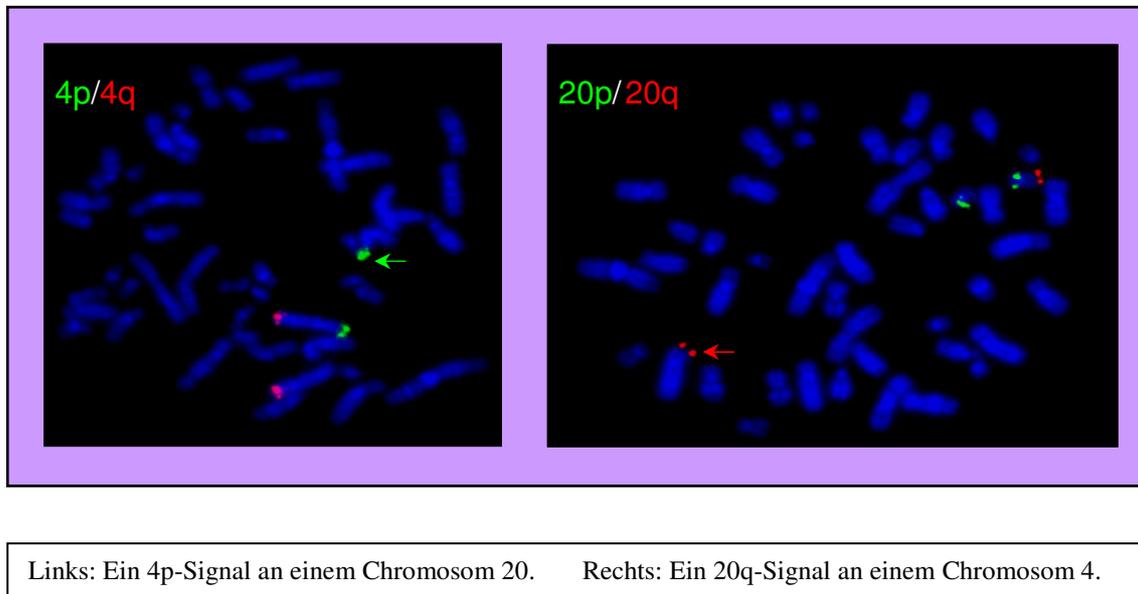
Abb. 4.6: Ergebnis der Wolf-Hirschhorn-Sonde (D4S96)



Nachweis einer Translokation zwischen 4p und einem Chromosom der F-Gruppe (Sonde D4S96)

Zur genaueren Bestimmung des Chromosoms der F-Gruppe, welches an dieser Translokation beteiligt war, untersuchten wir den Chromosomensatz der Mutter ebenfalls mit den subtelomerspezifischen Sonden der Firma Cytocell.

Abb. 4.7: Ergebnisse des Chromoprobe Multiprobe T-Systems (Cytocell):

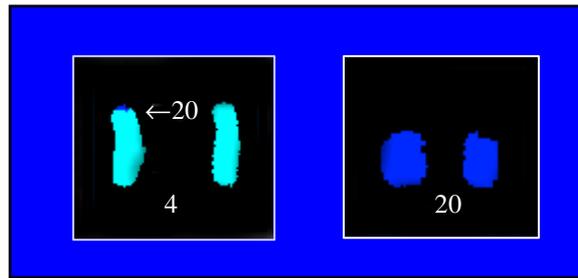


Die Auswertung der Chromoprobe-Multiprobe-Sonden ergab im Hybridisierungsareal 4 (analog zu den WHS-Sonden), jeweils ein regelrechtes 4p-Signal an einem Chromosom 4, sowie ein 4p-Signal (grünes Signal) an einem Chromosom 20. Vervollständigt wurde dieser Befund mit der Auswertung des Hybridisierungsareals für Chromosom 20, in welchem eindeutig Material von einem Chromosom 20 (rotes Signal) auf ein Chromosom 4 transloziert ist. Damit handelt es sich offenbar um eine balancierte reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 20 und 4 und konnte damit als Ursache für die unbalancierte Translokation bei der Tochter angenommen werden.

Es ergab sich bei der Mutter folgender **Karyotyp**: 46, XX,t(4;20)(p16;q13)

Auch den Chromosomensatz der Mutter untersuchten wir zusätzlich mit SKY-Paint-probes der Firma ASI. Die Auswertung mit SKY zeigte in der Mehrzahl der ausgewerteten Mitosen jeweils deutlich am kurzen Arm eines Chromosom 4 transloziertes Material eines Chromosom 20. Umgekehrt lag der vom Chromosom 4 auf ein Chromosom 20 translozierte Bereich offenbar unter der Auflösungsschwelle der Technik. Die reziproke Translokation stellte sich daher nicht dar. Aus diesem Grund entschieden wir uns dafür, die folgenden Fälle nicht mehr mit SKY und Subtelomersonden parallel zu untersuchen, sondern ein reines Subtelomerscreening durchzuführen.

Abb. 4.8: SKY-Bilder der Mutter:



Links: Material von Chromosom 20 auf Chromosom 4 erkennbar.  
Rechts: kein transloziertes Material auf Chromosom 20 erkennbar.

Zusammenfassung:

Die kleine Patientin leidet an einem Wolf-Hirschhorn-Syndrom mit Nachweis einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosom 4 und dem Chromosom 20 (**Karyotyp:** 46,XX,der(4)t(4;20)(p16;q13)mat) infolge einer mütterlichen balancierten reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 20 (**Karyotyp:** 46,XX,t(4;20)(p16;q13)). Damit besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für das Auftreten von Fehlgeburten sowie für die Geburt weiterer schwerbehinderter Kinder.

#### 4.2.2 Fall 2 (Patient 49)

##### Anamnese:

Die Geburt des männlichen Patienten im Februar 2000 erfolgte in der 40. Schwangerschaftswoche per Sectio aufgrund eines Geburtsstillstandes. Er lag bei seiner Geburt mit Kopfumfang und Körpergröße etwa auf der 50er Perzentile. Im Laufe der ersten beiden Lebensjahre fiel er aber zunehmend durch eine Entwicklungsverzögerung auf. Bei seiner letzten Vorstellung im März 2002 (also im Alter von zwei Jahren und zwei Monaten) wirkte der Patient klein für sein Alter, auffallend muskulär hypoton und konnte sich aus dem Sitzen nicht selbstständig aufrichten. Bei dem Patienten bestand bei Z.n. Spontanverschluss eines Ventrikelseptumdefektes (VSD) eine links persistierende obere Hohlvene. Ferner litt er an supraventrikulären Tachykardien. Bei der Inspektion des Patienten fielen tiefsitzende, dorsal rotierte und einfach modellierte Ohren auf, eine breite und vortretende Stirn mit hohem Haaransatz, ein flaches Philtrum und leicht überstreckbare distale Gelenke. Ein weiteres ähnlich betroffenes Familienmitglied sei laut Elternaussagen in beiden Familien nicht bekannt.

##### Zusammenfassung der Einschlußkriterien:

- 1) Familiäre geistige Behinderung: **nein**
- 2) Pränatale Wachstumsretardierung: **nein**
- 3) Postnatale Wachstumsstörung: **ja** (Kleinwuchs, muskuläre Hypotonie)
- 4) Faziale Dysmorphiezeichen: **ja** (Ohranomalien, breite und vortretende Stirn, flaches Philtrum)
- 5) Nicht-faziale D. +/- Organmißbildung: **ja** (Z.n. VSD, persistierende obere Hohlvene, überstreckbare distale Gelenke)

Abb. 4.9: Beide Fotos zeigen den Patienten im Alter von zwei Jahren.

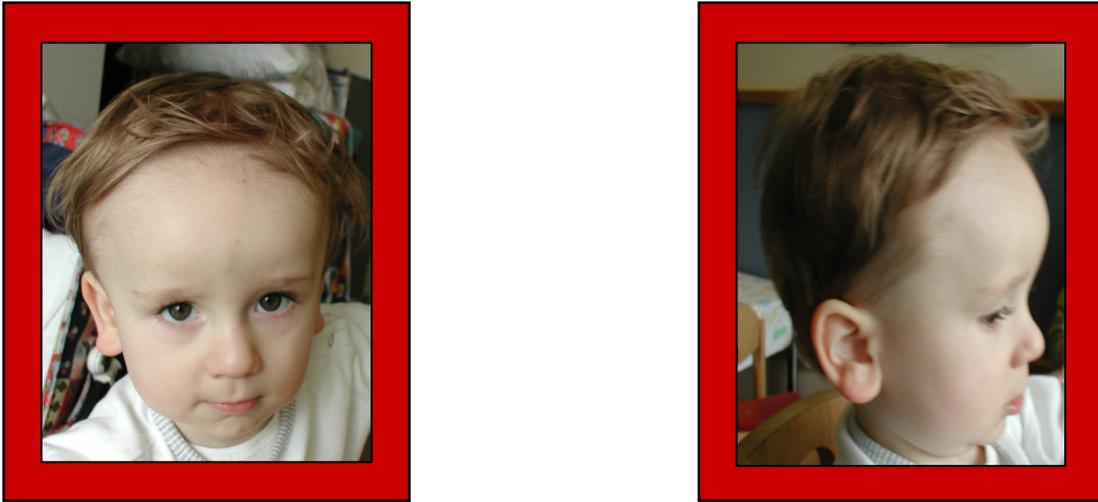
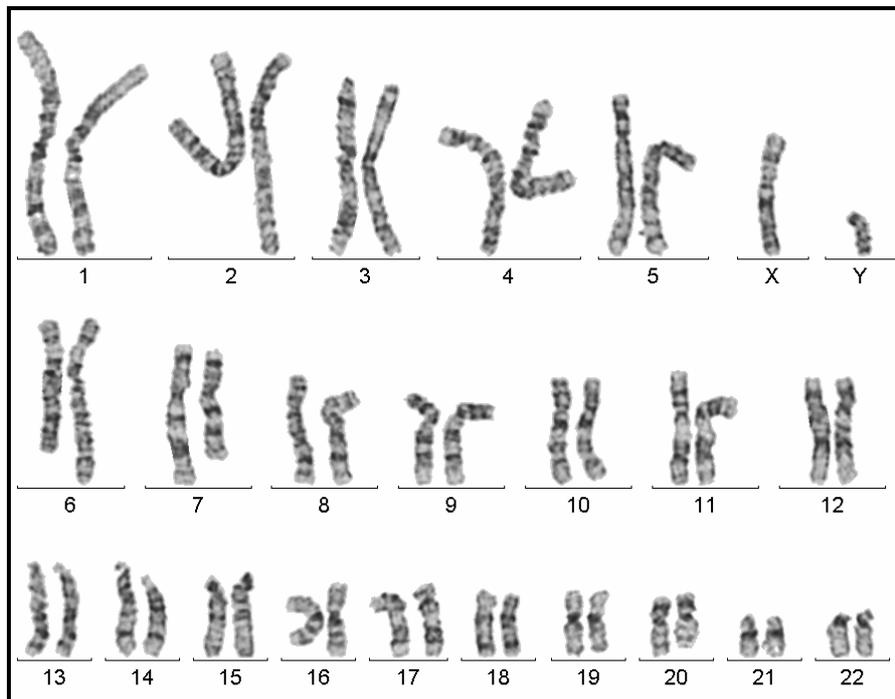


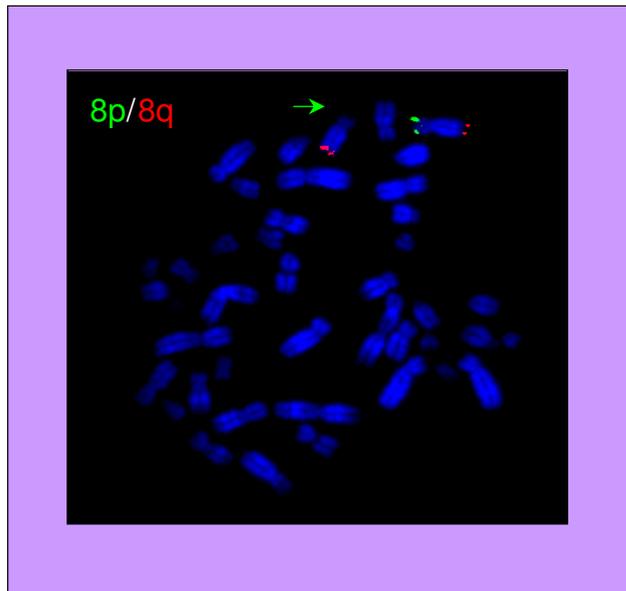
Abb. 4.10: Karyogramm: 46,XY



Strukturell unauffälliger männlicher Karyotyp.

Nachdem wir bei der durchgeführten Chromosomenanalyse des Patienten einen, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, sowohl numerisch als auch strukturell unauffälligen männlichen Chromosomensatz gefunden hatten, erfolgte anschließend eine erweiterte zytogenetische Diagnostik mit den subtelomerspezifischen Sonden der Firma CytoCell.

Abb.4.11: Ergebnisse des Chromoprobe Multiprobe T-Systems (CytoCell):



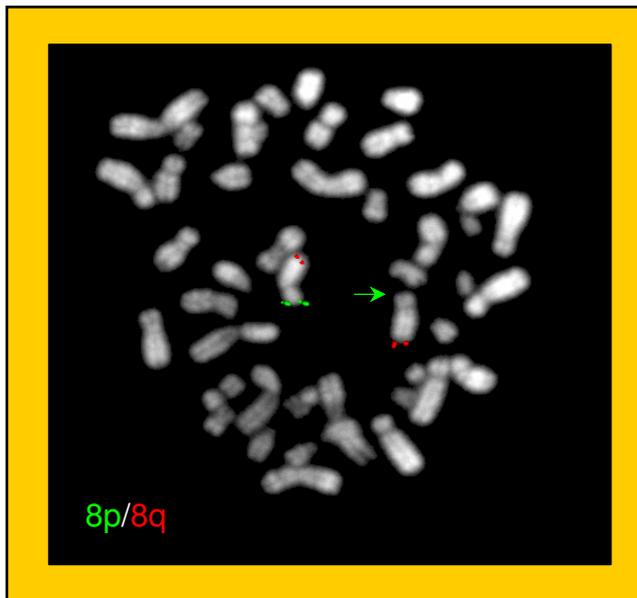
Im Hybridisierungsareal für Subtelomerregion des Chromosoms 8: Kein Signal für Subtelomerregion 8p an einem Chromosom 8. Sonde: D8S2333

Bei der Auswertung der Signale der subtelomerspezifischen Sonden der Firma CytoCell fiel im Hybridisierungsareal für Chromosom 8 in sämtlichen der ausgewerteten Mitosen der Verlust der Subtelomerregion jeweils eines der beiden kurzen Arme von Chromosom 8 auf (grünes Signal fehlt). Alle anderen subtelomerspezifischen Sonden zeigten normale Befunde. Daher lautet die erweiterte zytogenetische Diagnose: Subtelomerische Deletion im kurzen Arm eines Chromosoms 8 mit dem **Karyotyp**: 46,XY.ish del(8) (p23.3) (D8S2333-)

Kontrollsonden:

Der auffällige Befund wurde mit einer unabhängigen Kontrolluntersuchung (VYSIS, TelVysion 8p, Locus D8S504) bestätigt. Bild siehe nächste Seite.

Abb. 4.12: Bild der Kontrollsonde der Firma Vysis:



Kein Signal für Subtelomerregion 8p an einem Chromosom 8. Sonde: D8S504

Zusatzuntersuchung:

Außerdem wurde bei diesem Patienten eine Bestimmung der Deletionsgröße mittels FISH mit DOP-PCR amplifizierten fluoreszenzmarkierten (von p-terminal Richtung Zentromer abwechselnd Biotin-FITC, Digoxigenin-Rhodamin markiert) locusspezifischen DNA-Sonden (MPI für molekulare Genetik, Berlin) durchgeführt.

Tab. 4.2: Deletionsmapping der locusspezifischen DNA-Sonden:

Bande	Sonde	Anzahl detektierter 8p-Sondensignale pro Sonde
8p23	D8S504	nur ein 8p Sondensignal
8p23	D8S264/D8S262	nur ein 8p Sondensignal
8p23	D8S1824/D8S1781	nur ein 8p Sondensignal
8p23	D8S518	nur ein 8p Sondensignal
8p23	D8S277	nur ein 8p Sondensignal
8p23	AFM249WA9	nur ein 8p Sondensignal
8p22	D8S552/D8S1754	regelrecht zwei 8p Sondensignale
8p22-23	D8S258/D8S280	regelrecht zwei 8p Sondensignale
8p22	D8S282	regelrecht zwei 8p Sondensignale

Interpretation des Deletionsmappings:

Der Befund ergab fehlende Signale am kurzen Arm eines Chromosoms 8 für alle für die Bande 8p23 hybridisierten Sonden in sämtlichen untersuchten Mitosen. Die Sonde AFM249WA9 liegt circa 7,5 MB proximal vom Telomer und ist das letzte fehlende Signal, bevor dann die nächstfolgende Sonde (D8S552/D8S1754, die circa 12,5 MB proximal vom Telomer liegt) wieder regelrechte Signale an beiden 8er Chromosomen zeigt. Der Bereich zwischen D8S504 bis einschließlich AFM249WA9 ist damit deletiert. Zwischen den Sonden AFM249WA9 und D8S552 liegt in einer Entfernung von 10,4 MB vom Telomer das Gen GATA4, dessen Fehlen sehr wahrscheinlich für - die bei Kindern mit 8p-Deletion vorhandenen - Herzfehler verantwortlich ist. Da unser Patient einen 8p<sup>-</sup> typischen Herzfehler aufweist, ist diese Region höchstwahrscheinlich auch noch deletiert. Die Deletion erstreckt sich somit über einen Bereich von etwa 10 MB von der Subtelomerregion über nahezu die ganze Bande 8p23. (Siehe dazu das folgende Bild des Deletionsmappings der fünf terminalsten 8p23-Sonden)

Abb. 4.13



Fehlende Signale für alle im Bereich 8p23 hybridisierenden Sonden.

#### Eltern-Befunde:

*Vater:* Numerisch und strukturell unauffälliger männlicher Chromosomensatz mit dem Karyotyp 46, XY. Die Chromosomenuntersuchung des Vaters mittels der 8p-Sonde D8S504 der Firma Vysis ergab regelrechte Signale an beiden kurzen Armen der 8er Chromosomen. Damit bestand kein Hinweis auf die beim Kind nachgewiesenen Subtelomerdeletion 8p.

*Mutter:* Numerisch und strukturell unauffälliger weiblicher Chromosomensatz mit dem Karyotyp 46, XX. Die Chromosomenuntersuchung der Mutter mittels der 8p-Sonde D8S504 der Firma Vysis ergab regelrechte Signale an beiden kurzen Armen der 8er Chromosomen. Damit bestand kein Hinweis auf die beim Kind nachgewiesenen Subtelomerdeletion 8p.

#### Zusammenfassung:

Bei dem kleinen Patienten fanden wir in der erweiterten zytogenetischen Untersuchung eine subtelomerische Deletion im kurzen Arm eines Chromosoms 8 mit dem **Karyotyp:46, XY,del (8) (p23)**. Bei unauffälligen Untersuchungsbefunden beider Elternteile konnte eine Familiarität der Deletion ausgeschlossen werden. Dementsprechend ist das Wiederholungsrisiko für weitere Kinder als sehr gering einzustufen. Es handelt sich um eine de-novo Deletion.

### 4.2.3 Fall 3 (Patient 62)

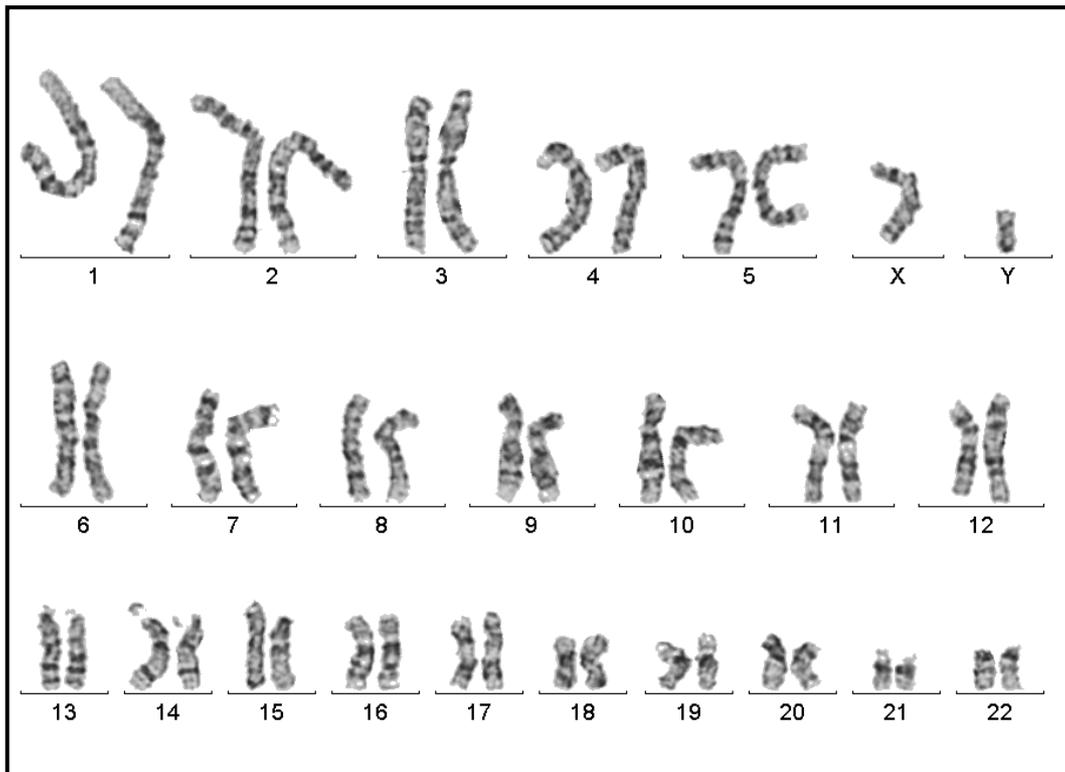
#### Anamnese:

Der kleine Junge kam im Februar 2002 in der 36. Schwangerschaftswoche mit einem Geburtsgewicht von 1800g zur Welt. Schon während der Schwangerschaft waren eine fetale Dystrophie und ein Oligohydramnion aufgefallen. Der Patient zeigte multiple Auffälligkeiten, u.a. eine Holoprosenzephalie, eine Nierenhypoplasie, ein persistierendes Foramen ovale, sowie einen persistierenden Ductus arteriosus. Bei der Inspektion fiel ein deutlich dysmorphes Gesicht mit fliehender Stirn, prominenten Augen, tiefer Nasenwurzel, mit flacher Nase und tiefsitzenden, dysplastischen Ohren auf. Eine kontrakte Haltung in den Ellenbogen- und Kniegelenke, eine röntgenologische Andeutung einer postaxialen Hexadaktylie an den Händen und eine Hypospadie waren außerdem erkennbar. Es handelte sich um das erste Kind phänotypisch gesunder Eltern und ein weiteres ähnlich betroffenes Familienmitglied sei laut Elternaussagen in beiden Familien nicht bekannt.

#### Zusammenfassung der Einschlußkriterien:

- 1) Familiäre geistige Behinderung: **nein**
- 2) Pränatale Wachstumsretardierung: **ja** (1800g Geburtsgewicht, fetale Dystrophie, Holoprosenzephalie)
- 3) Postnatale Wachstumsstörung **entfällt** (Patient verstarb im Alter von 2 Monaten)
- 4) Faziale Dysmorphiezeichen: **ja** (Ohranomalie, nasale Anomalie)
- 5) Nicht-faziale D. +/- Organmißbildung: **ja** (Persistierende Foramen ovale und Ductus arteriosus, Hypospadie, V.a. Hexadaktylie)

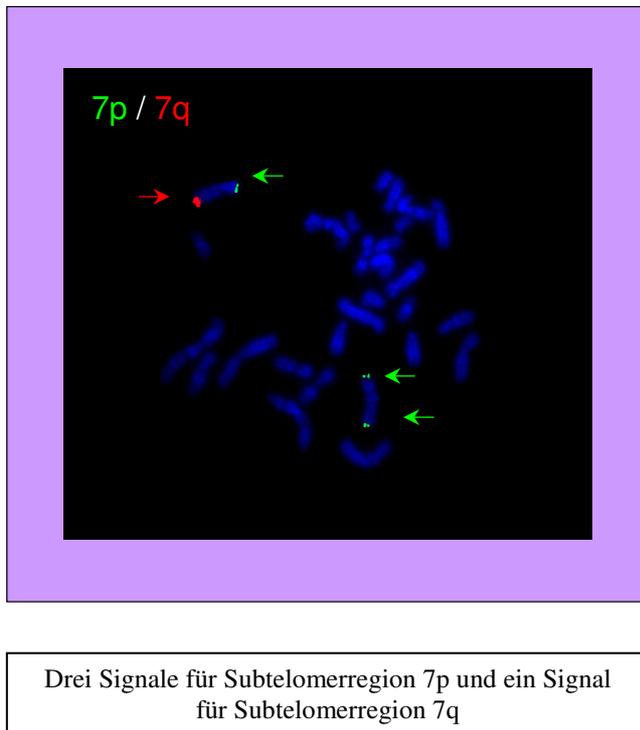
Abb. 4.14: Karyogramm: 46,XY



Strukturell unauffälliger männlicher Karyotyp.

Nachdem wir bei dem Patienten einen, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, sowohl numerisch als auch strukturell unauffälligen männlichen Chromosomensatz gefunden hatten, erfolgte anschließend eine erweiterte zytogenetische Diagnostik mit den subtelomerspezifischen Sonden des Chromoprobe Multiprobe T-Systems der Firma Cytocell.

Abb. 4.15: Ergebnisse des Chromoprobe Multiprobe T-Systems (Cytocell):



Bei der Auswertung der Signale der subtelomerspezifischen Sonden der Firma Cytocell fiel im Hybridisierungsareal für Chromosom 7 in sämtlichen ausgewerteten Mitosen an jeweils einem Chromosom 7 ein fehlendes Signal für die subtelomerspezifische Region 7q auf. Stattdessen fanden wir an diesem Chromosom sowohl am kurzen, als auch am langem Arm Signale für die Region 7p (zwei grüne Signale an einem Chromosom 7). Das jeweils andere 7er Chromosom war unauffällig, genauso wie die restlichen 22 Chromosomenpaare.

Damit ergab sich die erweiterte zytogenetische Diagnose: Trisomie für den p-terminalen Bereich des Chromosoms 7 und Monosomie für den q-terminalen Bereich des Chromosoms 7.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Symptomatik des Kindes und dem erweiterten Untersuchungsbefund war in diesem Fall als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Insbesondere das Leitsymptom der Holoprosenzephalie kann zurückgeführt werden auf die Deletion im Bereich der telomernahen Region eines langen Arms eines Chromosom 7, da eines der Holoprosenzephalie verursachenden Gene, das sogenannte Sonic-Hedge-Hog-Gen (SHH-Gen) auf dem langen Arm des Chromosoms 7 telomernah auf der Bande 7q36 lokalisiert werden konnte.

Kontrollsonden:

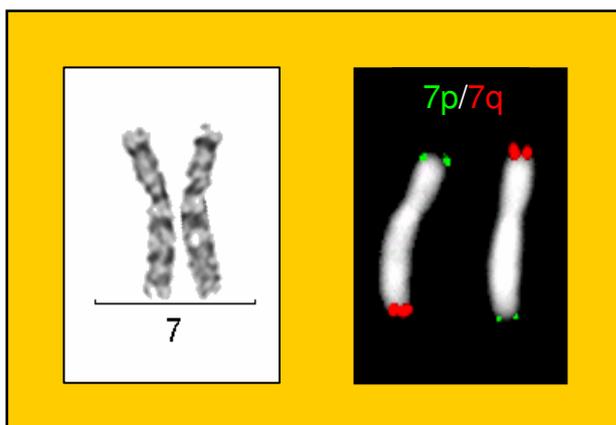
Der auffällige Befund wurde mit einer unabhängigen Kontrolluntersuchung mittels subtelomerspezifischen Sonden für die Bereiche 7p und 7q der Firma VYSIS bestätigt. Auch hier zeigte die Sonde VIJyRM1185 (spezifisch für tel7p) eine Trisomie und die Sonde VIJyRM2000, 7QTEL20 (spezifisch für tel7q) eine Monosomie.

Im nächsten Schritt erfolgte die zytogenetische Untersuchung der Eltern, da eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür bestand, dass die kindliche Chromosomenaberration auf dem Boden einer elterlichen Chromosomenanomalie entstanden war.

Eltern-Befunde:

*Mutter:* In der konventionellen Chromosomenuntersuchung fanden wir einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Chromosomensatz. Die Chromosomenuntersuchung der Mutter mittels der subtelomerspezifischen Sonden 7p und 7q der Firma Vysis ergab regelrechte Signale. Damit bestand kein Hinweis auf eine mütterliche Chromosomenanomalie.

*Vater:* Nachdem in der konventionellen Chromosomenuntersuchung ebenfalls ein numerisch und strukturell unauffälliger männlicher Chromosomensatz gefunden wurde, schlossen wir eine FISH-Untersuchung mit den subtelomerspezifischen Sonden für die Bereiche 7p und 7q der Firma VYSIS an.

Abb. 4.16: Ergebnis der Untersuchungen:

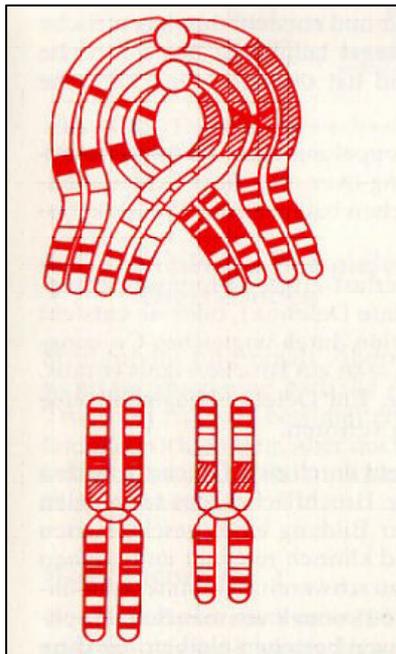
Ein normales Chromosom 7 und ein Chromosom 7, bei dem die Telomersignale umgekehrt sind.

Die Sonden zeigten in allen ausgewerteten Mitosen ein Chromosom 7 mit unauffälligen Signalen und ein Chromosom 7, an dem am Telomer des kurzen Armes die in rot markierten Sonden der Subtelomerregion 7q und am Telomer des langen Armes die grün markierten Sonden der Subtelomerregion 7p hybridisierten. Bei dem Vater fand sich damit eine große perizentrische Inversion eines Chromosoms 7. Das heißt, es kam zu einer Drehung eines Chromosomenstückes innerhalb des Chromosoms 7 um  $180^\circ$ , wobei das Zentromer Teil des Chromosomenstückes war (siehe dazu auch Bild 4.17). Die Bruchpunkte dieser Inversion konnten auf dem kurzen Arm mit der Bande 7p22.1 und auf dem langen Arm in der Bande 7q36 lokalisiert werden. Die Inversion betraf damit nahezu das ganze Chromosom 7, wobei die distalen Fragmente kaum mehr als die Subtelomerregionen ausmachten. Aus diesem Grund war die Inversion hellfeldmikroskopisch nicht zu erkennen. Da der Vater phänotypisch gesund ist, ist von einem balancierten chromosomalen Rearrangements auszugehen.

Im Rahmen von Crossing-over Ereignissen während der Reifeteilung der Keimzellen kann solch eine Inversion ursächlich für die Entstehung eines unbalancierten Chromosomensatzes sein, wie es beispielsweise bei diesem Patienten der Fall gewesen ist.

Es besteht ein hohes Risiko (laut Literatur bis zu 20%) für neuerliche sekundäre Veränderungen bei weiteren Nachkommen (Sieber et al, 1990).

Bild 4.17 (Buselmaier et al, 1991)



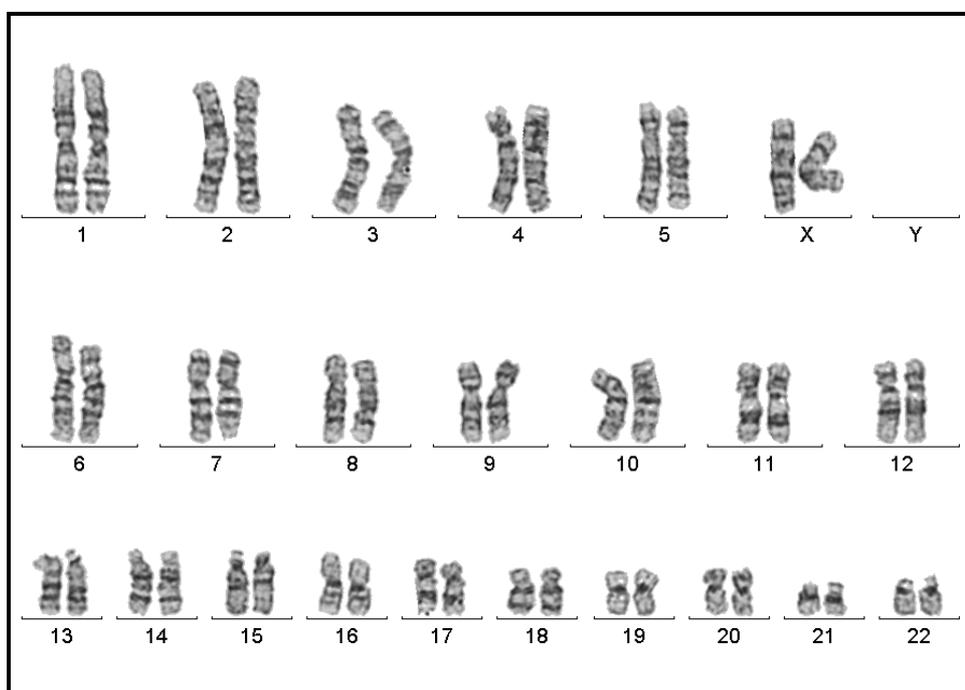
Perizentrische Inversionsschleife.

#### 4.2.4 Fall 4 (Patient 63)

##### Anamnese:

Die im Februar 2002 geborene Patientin kam mit einem Geburtsgewicht von 1500 g zur Welt. Dies entspricht in etwa der 10er Perzentile. Die Vorstellung der kleinen Patientin in unserer Institutsambulanz fand etwa im Alter von 2 Jahren statt. Fotos der Patientin liegen uns leider nicht vor. Bei der Inspektion fiel eine Valgus-Fehlstellung der Füße, eine deutliche Dystrophie und faziale Dysmorphiezeichen (u.a. dysplastische, tiefsitzende Ohren) auf. Im weiteren Verlauf entwickelte sich zusätzlich ein Hydrozephalus. Die kardiologische Zusatzuntersuchung ergab ferner einen muskulären Ventrikelseptumdefekt. Ein weiteres ähnlich betroffenes Familienmitglied sei laut Elternaussagen in beiden Familien nicht bekannt. Da die Kombination aus Herzfehler und fazialen Dysmorphiezeichen relativ häufig beim sogenannten DiGeorge-Syndrom vorkommt, entschieden wir uns vor einer eventuellen Subtelomeruntersuchung zunächst für eine molekularzytogenetischen Untersuchung auf eine Mikrodeletion in der Region 22q11. Zur Einleitung der Diagnostik wurde zunächst, wie bei allen Fällen, der Chromosomensatz der Patientin mittels einer Karyotypisierung untersucht.

Abb. 4.18: Karyogramm: 46,XX



Strukturell unauffälliger weiblicher Karyotyp.

Nachdem man bei der durchgeführten Chromosomenanalyse der Patientin einen, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, sowohl numerisch als auch strukturell unauffälligen weiblichen Chromosomensatz gefunden hatte, erfolgte anschließend eine molekularzytogenetische Untersuchung mittels FISH mit der lokusspezifischen DNA-Sonde LSI DiGeorg/VCFS der Firma VYSIS. Diese Sonde hybridisiert im Bereich 22q11.2. Die zugehörige Kontrollsonde LSI ARSA (Arylsulfatase A) hybridisiert im Bereich 22q13.3, also weiter distal am gleichen Arm des Chromosoms 22. Parallel dazu wurde eine weitere FISH-Untersuchung mit der lokusspezifischen DNA-Sonde N25 der Firma ONCOR durchgeführt. Auch diese hybridisiert im Bereich 22q11.2. Bei der zugehörigen Kontrollsonde handelt es sich um die Sonde 22qter.

#### Ergebnisse der Untersuchung mit DiGeorge-Sonden:

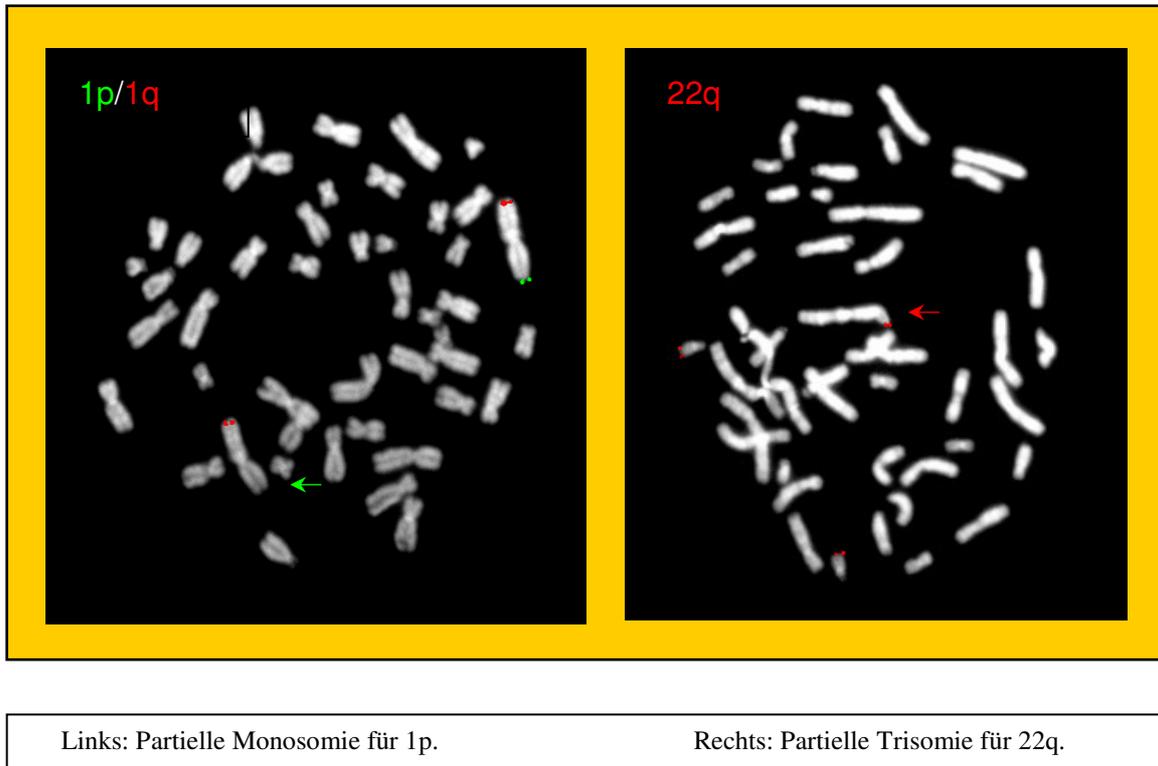
Es ergab sich kein Hinweis auf das zunächst vermutete DiGeorge-Syndrom. Die lokusspezifischen DNA-Sonden LSI DiGeorge/VCFS und N25 zeigten in allen ausgewerteten Mitosen regelrechte Hybridisierungssignale an den q-Armen der Chromosomen 22 im Bereich 22q11.2.

Allerdings gab es eine reproduzierbare Auffälligkeit im Bereich beider Kontrollsonden LSI ARSA und 22qter. An einem Chromosom 1 jeder Mitose fanden wir ein zusätzliches Signal der jeweiligen Kontrollsonde für den Bereich der q-terminalen Region von Chromosom 22. Im Anschluß erfolgte deshalb die erweiterte zytogenetische Diagnostik mit den subtelomerspezifischen Sonden der Firma VYSIS.

Bezüglich der Einschlusskriterien erfüllte die kleine Patientin vier von fünf Kriterien, welche im Folgenden aufgeführt werden.

#### Zusammenfassung der Einschlusskriterien:

- |  |   |
|--|---|
| 1) Familiäre geistige Behinderung:       | <b>nein</b>   |
| 2) Pränatale Wachstumsretardierung:      | <b>ja</b> (Geburtsgewicht 1500 g, entspricht ca dem 10er Perzentil) |
| 3) Postnatale Wachstumsstörung:          | <b>ja</b> (Dystrophie, Hydrozephalus)                               |
| 4) Faziale Dysmorphiezeichen:            | <b>ja</b> (u.a. Ohranomalien)                                       |
| 5) Nicht-faziale D. +/- Organmißbildung: | <b>ja</b> (Valgusfehlstellung d. Füße, muskulärer VSD)              |

Abb. 4.19: Ergebnisse der subtelomerspezifischen Sonden (VYSIS):

Bei der Auswertung der Signale der subtelomerspezifischen Sonden der Firma VYSIS fiel der Verlust der Subtelomerregion jeweils eines der beiden kurzen Arme von Chromosom 1 auf (grünes Signal fehlt). Damit lag eine partielle Monosomie für den kurzen Arm des Chromosoms 1 vor. Des Weiteren ergab die Auswertung ein zusätzliches Signal für die Subtelomerregion des langen Arms von Chromosom 22 (drei rote Signale). Somit war eine partielle Trisomie des langen Armes eines Chromosoms 22 detektiert. Es handelte sich damit um eine unbalancierte Translokation 1;22.

Es ergab sich folgender **Karyotyp**: 46,XX, der(1),t(1;22)(p36;q13)

Das klinische Bild der kleinen Patientin ist mit dem erhobenen Befund zu vereinbaren. Patienten mit einer partiellen Trisomie 22q leiden u.a. gehäuft unter fazialen Dysmorphiezeichen, Herzfehlern und Hydrozephalus. Patienten mit einer terminalen Deletion 1p zeigen oft Gesichtsdysmorphien im Sinne dysplastischer Ohren, Vorhofseptumdefekte, Nierenfehlbildungen oder auch postnatale Wachstumsretardierung. Bei beiden Chromosomenanomalien findet sich gehäuft eine geistige Behinderung.

Es folgte daraufhin die molekularzytogenetische Untersuchung der Eltern, um eine eventuelle Familiarität von einer de-novo Entstehung zu unterscheiden.

Eltern-Befunde:

*Vater:* Numerisch und strukturell unauffälliger männlicher Chromosomensatz mit dem Karyotyp 46, XY. Die Chromosomenuntersuchung des Vaters mittels der 1p-Sonde CEB108/T7 und der 22q-Sonde 22QTEL31 (D22S1726) der Firma Vysis ergab regelrechte Signale an den jeweiligen Armen 1p und 22q. Damit war der Vater als Grund für die unbalancierte Translokation seiner Tochter ausgeschlossen.

*Mutter:* Numerisch und strukturell unauffälliger weiblicher Chromosomensatz mit dem Karyotyp 46, XX. Die Chromosomenuntersuchung der Mutter mittels der 1p-Sonde CEB108/T7 und der 22q-Sonde 22QTEL31 (D22S1726) der Firma Vysis ergab ebenfalls regelrechte Signale an den jeweiligen Armen 1p und 22q. Damit war auch die Mutter als Grund für die unbalancierte Translokation ihrer Tochter ausgeschlossen.

Zusammenfassung:

Bei der kleinen Patientin fanden wir in der erweiterten zytogenetischen Untersuchung eine unbalancierte Translokation zwischen dem Chromosom 1 und dem Chromosom 22 mit partieller Trisomie für den distalen Teil des langen Armes von Chromosom 22

**(Karyotyp:** : 46, XX, der(1),t(1;22)(p36;q13)).

Mit unauffälligen Untersuchungsbefunden beider Elternteile konnte eine Familiarität der Translokation ausgeschlossen werden. Das Wiederholungsrisiko eines weiteren von der Translokation betroffenen Kinder ist als gering einzustufen.

### **4.3 Chromosomale Polymorphismen**

Chromosomale Polymorphismen sind lichtmikroskopisch erkennbare erbliche Strukturvarianten, die in der Regel keinen Krankheitswert besitzen, da sie meistens heterochromatisches Material, d.h. genetisch inaktive DNA-Abschnitte betreffen oder aber repetitive Sequenzen (z.B. Nukleolus-Organisator-Regionen der akrozentrischen Chromosomen) bei denen Variationen der Kopienzahl toleriert werden. 5-7 % der Bevölkerung tragen zumindest für ein Autosom heterozygot einen Polymorphismus. Homozygotie für einen Polymorphismus wird seltener (bei ca. 1% der Bevölkerung) beobachtet (HIRSCH-KAUFFMANN M, SCHWEIGER M, 2000).

Ein Polymorphismus, der den langen Arm des Chromosoms 2 betrifft, ist 1994 von der Arbeitsgruppe MACINA et al erstmals beschrieben worden. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine kleine Deletion im Bereich des q-Armes (FAN et al, 2001). Mittlerweile liegen unterschiedliche Daten bezüglich der Prävalenz dieses 2q-Polymorphismus bei verschiedenen Arbeitsgruppen (ANDERLID et al, 1999; VIOT et al, 1998; JALAL et al, 2000; BALLIF et al, 2000) vor. Die Prävalenzen variieren zwischen 1,5 und 8,2%. Im Durchschnitt ergibt dies eine Häufigkeit von ca 5%, welche in einer Studie der Arbeitsgruppe FAN et al aus dem Jahr 2001 ebenfalls bestätigt wurde (dort 6%). Ein weiterer bekannter und gut beschriebener Polymorphismen ist der XpYp-Polymorphismus (KNIGHT et al 2000; FAN et al, 2001; BALLIF et al, 2000). In unserer Arbeit fand sich ein Xp-Polymorphismus bei einem jungen Mädchen. Dies entspricht einer Prävalenz von 1,4%.

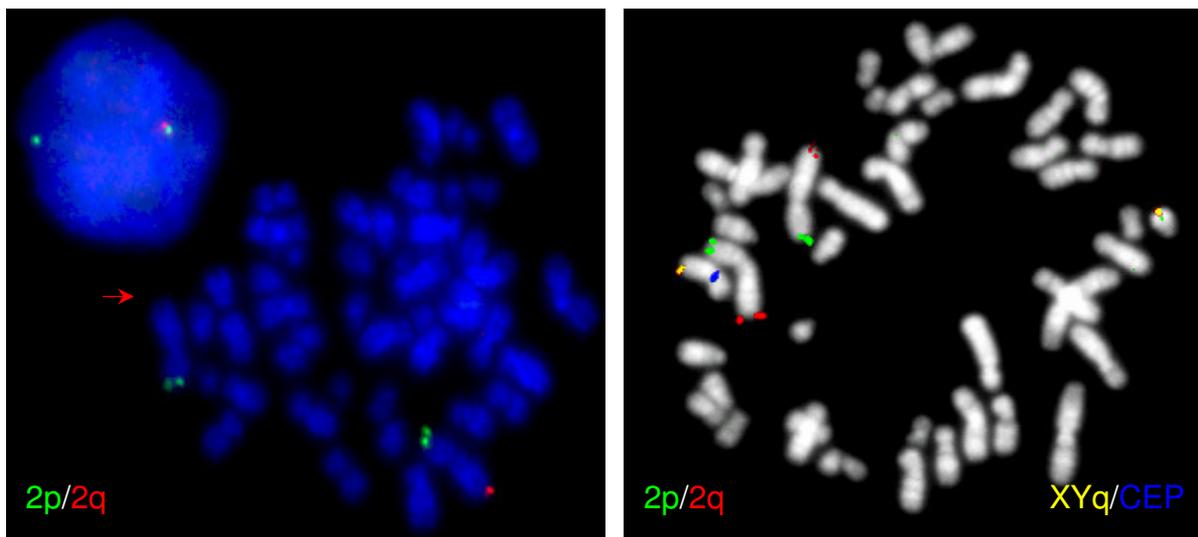
Einig ist man sich über die Tatsache, dass dieser Polymorphismus weder eine Korrelation mit geistigen Behinderung, noch mit anderen phänotypischen Anomalien aufweist (FAN et al, 2001; BALLIF et al, 2000). Damit geht man davon aus, dass es sich bei der Deletion im Locus D2S2986 um eine häufige Variante ohne Krankheitswert handelt (FAN et al, 2001).

Von der 2q-Cytocell-Sonde (der ersten und zweiten Generation) entdeckt wird dieser Polymorphismus, weil die angesteuerte Zielsequenz durch die kleine erbliche Strukturvariante (Deletion) verändert ist und somit die Sonde nicht korrekt binden kann (KNIGHT et al, 2000). Jeder Detektion einer 2q-Deletion müssen sich zwei Schritte zur Diagnosesicherung anschließen. Zum einen ist die Kontrolle des Ergebnisses mit subtelomeren 2q-Sonden eines idealerweise proximaler gelegenen Locus erforderlich (KNIGHT et al, 2000; FAN et al, 2001). Die 2q-Sonden ( TelVysion2q (D2S447, 2QTEL47)) des Herstellers Vysis erfüllen dieses Kriterium. Zum anderen sollten die Eltern untersucht werden, um bei ihnen die erbliche Strukturvariante ebenfalls darzustellen. Ohne diesen Zusatzuntersuchungen könnte ansonsten

eine klinisch signifikante 2q-Deletion als Polymorphismus missinterpretiert werden (KNIGHT et al, 2000; FAN et al, 2001).

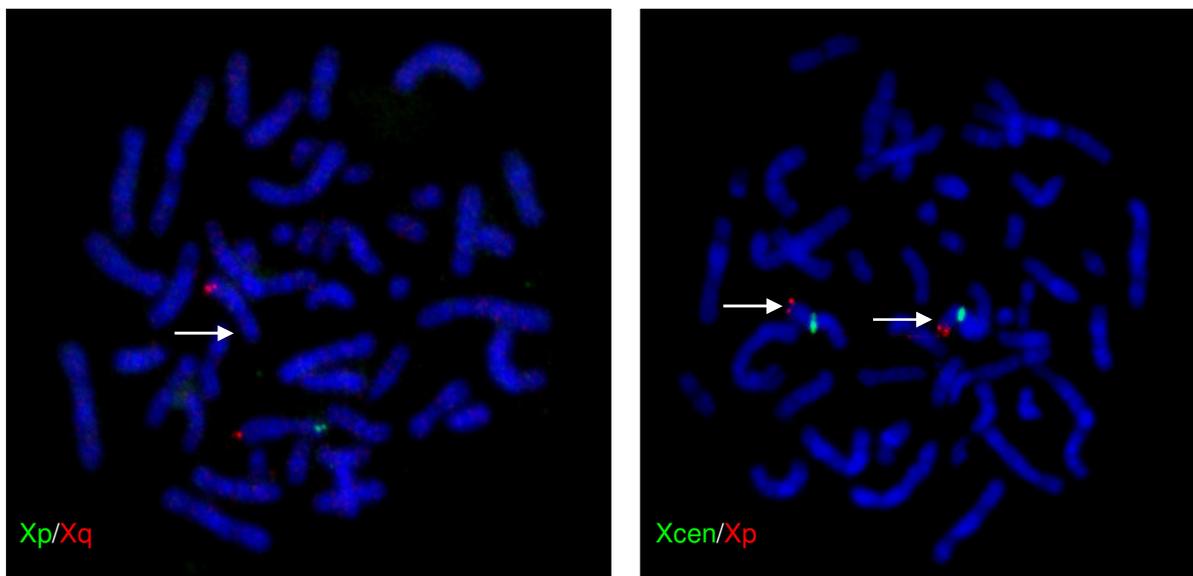
Innerhalb unseres Subtelomerscreenings mittels Sonden des Chromoprobe Multiprobe T-Systems der Firma CytoCELL fehlten in vier Fällen an jeweils einem Chromosom 2 ein Signal für die Subtelomerregion 2q. In allen vier Fällen hybridisierten die Kontrollsonden (D2S447, 2QTEL47) der Firma Vysis einwandfrei. In drei der vier Fälle konnten wir mit ergänzenden Elternuntersuchungen beweisen, dass es sich bei diesen Signalverlusten um den oben erwähnten 2q- Polymorphismus handelt. In zwei Fällen trug jeweils ein Elternteil (im einen Fall die Mutter, im anderen Fall der Vater) den Polymorphismus. Im dritten Fall war bei beiden Elternteilen der Polymorphismus nachweisbar, wobei die Eltern bekanntermaßen blutsverwandt waren. Die gemeinsame Tochter trug den Polymorphismus in heterozygoter Form. Im vierten Fall waren die Eltern nicht zu einer ergänzenden Untersuchung bereit. Man kann allerdings aufgrund der positiven Kontrollhybridisierung mit Vysis-Sonden davon ausgehen, dass es sich auch in diesem Fall um den vermuteten 2q-Polymorphismus handelt. Alle Elternteile waren phänotypisch unauffällig.

Abb. 4.20: Beispiel für einen (links) mit CytoCELL-Sonden detektierten 2q-Verlust und (rechts) physiologischen Kontrollbefund (VYSIS)



Innerhalb unseres Subtelomerscreenings mittels Sonden des Chromoprobe Multiprobe T-Systems der Firma CytoCELL fehlte in einem Fall (bei einem jungen Mädchen) an jeweils einem Chromosom X ein Signal für die Subtelomerregion Xp. Die Kontrollsonden (Xcen/Xp) hingegen hybridisiert (analog zu den 2q-Kontrollsonden) ebenfalls einwandfrei. Auch in diesem Fall konnten wir mit einer ergänzenden Elternuntersuchung nachweisen, dass es sich bei diesem Xp-Signalverlusten um den oben erwähnten Xp-Polymorphismus handelt. In diesem Fall trug die Mutter ebenfalls den Polymorphismus.

Abb. 4.21 Beispiel für einen (links) mit CytoCELL-Sonden detektierten Xp-Verlust und (rechts) physiologischen Kontrollbefund (Xcen/Xp)



## **5. Diskussion**

### **5.1 Methodische Aspekte**

#### **5.1.1 Chromoprobe Multiprobe T-System (Cytocell)**

##### 5.1.1.1 Praktische Durchführung und Zeitintensität:

Man benötigt zur Darstellung aller Subtelomerregionen der Chromosomen eines Patienten am ersten Versuchstag circa zweieinhalb Stunden Zeit. Im Anschluß an eine über Nacht Hybridisierung folgt am nächsten Tag der zweite Versuchsteil, dessen Dauer nochmals circa 45 Minuten beträgt. Die Arbeitsschritte sind streckenweise sehr schwierig und beeinflussen in hohem Maße die Auswertungsqualität im Anschluss an den Versuch. Der erste kritische Schritt ist das Auftropfen der Suspension in 2µl-Volumina auf die 24 Quadrate. Im ersten Schritt darf nur jedes zweite Quadrat getroffen werden, weil sich ansonsten die Suspensionen vermischen und Artefakte auftreten. Erst in der zweiten Runde des Auftropfens werden die freigelassenen Quadrate gefüllt. Es ist von größter Wichtigkeit, dass beim Auftropfen jedes Quadrat berücksichtigt wird und dass in jedem der 24 Quadrate eine annähernd gleiche Qualität beim Auftropfen gelingt. Denn nur so ist eine sichere Auswertung aller Chromosomenenden möglich. Der zweite kritische Schritt und insgesamt mit Sicherheit der folgenreichste, ist das Plazieren des Objektträgers auf den Sondenträger. Dabei sind zwei Dinge genau zu beachten. Zum einen muß das gelbe Feld des Sondenträgers exakt auf dem Quadrat mit der Nummer 1 des Objektträgers von der Position her übereinstimmen. Anderenfalls ist zwar die Detektionsqualität unbeeinflusst, aber die Nummerierung der Quadrate stimmt nicht mehr mit den tatsächlich markierten Chromosomen überein, was bei der Auswertung zu Fehlinterpretationen führen muss. Zum anderen ergibt sich aus der unglücklichen Vorgabe des Herstellers in Form von unterschiedlichen Größen des Sondenträgers und Objektträgers ein Problem beim Anfassen. Der Sondenträger ist ca. eineinhalb Zentimeter kürzer als der Objektträger. In der Breite dagegen unterscheiden sich beide nicht. Dies bedeutet automatisch, dass lediglich an dieser Stelle ein halbwegs sicheres Berühren des „Sandwichs“ erfolgen kann, ohne dass man Gefahr läuft, dass sich die beiden Träger gegeneinander verschieben. Ist dies einmal passiert, sollte man nicht den zusätzlichen Fehler begehen, die Position des Sandwichs durch ein korrigierendes Verschieben erneut zu verändern. Die Folgen der ein oder mehrfachen unbeabsichtigten Manipulationen des „Sandwichs“ werden bei der mikroskopischen Auswertung deutlich sichtbar. Zusätzlich zu den

bekannten und interpretationsbedürftigen Kreuzhybridisierungen und Polymorphismen, welche im nächsten Schritt ausführlich diskutiert werden, treten in diesen Fällen in Folge des Verrutschens zusätzliche Signale aus den Nachbararealen auf. Dies erschwert die Auswertung häufig so sehr, dass die Arbeitszeit am Mikroskop fünf bis sechs Stunden betragen kann. Für die Auswertung benötigt der Ungeübte normalerweise (je nach Mitose- und / oder Signalqualitäten) ca. drei Stunden. Der Geübte wertet bei durchschnittlich guter Qualität einen Objektträger innerhalb von 90 Minuten aus. Pro Subtelomerregion werden dabei fünf aussagekräftige (d.h. numerisch vollständige) Mitosen aufgenommen und beurteilt.

#### 5.1.1.2 Störfaktoren und Qualitätseinschränkungen:

Die Balance zwischen der Sensitivität und der Spezifität der Sonden ist das erklärte Ziel bei jedem Subtelomerscreening. Die Chromosomenenden bestehen aus einem zwei bis fünfzehn Kilobasen langem Abschnitt aus TG-reicher repetetiver DNA, an den sich zunächst relativ unspezifische, kurze distale (ebenfalls repetitive) DNA Sequenzen und dann eine sehr spezifische, längere proximale DNA Sequenz anschließen (Schaubild siehe S.6). Daraus folgt, dass je spezifischer eine Sonde sein soll, desto proximaler (zentromernäher) bindet sie am Chromosomenende. Damit ergibt sich die Konsequenz, dass weiter telomerwärts gelegene chromosomale Veränderungen übersehen werden können. Wenn die Sonde andererseits telomernäher bereits auf der Grenze zu der distalen, repetitiven DNA Sequenzen bindet, wird die exakte chromosomale Zuordnung der detektierten DNA unsicher. Eine pragmatische Lösung sollte daher lauten, dass möglichst spezifische Sonden ausgewählt werden und ein Übersehen einiger weniger chromosomalen Veränderungen im distalen genarmen Bereich akzeptiert werden muß (KNIGHT et al, 1999, 2000).

Bei vielen Chromosomen finden sich multiple Kreuzhybridisierungen, welche zwar von der Firma Cytocell im Versuchsprotokoll beschrieben werden, aber trotzdem die Auswertung erschweren. (Siehe dazu auch Tabelle 5.1, S.69) Der Grund für diese Kreuzhybridisierungen liegt in der besonderen Größe und Komplexität der Subtelomerregionen (WILKIE et al, 1991). Die Basensequenzen der Subtelomerregion einiger Chromosomen, stimmen bis zu 95% mit den Basensequenzen anderer Chromosomen überein. Die Homologie der Sequenzen erstreckt sich zum Teil über mehrere Kilobasen (WILKIE et al, 1991; FLINT et al, 1997 ). Zum Beispiel beträgt die Homologie der terminalen 30 kb der p- und q-Arme des Chromosoms 4 ca. 98% (FLINT et al, 1997). Besonders ausgeprägte und bei der Auswertung störende Kreuzhybridisierungen sind in unserer Studie zum einen die zwischen 9q-10p und/oder 16p und/oder 18p und/oder Xq/Yq und zum anderen die zwischen 17q-1p und/oder

6q, sowie zwischen 17p und 17q und zwischen 22q und 2q. Sämtliche andere im Versuchsprotokoll erwähnten Kreuzhybridisierungen sind in unserem Fall häufig durch ihre geringere Signalintensität von „echten“ Signalen zu unterscheiden. Die Arbeitsgruppe von ANDERLID et al. (2002) macht ähnliche Erfahrungen und gibt folgende Kreuzhybridisierungen als häufig an: 8p-1p, 9q-18p, 11p-17p, 15q-interstitiell 1q und/oder interstitiell 15q, 17p-interstitiell 17q, 17q-1p und/oder 6q und 22q-interstitiell 2p.

Tabelle 5.1 Vergleich der Kreuzhybridisierungen

Chromosomen	Herstellerangaben	eigene Befunde	ANDERLID et al.(2002)
1p			
1q			
2p			
2q			
3p			
3q			
4p			
4q			
5p			
5q			
6p			
6q			
7p			
7q			
8p	8p mit 1p und 3q		8p mit 1p
8q			
9p			
9q	9q mit 10p, 16p, 18p und XqYq	9q mit 10p, 16p, 18p und XqYq	9q mit 18p
10p			
10q			
11p	11p mit 17p		11p mit 17p
11q	11q mit 12q (interstitiell)		
12p	12p mit 6p und 20q		
12q			
13q			
14q			
15q	15q mit 1q und 15q (interstitiell)		15q mit 1q und 15q(interstitiell)
16q			
17p	17p mit 17q (interstitiell)	17p mit 17q (interstitiell)	17p mit 17q (interstitiell)
17q	17q mit 1p und 6q	17q mit 1p,5q, 6q, und 11p	17q mit 1p und 6q
18p			
18q			
19p			
19q			
20p			
20q	20q mit 6p		
21p			
21q			
22p			
22q	22q mit 2q	22q mit 2q	22q mit 2p (interstitiell)
XpYp			
XqYq			

Auch chromosomale Polymorphismen können zu Artefakten führen. Es sind in der Regel kleine chromosomale Strukturvarianten ohne Auswirkung auf den Phänotyp. Wenn sie im Bereich der Zielsequenz der Sonde liegen, kann dies dazu führen, dass diese Sonde nur noch unzureichend oder auch gar nicht mehr bindet (KNIGHT et al 2000; FAN et al, 2001; BALLIF et al, 2000). Folglich fehlt bei der mikroskopischen Auswertung ein Signal; die Subtelomerregion scheint zu fehlen. Ergänzende Untersuchungen werden erforderlich, da es sich differentialdiagnostisch in der Tat um eine klinisch bedeutsame Deletion handeln könnte. Bekannte und gut beschriebene Polymorphismen sind der 2q- und der XpYp-Polymorphismus (KNIGHT et al 2000; FAN et al, 2001; BALLIF et al, 2000). Zusätzlich beschrieb die Arbeitsgruppe BALLIF et al erstmals einen 9pter-Polymorphismus. Durch die ständige Weiterentwicklung und Verbesserung der Sondenqualität ist in der Zukunft mit der Identifizierung weiterer Polymorphismen zu rechnen (BALLIF et al, 2000). In unserer Studie beträgt die Detektionsrate des 2q-Polymorphismus 4 von 70. Damit beträgt die Prävalenz für den 2q-Polymorphismus (4/70) 5,7 %. Zusätzlich hatten wir den Befund eines Xp-Polymorphismus bei einem Mädchen (Patientin 14). Die Prävalenz für die XpYp-Polymorphismen in unserer Arbeit beträgt damit 1,43 %.

Die Firma Cytocell reduzierte im Verlauf der vergangenen Jahre sowohl die Anzahl der Kreuzhybridisierungen, als auch die der Polymorphismen-entdeckenden-Sonden. Die erste Generation des Kits beinhaltete überwiegend Cosmide, wohingegen die zweite Generation des Kits fast nur aus PAC-Sonden besteht (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1996; KNIGHT et al, 2000). In unserer Studie sind ausschließlich Kits der zweiten Generation verwendet worden. Der Kit der zweiten Generation entdeckte den oben erwähnten XpYp-Polymorphismus weitgehend nicht mehr. Beide Generationen des Kits entdecken allerdings den bekannten 2q-Polymorphismus. Die Anzahl der Kreuzhybridisierungen ist dagegen nicht nennenswert reduziert worden. Die nahezu gleich bleibende Anzahl an Kreuzhybridisierungen lässt sich insofern erklären, dass es sich dabei um Folgen nicht zu ändernder Sequenzhomologien handelt. Im Gegensatz dazu stehen die strukturellen Polymorphismen, die theoretisch dadurch vermieden werden können, dass man die Signalsequenzen der Sonden um einige hundert Basenpaare nach proximal oder distal verschiebt und damit einer „Fehlbindung“ aus dem Weg geht. Nach Beendigung der experimentellen Phase unseres Subtelomerscreenings war die dritte Generation des Kits im Handel erhältlich. Der Kit des Chromoprobe Multiprobe- T Systems enthält eine 2q-Sonde (BAC. 172I13, D2S447), die den bekannten Polymorphismus nicht entdeckt.

### 5.1.1.3 Kosten / Nutzen – Relation:

Die Gesamtkosten, d.h. die Material- und Personalkosten, der Untersuchung eines Patienten mit dem Kit des Chromoprobe Multiprobe-T Systems beträgt in unserem Institut ca. 300 Euro. Ebenso wichtig wie der Preis der einzelnen Untersuchung ist natürlich die Anzahl der Patienten, die untersucht werden müssen, um ein informatives Testergebnis zu erhalten. Bei uns kam auf 18 durchgeführte Untersuchungen ein eindeutig pathologischer Befund. Das heißt wiederum, dass 5400 Euro pro informativen Test aufgebracht werden müssen. Dazu kommen bei Überprüfung von Befunden die zusätzlichen Kosten zur Bestätigung bzw. dem Ausschluss von familiären Polymorphismen. Dies sind nochmals ca. 2x 300 Euro für eine FISH-Untersuchung beider Elternteile und ca. 100 Euro zur Kontrolluntersuchung der betroffenen Chromosomen des Kindes mit einer zweiten Subtelomersonde (z.B. von Vysis). Damit kostet das informative Testergebnis für einen Patienten rund 6000 Euro. Zumindestens die durch Polymorphismen verursachten Zusatzkosten sollten mit der dritten Generation des Kits mit nicht-Polymorphismen-detektierenden Sonden eingespart werden. Die Arbeitsgruppe KNIGHT et al (1999) wertet die Elternuntersuchungen der betroffenen Kinder ebenfalls als informative Tests, so dass damit die Rate an informativen Tests bezogen auf alle durchgeführten Tests in unserem Fall 12 von 78 betragen würde. Damit reduziere sich der Preis eines informativen Testes von ca. 6000 Euro auf rund 2000 Euro und wäre damit gedrittelt.

Abgesehen von den Kosten für das Gesundheitssystem ist das Subtelomerscreening eine gute und effiziente Methode, um die Ursache von vielen ungeklärten geistigen Behinderungen herauszufinden.

### 5.1.2 ToTelVysionMulti-color Dann Probe Panel

#### 5.1.2.1 Praktische Durchführung und Zeitintensität:

Das ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panel wird in unserem Labor verwendet, um die auffälligen Befunde, die beim Subtelomerscreening mit den Cytocell-Sonden entdeckt werden zu kontrollieren. Daher ist es nicht notwendig, den gesamten Chromosomensatz erneut zu untersuchen, sondern es folgt eine Beschränkung auf die auffälligen Subtelomerregionen. Die 15 Mischungen mit insgesamt 62 direkt markierten DNA-Sonden (41 subtelomerspezifische und 21 zentromerspezifische Sonden) sind einzeln verpackt und getrennt anwendbar, so dass beispielsweise die gleichzeitige Hybridisierung zweier Sondenmischungen auf einem Objektträger problemlos durchgeführt werden kann. Viele Arbeitsgruppen arbeiten wie wir mit Vysis-Sonden als Kontrollsonde und mit Cytocell-Sonden im Subtelomerscreening

(KNIGHT et al, 1999, 2000; CLARKSON et al, 2002, ANDERLID et al, 2002; Fan et al, 2001). Ein komplettes Subtelomerscreening mit Vysis-Sonden berichtet nur eine Arbeitsgruppe (BAKER et al, 2002). Ein Grund dafür ist sicherlich die Tatsache, dass bei den Vysis-Sonden zum kompletten Screening drei Objektträger mit je 5 Hybridisierungsarealen benötigt werden, wohingegen die Cytocell-Sonden für alle Chromosomen auf einem Objektträger hybridisiert werden. Das ist sowohl während der Versuchsdurchführung, als auch bei der mikroskopischen Auswertung von Vorteil. Ein weiterer Grund ist wahrscheinlich, dass die Cytocell-Sonden die ersten kommerziell zu erwerbenden Sonden überhaupt für ein komplettes Subtelomerscreening waren (KNIGHT et al, 1999) und die meisten Arbeitsgruppen versuchen über Jahre hinweg mit den gleichen Sonden zu arbeiten, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Der zeitliche Arbeitsaufwand beträgt im Vysis-Protokoll am ersten Versuchstag ca. 90 bis 120 Minuten. Dann schließt sich eine 12 bis 16stündige Hybridisierung an und am zweiten Versuchstag benötigt man ca. 30 bis 60 Minuten. Der zeitliche Aufwand der Versuchsdurchführung ist damit relativ günstig. Es werden drei Objektträger mit jeweils 5 Tropfen Suspension mit je 5µl präpariert. Dabei ist die Gefahr, dass die Metaphasenqualität durch Vermischen der Tropfen, also unter fehlendem Abstand der Tropfen leidet, sehr gering. Man kann außerdem bei insuffizientem Auftropferfolg neue Objektträger herstellen. Dies ist bei Cytocell durch die Quadratvorgabe nicht möglich und es ist schwieriger eine einheitliche Metaphasenqualität in allen 24 Arealen zu erreichen. Die mikroskopische Auswertung dauert je nach Hybridisierungsqualität pro Subtelomerregion etwa zwischen zehn und zwanzig Minuten. Pro Subtelomerregion werden fünf aussagekräftige (d.h. vollständige) Mitosen aufgenommen und beurteilt.

#### 5.1.2.2 Störfaktoren und Qualitätseinschränkungen:

Die Auswertung der Objektträger gelingt aufgrund der deutlich geringeren Anzahl von störenden Polymorphismen und Kreuzhybridisierungen im Vergleich zu den CYTOCELL-Sonden der ersten und zweiten Generation in unserem Labor gut. Die Arbeitsgruppe BAKER et al (2002) hat über 250 mit Subtelomersonden der Firma Vysis untersuchte Fälle berichtet. Sie berichtet auch darüber, dass lediglich in vier der 250 Fällen ein Signal an einem langen Arm von Chromosom 2 (2q) etwas schwächer zu detektieren war, aber in keinem einzigen Fall komplett fehlte. Damit wird der bekannte 2q-Polymorphismus mit Vysis-Sonden nicht detektiert. Ebenfalls wenig störend wirken sich die beiden beschriebenen Kreuzhybridisierungen 8p-1p und 9q-18p aus (BAKER et al, 2002). Eine weitere Erleichterung stellt die zusätzliche Verwendung zentromerspezifischer Sonden dar. In jeder

Mischung, in der Subtelomersonden von zwei verschiedenen Chromosomen vorhanden sind, ist eines der beiden Chromosomen zusätzlich mit einer zentromerspezifischen Sonde gekennzeichnet (direktmarkierte Sonde mit Spektrum Aqua). Dies vereinfacht die Identifikation der Chromosomen. Die ToTelVysion probes befinden sich in einer maximalen physikalischen Distanz von 300kb von der Telomerregion entfernt und scheinen damit die Balance zwischen Spezifität und Sensitivität relativ gut zu halten.

#### 5.1.2.3 Kosten / Nutzen – Relation:

Führt man ein Subtelomerscreening wie die Arbeitsgruppe BAKER et al (2002) komplett mit den ToTelVysionMulti-color DNA Probe Panels durch, würde dies pro Patienten in unserem Labor ca. 300 Euro Gesamtkosten verursachen. Im Rahmen dieses speziellen Subtelomerscreenings kostet die Kontrolle eines verdächtigen Befundes zwischen 75 und 125 Euro, je nachdem, wieviele Subtelomerregionen kontrolliert werden müssen. Aufgrund der hohen Zuverlässigkeit der Hybridisierungsergebnisse ist die Kosten/Nutzen-Relation zufrieden stellend.

#### 5.1.3 Subtelomerische Sonden versus konventionelle Zytogenetik

Die konventionelle zytogenetische Analyse mit einer Auflösung von 400 bis 550 Banden ist die Standarduntersuchung bei klinisch vermuteten chromosomalen Veränderungen (KNIGHT et al, 2000). Verschiedene Autoren geben die untere Auflösungsgrenze mit ca. 5Mb an (KNIGHT et al, 2000; DE VRIES et al, 2001; CLARKSON et al, 2002; LEDBETTER et al, 1995). Doch nicht nur die absolute Größe der chromosomalen Veränderung, z.B. einer Deletion, spielt eine Rolle, sondern auch die Tatsache wo sie liegt. Selbst bei einer hochauflösenden Analyse mit 850 bis 1000 Banden kann eine Veränderung, die größer als 5Mb ist, übersehen werden, wenn sie sich in einer hellen Bande befindet. Die Arbeitsgruppe KNIGHT et al (2000) betont, dass es im Bereich der Subtelomerregion nur wenige chromosomenspezifische und enge Bandenmuster gibt, so dass auch größere chromosomale Veränderungen übersehen werden können. CLARKSON et al (2002) stellen zusätzlich fest, dass deshalb auch die Detektion eines interchromosomalen Austausches von Material (z.B. bei balancierten Translokationen) erschwert ist, weil die ausgetauschten Stücke eine ähnliche G-Bänderung aufweisen.

Die untere Auflösungsgrenze bei den Subtelomersonden beträgt ca. 60 kb (Kilobasen) und ist damit etwa 100x höher. Dadurch ist es möglich, wesentlich kleinere chromosomale Veränderungen zu finden, als mit der konventionellen Zytogenetik. Limitiert ist das

Subtelomerscreening bisher vor allem in drei Bereichen (KNIGHT et al, 2000). Zum Ersten beinhalten beide zur Subtelomeruntersuchung verwendeten Kits keine Sonden für die kurzen Arme (p-Arm) der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22). Wegen der außerordentlich hohen Sequenzhomologie wird dies wohl auch kaum möglich sein. Hilfreich wäre jedoch bereits die Herstellung einer „Mischsonde“, die die kurzen Arme aller fünf akrozentrischen Chromosomen detektiert. In der Literatur sind nämlich nicht selten Fälle beschrieben, in denen die p-Arme akrozentrischer Chromosomen an chromosomalen Veränderungen beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist die balancierte, reziproke Translokation einer Mutter und die unbalancierte Translokation der Tochter zwischen 9q und 13p, welche die Arbeitsgruppe YOUNGMAN et al (1992) beschreibt. Somit ist davon auszugehen, dass durch das Fehlen der Sonden für den kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen einige chromosomale Veränderungen unentdeckt bleiben könnten, sofern keine zusätzliche konventionelle Chromosomenanalyse erfolgt. Die beiden anderen Limitierungen der Methode bestehen darin, dass uniparenterale (Iso)disomien und kleine subtelomer gelegene Tandemduplikationen ebenfalls unentdeckt bleiben können (KNIGHT et al, 2000).

Generell scheinen die Subtelomersonden der konventionellen Zytogenetik bei der Suche nach strukturellen Veränderungen im Bereich der mit Genen dicht verpackten Chromosomenenden weit überlegen (KNIGHT et al, 2000; DE VRIES et al, 2001; CLARKSON et al, 2002; FAN et al, 2001; ANDERLID et al, 2002). Es gibt aber auch immer wieder Fälle, in denen beispielsweise eine die Subtelomerregion betreffende Duplikation nur durch hochauflösende G-Bänderungsanalyse sichtbar gemacht werden konnte, aber nicht durch Subtelomer-FISH detektiert wird (BROWNE et al, 1999). Die Arbeitsgruppe JOYCE et al (2001) geht sogar so weit zu behaupten, dass die hochauflösende G-Bänderungsanalyse die effektivere der beiden Methoden darstellt. Die umgekehrte Auffassung ist allerdings die Regel und selbst bei Betrachtung der G-Bänderungsmuster im Nachhinein mit dem Wissen um die vorliegende Veränderung, ist nur in wenigen Fällen deren Identifikation in der G-Bänderung möglich. KNIGHT et al (1999) war es möglich, vier von 22 Subtelomeränderungen nachträglich mit der hochauflösenden G-Bänderung (850 Banden-Level) zu identifizieren. ANDERLID et al (2002) konnte drei von zehn chromosomalen Veränderungen retrospektiv in der konventionellen G-Bänderungsanalyse nachvollziehen.

In keinem der vier Fälle in unserer Studie ist es möglich eindeutig die jeweilige chromosomale Veränderung in der G-Bänderungsanalyse (550 Banden-Level) zu verifizieren. Allenfalls in vereinzelt Mitosen des Patienten 49 (Fall 2) ist eine 8p- Deletion zu erahnen.

Die väterliche perizentrische Inversion des Chromosoms 7 von Patient 62 (Fall 3) ist lichtmikroskopisch nicht zu erkennen, da die Inversion nahezu das gesamte Chromosom 7 betrifft und die distalen Fragmente kaum mehr als die Subtelomerregionen ausmachen. Genauso ergibt sich kein eindeutiger Anhaltspunkt für die partielle Monosomie für den kurzen Arm des Chromosoms 4 bei Patientin 16 (Fall 1).

Aufgrund der hohen Kosten für die Untersuchung eines Patienten mit den Subtelomersonden und der Möglichkeit der lichtmikroskopischen Detektion auch kleinerer subtelomerischer Veränderungen (wie z.B. die des Wolf-Hirschhorn-Syndroms/  $4p^-$  und dem cri du chat-Syndroms/  $5p^-$  (DE VRIES et al, 2001)), sollte nach unserer Auffassung weiterhin jedem Subtelomerscreening eine sorgfältige, hochauflösende zytogenetische (auf 850 Banden-Niveau) Untersuchung vorausgehen.

#### 5.1.4 Spectral Karyotyping „SKY“

##### 5.1.4.1 Praktische Durchführung und Zeitintensität:

Der zeitliche Aufwand für eine SKY-Untersuchung ist im Vergleich zur Subtelomeruntersuchung weitaus höher. Am ersten Versuchstag benötigt man zwischen zwei und drei Stunden für die Vorbehandlung der Objektträger und der Sonden. Daran schließt sich eine 48stündige Hybridisierung an, so dass zwischen dem ersten und zweiten Versuchstag eine 24stündige Pause entsteht. Am zweiten Versuchstag benötigt man für die Stringenzwaschung und die Detektion noch einmal drei bis vier Stunden. Die anschließende mikroskopische Auswertung der angefertigten Präparate bei durchschnittlicher Qualität dauert in etwa drei bis vier Stunden. Es wird empfohlen, mindestens fünf geeignete Metaphasen aufzunehmen und zu klassifizieren (HADDAD et al, 1998). Häufiger als bei den Subtelomersonden kommt es bei SKY zu insuffizienter Hybridisierungsqualität und damit zu einer deutlich erschwerten Auswertung bzw. im Extremfall zu keinem Ergebnis, so dass das Experiment wiederholt werden muss.

Die Arbeitsschritte an sich sind bei SKY allerdings weniger diffizil als bei den Subtelomersonden. Die Zellsuspensionen für die Verwendung für SKY werden mit Hilfe einer Kolbenpipette in ca. 15µl-Volumina aus einer Höhe von wenigen Zentimetern auf fettfreie Objektträger aufgetropft. Man benötigt letztendlich nur einen Tropfen (ein ca. 12mm großes Areal) mit mehreren Metaphasen guter Qualität. Zur Zeitersparnis bietet es sich an, mehrere Objektträger gleichzeitig zu behandeln. In diesem Punkt ist SKY dem Subtelomerscreening überlegen, da dort das gleichzeitige Bearbeiten mehrerer Fälle eher eine

Fehlerquelle darstellt. Speziell beim Arbeiten mit dem Chromoprobe Multiprobe-T System hat es sich als besser und sicherer herausgestellt, sich auf jeweils nur einen Sonden- und Objektträger zu beschränken.

#### 5.1.4.2 Störfaktoren und Qualitätseinschränkungen:

Bei SKY liegt laut Literatur die Nachweisgrenze einer sichtbaren Veränderung durchschnittlich zwischen 1,5 und 2,6 Mb (Megabasen). Während die Arbeitsgruppen UHRIG et al (1997) und AZOFEIFA et al (2000) die Grenzen bei 2,6 Mb angeben, gehen SCHRÖCK et al (1996) und HADDAD et al (1998) sogar von einer Nachweisgrenze von 0,5 bis 1,5 Mb aus. Einig ist man sich darüber, dass systembedingte intrachromosomale Veränderungen (wie z.B. Deletionen, Inversionen und Duplikationen) mit SKY nicht detektiert werden können und dass das Auflösungsvermögen von verschiedenen Faktoren abhängt. Das Gesamtergebnis ist u.a. von der Sondenqualität, der Zusammensetzung der Fluorochrome und dem Kondensationsgrad des Chromatins abhängig (SPEICHER et al (1996); AZOFEIFA et al (2000)). Generell gilt wie bei der G-Bänderung, dass je geringer der Kondensationsgrad des Chromatins ist, desto kleinere chromosomale Veränderungen lassen sich nachweisen und umgekehrt. Für unsere Arbeit, die sich in erster Linie mit den Subtelomerregionen beschäftigt, bedeutet die Tatsache, dass das Auflösungsvermögen von SKY im Bereich der Subtelomere aufgrund schlechterer Hybridisierungseigenschaften geringer ist, einen Nachteil. Hinzu kommt, dass einige Regionen, die viele repetitive Sequenzen enthalten, nicht detektierbar sind. Dies betrifft unter anderem die kurzen p-Arme der akrozentischen Chromosomen (SCHRÖCK et al, 1996). Eine weitere Qualitätseinschränkung können die nicht selten auftretenden sehr starken und ungleichmäßigen Hintergrundsignale bedeuten. Sie können sich sogar so störend auswirken, dass eine aufgrund der zusätzlichen DAPI-Färbung erfolgte Klassifikation der Chromosomen durch die zugehörige Software SpectralView unmöglich wird. Insgesamt besteht bei SKY eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Experiment wegen insuffizienter Qualität der Präparate wiederholt werden muss, als bei den Subtelomeruntersuchungen.

Auf der anderen Seite bietet SKY die zusätzliche Möglichkeit, interchromosomale Insertionen oder Translokationen zu detektieren, die ausserhalb der Reichweite der Subtelomersonden liegen (ANDERLID et al, 2002; CLARKSON et al, 2002).

#### 5.1.4.3 Kosten / Nutzen – Relation:

Es ist analog zu den Subtelomerprobenkits seit einigen Jahren möglich, Probenkits für SKY mit fertig markierten Sonden kommerziell zu erwerben. Ein Probenkit mit 100 µl Paint-Mix kostete ca. 2000 Euro. Man benötigt pro untersuchten Fall bei Lymphozytenpräparaten ca. 3 µl Paint-Mix. Somit sind gut 30 Untersuchungen mit einem Kit möglich. Wie unter Punkt 5.1.5 ausführlich diskutiert, liefern die SKY Untersuchungen bei uns und z.T. auch bei anderen Arbeitsgruppen keine zusätzlichen Informationen. Daher beendeten wir auch anderem aus Kostengründen nach der Untersuchung von 25 Patienten das parallele Bearbeiten jedes Falles mit SKY und Subtelomersonden.

#### 5.1.5 Subtelomerische Sonden versus SKY

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dem Vergleich der Vor- und Nachteile der subtelomerischen Sonden und SKY. Man ist sich weitgehend darüber einig, dass die Untersuchungen mit speziellen Subtelomersonden einen wichtigen Schritt bei der Identifikation bisher unbekannter bzw. im konkreten Fall ungeklärter Ursachen mentaler Retardierung darstellen. Die Meinungen bezüglich der Effizienz von SKY bei dieser Fragestellung variieren leicht.

Die Arbeitsgruppe von CLARKSON et al (2002) untersuchten 50 geistig behinderte Kinder sowohl mit SKY, als auch mit Subtelomer-FISH. Erwartungsgemäß konnte nur eine der drei kryptischen Veränderungen, die durch die Subtelomer-FISH detektiert wurden, auch mit SKY gefunden werden. Dabei handelt es sich um das derivative Chromosom 5 einer unbalancierte Translokation (5p;21q). Die anderen beiden Veränderungen konnten nicht detektiert werden. In einem Fall lag die Veränderung intrachromosomal (rekombinantes Chromosom 11 infolge einer väterlichen perizentrischen Inversion) und im anderen Fall war nur ein kurzes Stück des Chromosomenendes (2q-Deletion im Sinne des bekannten Polymorphismus) betroffen (CLARKSON et al, 2002). Die Prävalenz an aussagekräftigen subtelomerischen Veränderungen beträgt in dieser Studie 4% (2/50). Außerdem wurden keinerlei zusätzliche Befunde über interchromosomale Insertionen oder interstitielle Translokationen gewonnen. Unsere Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe. SKY detektiert bei unserer Patientin im Fall 1 zwar das derivative Chromosom 4 in der unbalancierten Translokation zwischen dem kurzen Arm eines Chromosoms 4 und dem langen Arm eines Chromosoms 20, jedoch nicht die entsprechende balancierte Translokation der Mutter (siehe Punkt 4.2). Es ist zwar analog zur Untersuchung der Tochter das

translozierte Material von Chromosom 20 auf dem Chromosom 4 detektierbar, nicht aber das translozierte Material von Chromosom 4 auf dem Chromosom 20. Hingegen detektieren die Subtelomersonden problemlos beide Translokationen. Parallelen zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe CLARKSON et al (2002) ergeben sich außerdem durch die Tatsache, dass bei uns ebenfalls keinerlei zusätzlichen Aussagen durch SKY gewonnen werden konnten.

Die Arbeitsgruppe ANDERLID et al (2002) untersuchte zunächst 111 mental retardierte Kinder mit Subtelomer-FISH. Die Prävalenz der eindeutige subtelomerischen Veränderungen in dieser Studie beträgt 9% (10/111). Es handelt sich um fünf de-novo Deletionen, eine unbalancierte de-novo Translokation, drei vererbte unbalancierte Translokationen und um ein rekombinantes Chromosom 6 infolge einer väterlichen perizentrischen Inversion. 50 der 111 Patienten, die subtelomerisch unauffällig waren, wurden zusätzlich mit SKY untersucht, um eventuelle interstitielle Translokationen zu detektieren. Auch dieser Arbeitsgruppe gelang es nicht zusätzliche Aussagen durch SKY zu gewinnen. Etwas anders sind die Erfahrungen von ANDERLID et al (2002) bezogen auf vier ihrer durch Subtelomersonden gefundener unbalancierter Translokationen, die mit SKY nachuntersucht wurden. Nur drei dieser vier unbalancierten Translokationen konnten mit SKY einwandfrei bestätigt werden. In einem Fall gelang dies nicht. Interessanterweise konnte SKY aber die entsprechenden balancierten Translokationen der betroffenen Elternteile problemlos detektieren.

Die Arbeitsgruppe FAN et al (2001) untersuchte 150 mental retardierte Kinder mit Subtelomer-FISH. Die Prävalenz der aussagekräftigen subtelomerischen Veränderungen in dieser Studie beträgt 4% (6/150). Es handelt sich um vier unbalancierte Translokationen und um zwei 1ptel Deletionen. Zur Prüfung der Sensitivität von SKY, wurden anschließend die vier unbalancierte Translokationen mit SKY nachuntersucht. Alle vier unbalancierte und zwei balancierte Translokationen der Eltern konnten einwandfrei von SKY bestätigt werden. Die SKY-Untersuchungen beschränken sich in dieser Studie ausschließlich auf die Patienten mit chromosomalen Veränderungen im Sinne von Translokationen. In der Arbeit von FAN et al (2001) werden im Gegensatz zu unseren Erfahrungen sämtliche balancierte Translokationen problemlos detektiert. Die Autoren gehen davon aus, dass das Auflösungsvermögen von SKY bei Translokationen, die die Subtelomerregion betreffen, zwischen 1 bis 3 Mb liegt.

CLARKSON et al (2002) halten Subtelomer-FISH für effektiver als SKY bei der Detektion von kryptischen Veränderungen. Zwar ist SKY technisch einfacher und weniger kosten- und arbeitsintensiv, aber SKY kann nur relativ große (>1Mb) interchromosomale, die Telomerregion betreffende, Translokationen detektieren. Subtelomer-FISH kann sowohl

---

kleine (ab 60 kb) als auch große, sowie sowohl inter- als auch intrachromosomale Veränderungen der Chromosomenenden detektieren.

ANDERLID et al (2002) raten von einem Screening nach subtelomerische Veränderungen mit SKY ebenfalls ab. Sie geben insgesamt drei Gründe dafür an. Zum Ersten kann SKY keine intrachromosomalen Veränderungen, wie kleine Deletionen und Duplikationen, detektieren. Zum Zweiten sind interstitielle Translokationen und Duplikationen selten, so dass es sich nicht rechnet, aus diesen Gründen (zusätzlich) SKY routinemäßig durchzuführen. Zum Dritten ist es für SKY schwierig selbst interchromosomale Veränderungen zu detektieren, wenn sich die Fluorochromzusammensetzungen und damit die Falschfarben der beteiligten Chromosomen ähneln.

FAN et al (2000; 2001) sind zwar von der hohen Sensitivität von SKY bei der Detektion von balancierten und unbalancierten Translokationen überzeugt, raten aber aus Kostengründen und der wegen im Vergleich doch besseren Effizienz der Subtelomer-FISH Ergebnisse von SKY ebenfalls ab. Unsere Erfahrungen entsprechen denjenigen der aufgeführten Arbeitsgruppen.

## **5.2 Bewertung der Ergebnisse**

### **5.2.1 Diskrepanz der Prävalenzen**

Die Prävalenzen subtelomerischer Veränderungen bezogen auf die Gesamtzahl an mentaler Retardierung erkrankter Kinder sind bei den verschiedenen Arbeitsgruppen sehr unterschiedlich. Sie variieren zwischen 0% und 23% (VORSANOVA et al, 1998; FAN et al, 2001; JOYCE et al, 2001; SLAVOTINEK et al, 1999; KNIGHT et al, 1999; CLARKSON et al, 2002; ANDERLID et al, 2002; BAKER et al, 2002 ; ROSSI et al, 2001; BALLIF et al, 2000; VAN KARNEBEEK et al, 2002).

Tabelle 5.2 Vergleich der Prävalenzen unterschiedlicher Arbeitsgruppen

Arbeitsgruppen	Fallzahlen	Prävalenzen
JOYCE et al, 2001	200	0%
VORSANOVA et al, 1998	407	3,4%
CLARKSON et al, 2002	50	4%
FAN et al, 2001	150	4%
BAKER et al, 2002	197	4,1%
Eigene Arbeitsgruppe	70	5,7%
ROSSI et al, 2001	200	6,5%
KNIGHT et al, 1999	284	7,4%
SLAVOTINEK et al, 1999	27	7,5%
ANDERLID et al, 2002	111	9%
BALLIF et al, 2000	154	9,7%
KARNEBEEK et al, 2002	39	23%

Manche Autoren berechnen die Prävalenzen jeweils getrennt für die Gruppen wenig betroffener und mittelgradig bis schwer betroffener Patienten. Die erste große Studie, die den Maßstab für viele nachfolgenden Arbeiten darstellen sollte, ist die der Arbeitsgruppe KNIGHT et al (1999). Sie geben in der Gruppe der wenig betroffenen Patienten eine Prävalenz von 0,5% und in der Gruppe der mittelmäßig bis schwer betroffenen Patienten eine Prävalenz von 7,4% an. Innerhalb der vergangenen Jahre sind die Ergebnisse von rund 20 großen Subtelomer-Studien veröffentlicht worden, wovon 14 Studien bezogen auf ihre Durchführung (Material und Methode) durchaus vergleichbar sind (WALTER et al, 2004). Von insgesamt 1718 untersuchten Patienten dieser 14 Studien waren 97 Patienten von einer subtelomerischen Veränderung betroffen. Daraus ergibt sich eine Meta-Prävalenz von 5,8% (BIESECKER et al, 2002; WALTER et al, 2004). In unserer Arbeit beträgt die Prävalenz 5,7% und liegt damit nah am Durchschnittswert der Prävalenzen.

Bei der großen Diskrepanz zwischen den gefundenen Prävalenzen der einzelnen Arbeitsgruppen (z.B. 0% bei JOYCE et al (2001) und 23% bei KARNEBEEK et al (2002)) ergibt sich die Frage nach der Ursache dieses Phänomens. Ein wichtiger Grund ist sicherlich die unterschiedliche Größe der Patientenkollektive (KNIGHT et al 1999, 2000; ANDERLID et al, 2002). Die Arbeitsgruppe SLAVOTINEK et al (1999) gibt eine Prävalenz von 7,5% an. Die Untersuchung beschränkt sich allerdings auf ein Patientenkollektiv von nur 27 Patienten, wovon zwei eine subtelomerische Veränderung in ihrem Chromosomensatz aufweisen. Ebenfalls über zwei Veränderungen im Bereich der Subtelomerregion berichtet die Arbeitsgruppe CLARKSON et al (2002). Ihr Patientenkollektiv besteht aus 50 Personen, wodurch sich letztendlich „nur“ eine Prävalenz von 4% ergibt. Generell gilt natürlich auch hier, dass die resultierenden Aussagen umso repräsentativer sind je größer das Patientenkollektiv ist. Ein weiterer Verzerrungsgrund sind die Einschlusskriterien und deren exakte oder weniger exakte Erfüllung. Manche Arbeitsgruppen haben als einziges Einschlusskriterium (neben der unauffälligen G-Bänderung) die geistige Behinderung gewählt (z.B. ROSSI et al, 2001). Viele Arbeitsgruppen achten auf das Vorhandensein zusätzlicher fazialer Dysmorphiezeichen oder anderer Malformationen (z.B. SLAVOTINEK et al, 1999 und FAN et al, 2001), weil beispielsweise die Arbeitsgruppe SCHINZEL et al bereits im Jahr 1984 beschrieb, dass Dysmorphien im Bereich des Gesichtes, der distalen Extremitäten und Genitalien häufig mit strukturellen Veränderungen der Chromosomenenden assoziiert sind. Viele Selektionskriterien müssen bei sogenannten Checklisten beachtet werden. Die bekannteste und gleichzeitig die, an der wir uns weitgehend orientiert haben, ist die der Arbeitsgruppe DE VRIES et al (2001). Allerdings werden diese Checklisten von den meisten

Arbeitsgruppen und auch von uns kontrovers diskutiert, wie im anschließenden Abschnitt (5.2.2) ausführlich berichtet wird. Chromosomale Veränderungen, die in der Regel mit relativ typischen Phänotypen einhergehen (z.B. 1p, 4p, 18p, 18q und 22q Deletionen), sind von mehreren Arbeitsgruppen, u.a. auch von KNIGHT et al (1999) und ANDERLID et al (2002) im Voraus nicht vermutet worden. Das sehen JOYCE et al (2001) sehr kritisch und stellen die These auf, dass eine genauere klinische Beurteilung der Patienten zu einer frühzeitigen Diagnose hätte führen können. Sowohl in unseren beiden Fällen mit jeweils einer partiellen Monosomie 1p und 4p, als auch bei den Fällen von KNIGHT et al (1999), handelt es sich um atypische oder zumindest nicht eindeutige Ausprägungen der bekannten Phänotypen (mehr dazu unter Punkt 5.2.3). Ganz von der Hand zu weisen ist das Argument der Arbeitsgruppe JOYCE et al allerdings nicht, denn eine gewisse Verzerrung der Objektivität durch den unterschiedlichen Erfahrungsgrad der Ärzte ist nachvollziehbar und bekannt. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Ausführlichkeit der Anamnesen und der klinischen Untersuchungsbefunde sowohl zwischen als auch innerhalb der Studien deutlich variieren, was die Arbeitsgruppen zum Teil selber bemängeln. Die Arbeitsgruppe VAN KARNEBEEK et al (2002) gibt als weitere Ursache für die verschiedenen Prävalenzen Unterschiede in den Qualitäten bei der Chromosomenpräparation und in der Durchführung der Kontrolluntersuchungen an. Unter Berücksichtigung aller genannten Verzerrungsmöglichkeiten kann man eine Diskrepanz zwischen einer Prävalenz von 23% bei KARNEBEEK et al (2002) und von 0% in der vergleichbaren Gruppe bei JOYCE et al (2001) annähernd erklären.

Speziell die Arbeitsgruppe JOYCE et al (2001) sieht den Sinn des Subtelomerscreenings insgesamt sehr kritisch. Sie berichtet von einer Prävalenz von 0% in einem ausführlich selektierten Kollektiv. Die Arbeitsgruppe erklärt sich dies teils durch die oben genannten Gründe, teils durch die Tatsache, dass es sich in ihrem Fall um eine prospektive und bei denen bis dato veröffentlichten Arbeiten um retrospektive Studien handelt. In retrospektiven Studien ist ihrer Ansicht nach die Gefahr der Datenverzerrung deutlich höher. Sie sind davon überzeugt, dass die hochauflösende G-Bänderungsanalyse die sensitivere Methode zur Suche von subtelomerischen Veränderungen ist.

### 5.2.2 Checkliste

Die Arbeitsgruppe DE VRIES et al (2001) veröffentlichte wie bereits einleitend diskutiert unter dem Aspekt der Kostenreduktion eine 5 Punkte-Checkliste, mit der die Patientenselektion effizienter werden soll. Die fünf Einschlusskriterien (neben der geistigen Behinderung) lauten:

- 1) Familiäre geistige Behinderung
- 2) Pränatale Wachstumsretardierung
- 3) Postnatale Wachstumsstörungen
- 4) Mindestens zwei faziale Dysmorphiezeichen und
- 5) Eine oder mehrere nicht-faziale Dysmorphiezeichen oder angeborene Anomalien (wie z.B. Organfehlbildungen).

Zur besseren Quantifizierung der vorhandenen Einschlusskriterien und zur übersichtlicheren Vergleichbarkeit der einzelnen Patienten, wurde jedem Patienten pro vorhandenem Einschlusskriterium eine festgelegte Punktzahl zugeteilt. Pro Einschlusskriterium werden allerdings nicht mehr als zwei Punkte vergeben. Im Falle eines Vorhandenseins aller fünf Einschlusskriterien und deren maximaler Ausprägung, ergäbe sich somit eine Punktzahl von zehn Punkten. Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Studie. DE VRIES et al (2001) untersuchten 29 Patienten mit einer geistigen Behinderung und bekannter subtelomerischen Veränderung und 110 geistig behinderte Patienten (Kontrollgruppe), die nachweislich keine Chromosomenanomalie im Bereich der Subtelomerregion aufwiesen (d.h. es ergaben sich in einem Subtelomerscreening der Arbeitsgruppe DE VRIES et al keine chromosomalen Veränderungen bei diesen 110 Patienten). Insgesamt sind zwar alle 5 Kriterien in der ersten Gruppe prozentual häufiger vertreten als in der zweiten Gruppe (Kontrollgruppe), aber nur bei zwei Einschlusskriterien ist dieser Unterschied signifikant. Dies ist zum einen die familiäre geistige Behinderung (bei 50% vorhanden) und zum Anderen die pränatale Wachstumsretardierung (bei 37% vorhanden). Wenn DE VRIES et al allerdings nur diese beiden Einschlusskriterien benutzt hätten, wären 35% der pathologischen Fälle (also die pränatal normalwüchsigen Patienten und die Patienten mit leerer Familienanamnese) übersehen worden. Stattdessen empfehlen sie, nur Patienten zu untersuchen, die bei Berücksichtigung aller fünf Einschlusskriterien eine Gesamtpunktzahl von  $\geq 3$  Punkten aufweisen. Damit hätte man nämlich in ihrer Studie 20% aller untersuchten Patienten im

Nachhinein ausschließen können, ohne dass ein pathologischer Fall übersehen worden wäre. Auch in unserer Studie träfe dies zu. Bei unseren vier pathologischen Fällen beträgt die Gesamtpunktzahl jeweils sogar 5 oder mehr Punkte. Bestätigen lässt sich allerdings nicht, dass die familiäre geistige Behinderung ein sehr effizientes Selektionskriterium sei. Bei uns findet man in keiner Anamnese der vier pathologischen Fälle ein weiteres, geistig behindertes Familienmitglied. Das zweite, bei DE VRIES et al als sehr informativ beschriebene, Einschlusskriterium (pränatale Wachstumsretardierung) findet sich bei uns in drei von vier pathologischen Fällen. Daher stimmen wir der Arbeitsgruppe in dieser Einschätzung durchaus zu. Ergänzend sei erwähnt, dass bei uns in 3/4 der pathologischen Fälle eine postnatale Wachstumsretardierung und in 4/4 der pathologischen Fälle jeweils faziale Dysmorphiezeichen und nicht-faziale Dysmorphiezeichen vorhanden sind.

ANDERLID et al (2002), BAKER et al (2002) und VAN KARNEBEEK et al (2002) haben ihre Ergebnisse ebenfalls mit der Checkliste von DE VRIES et al (2001) verglichen. Bei ANDERLID et al (2002) haben sechs von zehn pathologischen Fällen eine positive Familienanamnese, wobei es sich bei zwei dieser sechs Fälle wiederum um de novo Deletionen handelt. Dysmorphe Merkmale weisen (analog zu uns) alle pathologischen Fälle auf, aber pränatale Wachstumsretardierung haben nur zwei von zehn und postnatale Wachstumsretardierung nur drei von zehn Patienten. BAKER et al (2002) berichten darüber, dass nur sieben ihrer neun pathologischen Fälle eine Gesamtpunktzahl  $\geq 3$  Punkte haben und deshalb bei Einhaltung der Einschlusskriterien zwei pathologische Fälle übersehen worden wären. Die Arbeitsgruppe warnt ausdrücklich vor der Benutzung dieser Checkliste. Gerade das Einschlusskriterium der fazialen Dysmorphie könne nur sehr subjektiv beurteilt werden. VAN KARNEBEEK et al (2002) halten die Checkliste (zumindestens im Falle ihre Studie) ebenfalls für insuffizient für eine Vorselektion. Auch bei ihnen wären bei deren konsequenten Einhaltung einige chromosomale Veränderungen übersehen worden. Eine etwas andere Checkliste wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe WALTER et al (2004) veröffentlicht. Sie beinhaltet insgesamt nur vier Kategorien (Einschlusskriterien), wovon die mentale Retardierung bzw. die Entwicklungsverzögerung bereits eine davon darstellt. Bei den anderen drei handelt es sich um Dysmorphiezeichen (faziale und nicht-faziale Merkmale bilden hier ein gemeinsames Einschlusskriterium), Wachstumsanomalien (prä- und postnatale Wachstumsretardierungen zusammen) und eine auffällige (positive) Familienanamnese, wobei hier nicht nur geistige Behinderung, sondern auch Früh- und Totgeburten berücksichtigt werden. Pro Kategorie werden maximal 2 Punkte verteilt, womit sich eine theoretische Höchstpunktzahl von 8 Punkten ergibt. Die Arbeitsgruppe WALTER et al führte

mit Hilfe dieser Checkliste im Gegensatz zu DE VRIES et al (2001) eine prospektive Studie an 50 Patienten durch, die entweder eine Gesamtpunktzahl von  $\geq 3$  Punkten in drei verschiedenen Kategorien oder aber eine Gesamtpunktzahl von  $\geq 4$  Punkten in zwei verschiedenen Kategorien erreicht hatten. In zehn dieser 50 Fälle fanden sie (mit Hilfe von, während der Studie wechselnden, Subtelomersonden) chromosomale Veränderungen. Das ergibt eine Detektionsrate (Prävalenz) von beachtlichen 20%. Von den insgesamt 16 Patienten mit einem leichten oder undefinierbaren Schweregrad der geistigen Behinderung gehören drei zu den Betroffenen. Das ergibt eine Prävalenz von fast 19 % und veranlasst die Arbeitsgruppe WALTER et al zu der These, dass ihre Checkliste vor allem in dieser speziellen Gruppe bei der Patientenselektion von großem Nutzen sein könnte.

### 5.2.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die klinischen Merkmale von Patienten mit Subtelomerveränderungen sind sehr heterogen (SLAVOTINEK et al, 1999). Es sind auf der einen Seite Fälle mit schwerer geistiger Behinderung und Dismorphiezeichen, auf der anderen Seite Fälle mit isolierter leichter geistiger Behinderung beschrieben (ANDERLID et al, 2002; BAKER et al, 2002, WALTER et al, 2004; GIRAUDEAU et al, 1997; BIESECKER et al, 1996, WONG et al, 1997). Einige wenige (zum Teil auch lichtmikroskopisch sichtbare) Subtelomerveränderungen wie z.B. beim Wolf-Hirschhorn-Syndrom ( $4p^-$ ) und beim cri-du-chat-Syndrom ( $5p^-$ ) sind bekanntermaßen mit relativ spezifischen Phänotypen assoziiert (DE VRIES et al, 2001). Mit zunehmender Anzahl von veröffentlichten Subtelomerstudien, steigt auch die Zahl an Beschreibungen spezifischer Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Ein Beispiel dafür sind die erst kürzlich veröffentlichten Daten über das  $1p^-$  und  $22q^-$  Syndrom (DE VRIES et al, 2001; BAKER et al, 2002; FAN et al, 2001; ROBERTS et al, 2004).

Unsere Patientin 16 (Fall 1) leidet an einer Variante des Wolf-Hirschhorn-Syndroms mit Nachweis einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosom 4 und dem Chromosom 20 ( $46,XX, -4, der(4), t(4;20) (p16;q13)$ ) infolge einer mütterlichen balancierten reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 20 ( $46,XX, t(4;20) (p16;q13)$ ). Bei dem  $4p^-$  Syndrom (Wolf-Hirschhorn-Syndrom) ist ein typischer Phänotyp ausführlich in der Literatur beschrieben. Charakteristisch sind mentale Retardierung, Mikrozephalus, hohe Stirn, Hypertelorismus, antimongoloide Lidachse, Iriskolobome, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Mikrognathie, dysplastische Ohren, angeborener Herzfehler, Hirn- und Nierenfehlbildungen und epileptische Anfälle (ZOLLINO et al, 2000; GOODSHIP et al,

1992; CURTIS et al, 1991; ALTHERR et al, 1991). Für die partielle Trisomie 20q<sup>+</sup> gibt es solch einen typischen Phänotyp allerdings bisher nicht. ANDERLID et al (2002) beschreiben in ihrer Studie eine unbalancierte Translokation mit einer partiellen Monosomie 22q<sup>-</sup> und einer partiellen Trisomie 20q<sup>+</sup>. Die Patientin leidet unter einer schweren mentalen Retardierung, zeigt einen Epikanthus, eine flache Nasenwurzel, ein hypoplastisches Mittelgesicht und tief ansetzende Ohren. Einen weiteren Fallbericht gibt es von der Arbeitsgruppe ADDOR et al (2002). Die Patientin hat eine partielle Trisomie 20q<sup>+</sup> in Folge einer väterlichen Translokation (2;20). Sie zeigt einen Brachycephalus, eine hervorstehende Stirn, tiefsitzenden Augen, eine kurzen Nase, großen Ohren, ein Kinngübchen, einen kurzen Nacken und einen Herzfehler (Dextrocardia).

Insgesamt dominiert bei unserer Patientin zwar das 4p<sup>-</sup> Syndrom (Mikrozephalus, hohe Balkenstirn, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, dysplastische Ohren, Ventrikelseptumdefekt und Anfallsleiden), aber vermutlich durch die konkurrierende Trisomie 20q<sup>+</sup> (Epikanthus, große Ohren) gestaltete sich die Identifizierung schwieriger. Die geistiger Behinderung ist bei beiden Syndromen zu erwarten und liefert daher keine zusätzlichen Hinweise. Die gleichen Probleme hatten auch KNIGHT et al (1999), ANDERLID et al (2002), FAN et al (2001) und WALTER et al (2004). Alle Arbeitsgruppen hatten Fälle, bei denen genetisch ein WHS zu erwarten war, aber in keinem der insgesamt sechs Fälle war phänotypisch im Vorhinein dieser Verdacht geäußert worden.

Bei unserem Patienten 49 (Fall 2) fand sich eine subtelomerische Deletion im kurzen Arm eines Chromosoms 8 mit dem Karyotyp 46,XY, del (8) (p23). Das 8p<sup>-</sup>-Syndrom ist mittlerweile gut erforscht und es gibt eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Häufig mit einer 8p<sup>-</sup>-Deletion assoziiert sind demnach ein niedriges Geburtsgewicht, postnatale Wachstumsretardierung, ein Epikanthus, tiefsitzende und dysplastische Ohren, ein kurzer Nacken, Herzfehler, eine Hypospadie und eine geistige Behinderung (DIGILIO et al 1993, 1995,1998; BROCKER-VRIENDS et al, 1986; DEVRIENDT et al, 1995; DOBYNS et al, 1985; FRYNS et al, 1989; DE VRIES et al, 2001). Unter einigen dieser Symptome leidet unser Patient. Vorhanden sind bei ihm eine postnatale Wachstumsretardierung, tiefsitzende und einfach modellierte Ohren, eine geistige Behinderung und v.a. eine links persistierende obere Hohlvene, die besonders häufig mit 8p<sup>-</sup>-Deletionen assoziiert ist. Damit bestimmt auch in diesem Fall der Genotyp den Phänotyp.

Bei unserem Patienten 62 (Fall3) ergab die erweiterte zytogenetische Diagnostik mit Subtelomersonden eine Trisomie für den p-terminalen Bereich und eine Monosomie für den q-terminalen Bereich des Chromosoms 7. In der Studie der Arbeitsgruppe WALTER et al

(2004) finden sich drei partielle Monosomien  $7q^-$  und zwei partielle Trisomien  $7p^+$ . Für das  $7p^+$  Syndrom ist bisher keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschrieben. Sowohl FAN et al (2001) als auch WALTER et al (2004) beschreiben lediglich einzelne Fälle bei denen die partielle Trisomie  $7p^+$  zwar jeweils Teil einer unbalancierten Translokation sind, der Phänotyp beider Patienten aber am ehesten durch die partiellen Monosomien des Translokationspartners bedingt ist ( $4p^-$  und  $18p^-$ ). Für die partielle Monosomie  $7q^-$  dagegen ist eine relativ spezifische Genotyp-Phänotyp-Assoziation bekannt. Auf dem langen Arm des Chromosoms 7 liegt das sogenannte SHH-Gen (Sonic-Hedge-Hog-Gen). Es kommt bei dessen Verlust zur Ausprägung einer Holoprosenzephalie (ROESSLER et al, 1996;). Außerdem leiden die Patienten unter einer sehr schweren geistigen Behinderung. Die weiteren Symptome sind dagegen sehr variabel (HORN et al, 2004). Unter anderem kann es zu einer Entwicklungsverzögerung und Wachstumsretardierung, sowie zu einer Ausprägung von flachen Wangenknochen, einer prominenten Stirn, okulären und auriculären Dysplasien, einer breiten Nasenwurzel, einer Mikrognathie, Genitalfehlbildungen bei männlichen Patienten und zu Hand- und Fußfehlbildungen kommen (YOUNG et al, 1984; HATZIIOANNOU et al, 1991; FRINTS et al, 1996; SHAFFER et al, 1996; HORN et al, 2004). Unser Patient zeigt einige dieser Auffälligkeiten (prominente Augen, tiefe Nasenwurzel mit flacher Nase, dysplastische Ohren, Hypospadie und röntgenologisch die Andeutung einer Hexadaktylie an den Händen) und die sehr charakteristische Holoprosenzephalie. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Symptomatik des Kindes und dem Subtelomerbefund ist in diesem Fall sehr wahrscheinlich.

Bei Patientin 63 (Fall 4) liegt eine partielle Monosomie  $1p^-$  und eine partielle Trisomie  $22q^+$  vor (Karyotyp  $46,XX, -1, der(1), t(1;22)(p36;q13)$ ). Für die partielle Trisomie  $22q^+$  sind zwar bisher einige Fallberichte veröffentlicht worden, aber keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation bekannt. Die Arbeitsgruppen PETEK et al (2000), WIECZOREK et al (1998), SCHINZEL et al (1981) und BIESECKER et al (1995) berichten bei ihren Patienten über pränatale Wachstumsretardierung, Hypotelorismus, und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Bei männlichen Patienten sind zusätzlich hypoplastische Genitalien mit Kryptorchismus und Hypospadie beschrieben. In der Literatur hingegen sehr ausführlich berichtet ist die Genotyp-Phänotyp-Korrelation des  $1p^-$ -Syndroms. Es ist gekennzeichnet durch mittelgradige bis schwergradige geistige Behinderung, prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Mikrozephalus, Hypotonie und Krampfanfälle (GIRAUDEAU et al, 1997; BLENNOW et al, 1996; WARGOWSKI et al, 1991; WEXLER et al, 1991; BIEGEL et al, 1993; SANDLIN et al, 1995; WENGER et al, 1988). Weitere häufige Merkmale sind faziale Dysmorphiezeichen,

z.B. große vordere Fontanelle, prominente Stirn, tiefsitzende und dysplastische Ohren, flaches Mittelgesicht, spitzes Kinn (KEPPLER-NOREUIL et al, 1995; REISH et al, 1995; SHAPIRA et al, 1997). Unsere Patientin leidet u.a. an prä- und postnataler Wachstumsretardierung, fazialen Dysmorphien und einer Entwicklungsverzögerung. Dies sind Symptome, die bei  $1p^-$ - und  $22q^+$ -Syndromen beschrieben sind. Allerdings sind der Herzfehler und der Hydrozephalus keine typischen Symptome und könnten daher von dem dominierenden Phänotypen des  $1p^-$ -Syndroms abgelenkt haben.

Die partielle Monosomie für den kurzen Arm eines Chromosoms 1 ist eine häufige Subtelomerveränderung. Trotzdem ist es keiner Arbeitsgruppe und auch uns nicht gelungen, ein  $1p^-$ -Syndrom anhand des Phänotyps vorauszusagen (SLAVOTINEK et al, 1999; BAKER et al, 2002; BALLIF et al, 2000; FAN et al, 2001 und ROBERTS et al, 2004).

#### 5.2.4 Ausblick

Die relativ große Häufigkeit von im Durchschnitt ca. 5,8% der Subtelomerveränderungen in der Gruppe mental retardierter Patienten (BIESECKER et al, 2002; WALTER et al, 2004) unterstreicht die Bedeutung dieser Studien. Es gilt weiterhin, dass Subtelomerveränderungen die vermutlich zweithäufigste Ursache für geistige Behinderung nach dem Down-Syndrom darstellen. Dies rechtfertigt auch die Kosten für eine Verbesserung der Treffsicherheit der bereits vorhandenen und für die Entwicklung innovativer neuer Methoden.

Denn von vielen Arbeitsgruppen wird bei den Subtelomersonden-Kits immer wieder die Tatsache kritisiert, dass 24 simultane Hybridisierungen (also für jedes Chromosom einzeln) notwendig sind (z.B. ANDERLID et al, 2002). Wünschenswert wäre analog zu den Multicolour-FISH Methoden (wie z.B. SKY) eine Technik, die alle Subtelomere gleichzeitig und in verschiedenen Farben detektiert. Die Arbeitsgruppe POPP et al (2002) arbeitet in ihrer Studie bereits mit einem "12-Farben multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay" (BROWN et al, 2000, 2001). Dabei handelt es sich um eine solche Weiterentwicklung der Subtelomer-FISH-Technik. Es war dabei möglich, mit nur zwei Sonden-Mischungen und dementsprechend zwei Hybridisierungen jeweils die Subtelomerregionen von 12 Chromosomen gleichzeitig und in verschiedenen Farben zu detektieren.

Eine alternative Methode ist ein weitgehend automatisiertes Verfahren mittels Mikrosatelliten-Markern. Mikrosatelliten-Marker sind natürlich vorkommende DNA Polymorphismen einzelner Basenpaare, die in erster Linie zur Suche von Deletionen und Duplikationen benutzt werden. Deutlich eingeschränkt ist die Aussagekraft dieser Methode

beispielsweise zum Nachweis balancierter Translokationen. Da ihre Zuverlässigkeit als nicht hoch beschrieben wird und es im Vergleich zu anderen Screeningmethoden wesentlich häufiger zu falsch-positiven Ergebnissen kommt ist anzunehmen, dass sich diese Methode auf lange Sicht nicht durchsetzen wird (COLLEAUX et al, 2001; ROSENBERG et al, 2002).

Eine innovative Methode ist die sogenannte "multiplex amplifiable probe hybridisation", kurz MAPH genannt. Sie basiert auf der Detektion von Verlusten und Zugewinnen von DNA-Sequenzen speziell im Bereich der Subtelomerregionen. Subtelomersonden werden hierbei auf immobilisierte genomische DNA hybridisiert, gefolgt von einer quantitativen Rückgewinnung und Amplifizierung dieser Sonden (SISMANI et al, 2001; HOLLOX et al, 2002). Diese zukunftsweisende Methode ist den FISH-Techniken in einigen Punkten überlegen. Es werden keine Metaphasenchromosomen mehr gebraucht, sondern isolierte DNA verwendet. Es können alle Subtelomerregionen simultan untersucht werden und die Methode ist schnell durchzuführen und vergleichsweise kostengünstig (SISMANI et al, 2001; HOLLOX et al, 2002; WHITE et al 2002).

Als vielversprechend wird von uns auch der Nachweis von Subtelomerveränderungen durch Methoden eingeschätzt, die auf einer vergleichenden genomische Hybridisierung (CGH) beruhen. Die CGH ist eine molekular-zytogenetische Methode, bei der die "Test-DNA" des zu untersuchenden Gewebes und eine "Referenz-DNA" aus Lymphozyten mit normalem Karyotyp des gleichen Geschlechts verschiedenfarbig markiert werden. Anschließend werden beide in gleichen Konzentrationen auf normale Metaphasechromosomen aus Blutlymphozyten des gleichen Geschlechts hybridisiert. Anhand der unterschiedlichen Intensitäten der Fluorochrome der Test-DNA und der Referenz-DNA kann man auf deren quantitatives Verhältnis zueinander schließen und somit Verluste und Zugewinne von DNA-Sequenzen in dem untersuchten Gewebe bestimmen. Dies gelingt allerdings nur sofern sie in mehr als 30% der Zellen vorkommen. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits den Wert auf CGH basierender Methoden gezeigt (JOLY et al, 2001; KIRCHHOFF et al, 2000, 2004; VELTMANN et al, 2002).

Bei der sogenannten "High resolution comparative genomic hybridisation" (kurz HR-CGH) ist das Auflösungsvermögen mit ca. 3 Mb im Vergleich zur konventionellen CGH (10 bis 20 Mb) mehr als dreimal so hoch und damit die Sensitivität ebenfalls deutlich höher. Das Auflösungsvermögen liegt nicht nennenswert unter der von SKY, aber die HR-CGH ist eine Technik mit der man theoretisch das ganze Genom betreffende chromosomale Veränderungen nachweisen kann (JOLY et al, 2001; KIRCHHOFF et al, 2000, 2004). Außerdem können

- was mit SKY nicht gelingt – Amplifikationen und Deletionen innerhalb eines Chromosoms nachgewiesen werden. Es können also auch Aussagen über interstitielle Chromosomenveränderungen getroffen werden. Die Arbeitsgruppe KIRCHHOFF et al (2004) vertritt sogar die These, dass sich die Mehrzahl der pathologischen Befunde bei geistig behinderten Patienten auf solche interstitielle Veränderungen zurückzuführen ist. Lediglich bei einer familiären geistigen Behinderung empfiehlt die Arbeitsgruppe ein Subtelomercreeening der HR-CGH vorzuziehen. Ein weiterer Vorteil der HR-CGH gegenüber der konventionellen FISH-Technik besteht darin, dass sich die sonst häufig störenden chromosomalen Polymorphismen (z.B. auf 2q) praktisch nicht mehr bemerkbar machen.

Die sogenannte “Array-Based Comparative Genomic Hybridisation“ ist ebenfalls eine Variante der konventionellen CGH (VELTMANN et al, 2002; KALLIONIEMI et al, 1992; WEISS et al, 1999; LICHTER et al, 2000). Bei diesem Verfahren werden unterschiedlich markierte Test- (Patienten-) und Referenz- (Normal-) DNA in gleichen Konzentrationen auf geklonte genomische Fragmente (BACs, PACs, YACs) hybridisiert. Diese durch Roboter aufgetropften Klone befinden sich in einem Miniaturformat auf einem mikroskopischen Chip. Bei der semiautomatischen Auswertung kann dann vom Intensitätsunterschied der beiden Fluorochrome (Test-DNA und Referenz-DNA) auf deren quantitatives Verhältnis zueinander geschlossen werden und somit Verluste und Zugewinne von DNA-Sequenzen, sogenannte “single-copy-number-differences“, sichtbar gemacht werden. Die Arbeitsgruppen VELTMANN et al (2002), ISHKANIAN et al (2004) und ROOMS et al (2005) halten die Array-Based Comparative Genomic Hybridisation (kurz Microarray CGH) für die überlegene Methode im Vergleich zu den anderen Verfahren, dem multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay, dem multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH), dem Fluoreszenz-Genotyping mittels Mikrosatelliten-Markern, sowie dem Chromprobe Multiprobe T-System. Die Arbeitsgruppe VERMEESCH et al (2005) entwickelte bereits eine noch höherauflösende Variante der Array-CGH, die sogenannte “molekulare Karyotypisierung“. Mit dieser Methode wird es möglich, nicht nur in allen Zellen vorhandene single-copy-Zugewinne und Verluste darzustellen, sondern durch die enorm hohe Auflösung auch Zugewinne und Verluste nachzuweisen, welche beispielsweise nur in einem Teil der untersuchten Zellen vorhanden sind (Mosaik). Lag die Auflösung der ersten Generation der microarray CGH noch bei ca. 1Mb, so liegt sie bei der molekularen Karyotypisierung schon bei 10-100kb (LUCITO et al, 2003, ISHKANIAN et al, 2004). Es ist anzunehmen, dass eine molekulare Karyotypisierung auf Basis der Array-Based Comparative Genomic Hybridisation wegen ihrer Robustheit, Einfachheit, Schnelligkeit, Sensitivität und Automatisierbarkeit und einer theoretisch

---

möglichen Auflösung bis auf Einzelnukleotidebene die heute üblichen (Subtelomer-) Screeningverfahren mittel- bis langfristig ablösen wird.

Dies bedeutet, dass die Verfahren zum Nachweis chromosomaler Strukturveränderungen mit einer Treffsicherheit von heute rund 5% eine Treffsicherheit von theoretisch 100% erreichen werden, d.h. dass in Fällen von geistiger Behinderung mit oder ohne zusätzliche Dysmorphiezeichen, in denen keine chromosomale Veränderung nachgewiesen wird, andere Entstehungsursachen zu diskutieren sind.

## 6. Anhang

### A. Bezugsquellen der Materialien

- Anti-dig-Rhodamin: ROCHE
- Anti-dig-mouse: ROCHE
- Anti-mouse-dig: ROCHE
- Bio-anti-Streptavidin: LINARIS
- Bio-16-dUTP: ROCHE
- Blocking Reagenz: ROCHE
- Bovines Serum Albumin: SERVA, SIGMA, MERCK
- Colcemid: GIBCO
- Dig-11-dUTP: ROCHE
- EDTA: SIGMA
- Essigsäure: MERCK
- Ethanol: MERCK
- Fixogum: MARABU
- Fötale Kälber Serum: GIBCO
- Formamid: MERCK
- Giemsa: MERCK
- Glycerin: SERVA
- Methanol: MERCK
- Paraformaldehyd: MERCK
- Pepsin: SIGMA
- Proteinase K: ROCHE, MERCK
- RNaseA: SIGMA
- Streptavidin-FITC: LINARIS
- Trypsin: GIBCO
- Tween 20: SIGMA
- Vectashield Mounting Medium with DAPI: LINARIS

### B. Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua dest. unter möglichst reinen Bedingungen angesetzt. Im Folgenden sind die häufig benutzten Lösungen angegeben, die speziellen finden sich bei der jeweiligen Technik im Methodenteil.

20xSSC:

3M NaCl  
0,3 M NaCitrat (pH 7,0)

PBS-Puffer:

150mM NaCl  
8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2mM KCl  
2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7,0)

Postfix:

PBS  
1% FA  
50mM MgCl<sub>2</sub>

Denaturierungslösung:

70% Formamid  
2xSSC pH(7,0)  
50mM Natriumphosphat pH(7,0)

RNase: 10mg/ml in 2xSSC

Pepsin/HCl: 0,05% Pepsin in 0,01 M HCl (pH2,0)

FA/SSC: 50%Formamid in 2xSSC

Hybridisierungsmix: 20%Dextransulfat/4xSSC

aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%)

## C. Geräte und Software

Gerät/Software	Firma	Typ
Fluoreszenzmikroskop (SKY)	Zeiss	Axioplan
Fluoreszenzmikroskop (sonstiges)	Olympus	AX70
CCD Kamera (SKY)	Hamatsu	C4480-85
CCD-Kamera (sonstiges)	Photometrics	CH 250 (Kamera) CE 200A (Kühlung)
Software (sonstiges)	MetaSystems	ISIS 2.5 und Ikaros 3.0
Software (SKY)	ASI	SkyVision 1.6
Interferometer (SKY)	ASI	SD 200
Hellfeldmikroskop	Zeiss	
UV Crosslinker	Stratagene	UV Stratalinker 1800
Eppendorfzentrifuge (gekühlt)	Hermle	Z 233 MK
Vakuumentrifuge	Savant	Speed Vac SVC 100
Thermocycler	MJ Research	PTC 200

## **7. Literaturverzeichnis**

- Addor MC, Castagne C, Micheli JL, Schorderet DF (2002) Partial trisomy 20q in a newborn with dextrocardia. *Genet Couns.* 13(4):433-40
- Altherr MR, Bengtsson U, Elder FF, Ledbetter DH, Wasmuth JJ, McDonald ME, Gusella JF, Greenberg F (1991) Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. *Am J Hum Genet.* 49(6):1235-42
- Altherr MR, Wright TJ, Denison K, Perez-Castro AV, Johnson VP (1997) Delimiting the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region to 750 kilobase pairs. *Am J Med Genet.* 71(1):47-53
- Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M (2002) Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet.* 107(4):275-84
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR (2000). An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 66, 1684-1688
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000) The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet.* 67(5):1356-9
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000) FISHing for mechanisms of cytogenetically defined terminal deletions using chromosome-specific subtelomeric probes. *Eur J Hum Genet.* 8(10):764-70
- Baker E, Hinton L, Callen DF, Aintree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E (2002) Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet.* 107(4):285-93
- Bezrookove V, Hansson K, van der Burg M, van der Smagt JJ, Hilhorst-Hofstee Y, Wiegant J, Beverstock GC, Raap AK, Tanke H, Breuning MH, Rosenberg C (2000) Individuals with abnormal phenotype and normal G-banding karyotype: improvement and limitations in the diagnosis by the use of 24-colour FISH. *Hum Genet.* 106(4):392-8
- Biegel JA, White PS, Marshall HN, Fujimori M, Zackai EH, Scher CD, Brodeur GM, Emanuel (1993) Constitutional 1p36 deletion in a child with neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 52(1):176-82
- Biesecker LG, Rosenberg M, Dziadzio L, Ledbetter DH, Ning Y, Sarneso C, Rosenbaum K (1995) Detection of a subtle rearrangement of chromosome 22 using molecular techniques. *Am J Med Genet.* 58(4):389-94
- Biesecker LG (2002) The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet.* 107(4):263-6

- Blennow E, Bui TH, Wallin A, Kogner P (1996) Monosomy 1p36.31-33-->pter due to a paternal reciprocal translocation: prognostic significance of FISH analysis. *Am J Med Genet.* 65(1):60-7
- Bonifacio S, Centrone C, Da Prato L, Scordo MR, Estienne M, Torricelli F (2001) Use of primed in situ labeling (PRINS) for the detection of telomeric deletions associated with mental retardation. *Cytogenet Cell Genet.* 93(1-2):16-8
- Brocker-Vriends AH, Mooij PD, van Bel F, Beverstock GC, van de Kamp JJ (1986) Monosomy 8p: an easily overlooked syndrome. *J Med Genet.* 23(2):153-4
- Brown J, Horsley SW, Jung C, Saracoglu K, Janssen B, Brough M, Daschner M, Beedgen B, Kerkhoff G, Eils R, Harris PC, Jauch A, Kearney B (2000) Identification of a subtle t(16;19)(p13.3;p13.3) in an infant with multiple congenital abnormalities using a 12-colour multiplex FISH telomere assay, M-TEL. *Eur J Hum Genet.* 8:903-910
- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L (2001) Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med.* 7(4):497-501
- Browne C, Moore KJ, Dennis NR, Joyce CA (1999) High resolution chromosome analysis: a more cost effective approach to subtelomeric screening? *J Med Genet.* 36: S50
- Brunnhuber S, Frauenknecht S, Lieb K (2005) Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie. Urban & Fischer Verlag
- Bunday S, Thake A, Todd J (1989) The recurrence risks for mild idiopathic mental retardation. *J Med Genet.* 26(4):260-6
- Buselmaier W, Tariverdian G (1991) Humangenetik. Springer-Verlag Berlin
- Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L, Kennedy S, Meyn S, Nezarati MM, Nie G, Weksberg R, Withers S, Quercia N, Teebi AS, Teshima I (2002) Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am J Med Genet.* 107(4):267-74
- Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, Gosset P, Raoult O, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Le Merrer M, Picq M, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Cornelis F, Vekemans M, Munnich A (2001) A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 9(5):319-27
- Curtis A, Goodship JA, Brown J (1991) Recurrence of Wolf-Hirschhorn syndrome due to a submicroscopic 4p-deletion detected prenatally by molecular analysis. *Am J Hum Genet.* 49:299
- Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (Neuropädiatrie). Leitlinien Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Urban und Fischer, München 2001

- Devriendt K, De Mars K, De Cock P, Gewillig M, Fryns JP (1995) Terminal deletion in chromosome region 8p23.1-8pter in a child with features of velo-cardio-facial syndrome. *Ann Genet.* 38(4):228-30
- de Vries BB, Lees M, Knight SJ, Regan R, Corney D, Flint J, Barnicoat A, Winter RM (2001) Submicroscopic 8pter deletion, mild mental retardation, and behavioral problems caused by a familial t(8;20)(p23;p13). *Am J Med Genet.* 99(4):314-9
- de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM (2001) Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet.* 38(3):145-50
- Digilio MC, Giannotti A, Marino B, Dallapiccola B (1993) Atrioventricular canal and 8p-syndrome. *Am J Med Genet.* 47(3):437-8
- Digilio MC, Marino B, Giannotti A, Dallapiccola B (1995) Single atrium, atrioventricular canal/postaxial hexodactyly indicating Ellis-van Creveld syndrome. *Hum Genet.* 96(2):251-3
- Digilio MC, Marino B, Guccione P, Giannotti A, Mingarelli R, Dallapiccola B (1998) Deletion 8p syndrome. *Am J Med Genet.* 75(5):534-6
- Dobyns WB, Dewald GW, Carlson RO, Mair DD, Michels VV (1985) Deficiency of chromosome 8p21.1---8pter: case report and review of the literature. *Am J Med Genet.* 22(1):125-34
- Elwood JH, Darragh PM (1981) Severe mental handicap in Northern Ireland. *J Ment Defic Res.* 25(Pt 3):147-55
- Fan YS, Siu VM, Jung JH, Xu J (2000) Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. *Genet Test.* 4(1):9-14
- Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM (2001) Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med.* 3(6):416-21
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet.* 9(2):132-40
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet.* 6(8):1305-13
- Flint J, Thomas K, Micklem G, Raynham H, Clark K, Doggett NA, King A, Higgs DR (1997) The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet.* 15(3):252-7

- Frints SG, Moerman P, Fryns JP (1996) Variable expression of phenotype in offspring with partial monosomy 7q and partial trisomy 8p in a family with a rec (7;8)(134;p12) translocation. *Genet Couns.* 7(4):313-9
- Fryns JP, Kleczkowska A, Vogels A, Van den Berghe H (1989) Normal phenotype and slight mental retardation in de novo distal 8p deletion (8pter----8p23.1). *Ann Genet.* 32(3):171-3
- Garini Y, Macville M, du Manoir S, Buckwald RA, Lavi M, Katzir N, Wine D, Bar-Am I, Schröck E, Cabib D, Ried T (1996) Spectral karyotyping. *Bioimaging* 4, 65-72
- Giraudeau F, Aubert D, Young I, Horsley S, Knight S, Kearney L, Vergnaud G, Flint J (1997) Molecular-cytogenetic detection of a deletion of 1p36.3. *J Med Genet.* 34(4):314-7
- Goodship J, Curtis A, Cross I, Brown J, Emslie J, Wolstenholme J, Bhattacharya S, Burn J (1992) A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent in situ hybridisation. *J Med Genet.* 29(7):451-4
- Gustavson KH, Hagberg B, Hagberg G, Sars K (1977) Severe mental retardation in a Swedish county. II. Etiologic and pathogenetic aspects of children born 1959--1970. *Neuropädiatrie* 8(3):293-304
- Haddad BR, Schröck E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith MA, du MS, Ried T (1998) Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet* 103, 619-625
- Hagberg B, Hagberg G, Lewerth A, Lindberg U (1981) Mild mental retardation in Swedish school children. *Acta Paediatr Scand.* 70(4):445-52
- Hatzioannou AG, Krauss CM, Lewis MB, Halazonetis TD (1991) Familial holoprosencephaly associated with a translocation breakpoint at chromosomal position 7q36. *Am J Med Genet.* 40(2):201-5
- Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (2000) *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* 4. Auflage - Georg Thieme Verlag - Stuttgart
- Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA (2002) High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet.* 39(11):790-5
- Horn D, Tonnies H, Neitzel H, Wahl D, Hinkel GK, von Moers A, Bartsch O (2004) Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36.3. *Am J Med Genet A.* 128(1):85-92
- Huang XL, Wyandt HE, Milansky JM (2000) Subtelomeric testing for cryptic chromosomal rearrangements in 68 patients with idiopathic mental retardation and dysmorphism. *Am J Hum Genet.* 67 (suppl): A853

- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL (2004) A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet.* 36(3):299-303
- Jalal SM, Harwood A., Anderson M, Lorentz C, Law M, Lindor N, Karnes P, Kulharya A, Sekhon G, Michels V (2000) Screening for subtle structural anomalies by use of subtelomere specific FISH probe set. *Am J Hum Genet.* 67 (suppl): A770
- Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana S, Vekemans M, Turleau C (2001) Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet.* 60(3):212-9
- Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE (2001) Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet.* 109(4):440-51
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992 258(5083):818-21
- Keppler-Noreuil KM, Carroll AJ, Finley WH, Rutledge SL (1995) Chromosome 1p terminal deletion: report of new findings and confirmation of two characteristic phenotypes. *J Med Genet.* 32(8):619-22
- Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M, Tommerup N, Tumer Z, Lespinasse J, Jensen PK, Wirth J, Lundsteen C (2000) High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *Eur J Hum Genet.* 8(9):661-8
- Kirchhoff M, Pedersen S, Kjeldsen E, Rose H, Duno M, Kolvraa S, Lundsteen C (2004) Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH. *Am J Med Genet A.* 127(2):111-7
- Knight SJ, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DL, Flint J, Kearney L (1997) Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet.* 5(1):1-8
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 354(9191):1676-81
- Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DL, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet.* 67(2):320-32

- Knight SJ, Flint J. (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet.* 37(6):401-9
- Lamont MA, Dennis NR (1988) Aetiology of mild mental retardation. *Arch Dis Child.* 63(9):1032-8
- Laxova R, Ridler MA, Bowen-Bravery M (1977) An etiological survey of the severely retarded Hertfordshire children who were born between January 1, 1965 and December 31, 1967. *Am J Med Genet.* 1(1):75-86
- Ledbetter DH (1992) Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet.* (3):451-6
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994) *In situ-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin*
- Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, et al (1993) Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet.* 2(5):505-12
- Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S (2000) Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol.* 37(4):348-57
- Liehr T, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier HU, Claussen U (2002) Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res.* 97(1-2):43-50
- Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, Rodgers L, Brady A, Sebat J, Troge J, West JA, Rostan S, Nguyen KC, Powers S, Ye KQ, Olshen A, Venkatraman E, Norton L, Wigler M (2003) Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res.* 13(10):2291-305
- Macina RA, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA, Hu XL, Riethman HC (1994) Sequence organization of the human chromosome 2q telomere. *Hum Mol Genet.* 3(10):1847-53
- Malik Z, Dishi M, Garini Y (1996) Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. *Photochem Photobiol.* 63, 608-614
- McDonald AD (1973) Severely retarded children in Quebec: prevalence, causes, and care. *Am J Ment Defic.* 78(2):205-15
- National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine collaboration (1996) A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet.* 14(1):86-9

- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK (1989) Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*. 10(1):20-7
- Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M (1990) Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*. 11(1):126-31
- Petek E, Kostl G, Mutz I, Wagner K, Kroisel PM (2000) Characterization of a de novo partial trisomy 22q13-qter in a patient by microFISH. *Clin Dysmorphol*. 9(1):55-7
- Popp S, Jauch A, Schindler D, Speicher MR, Lengauer C, Donis-Keller H, Riethman HC, Cremer T (1993) A strategy for the characterization of minute chromosome rearrangements using multiple color fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA libraries and YAC clones. *Hum Genet*. 92(6):527-32
- Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Brough M, Hager HD, Tariverdian G, Brown J, Kearney L, Jauch A (2002) Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet*. 111(1):31-9
- Reish O, Berry SA, Hirsch B. (1995) Partial monosomy of chromosome 1p36.3: characterization of the critical region and delineation of a syndrome. *Am J Med Genet*. 59(4):467-75
- Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992) Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(4):1388-92
- Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A (2001) Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet*. 109(3):286-94
- Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O, Cormier-Daire V, Amiel J, Lyonnet S, Le Merrer M, Turleau C, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L (2002) Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet*. 39(4):266-70
- Roberts AE, Cox GF, Kimonis V, Lamb A, Irons M (2004) Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 128(4):352-63
- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet*. 14(3):357-60
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF (2005) Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*. 25(6):513-24

- Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, Tiftt CJ, Meck J, Blancato JK, Rosenbaum K, Pauli RM, Weber J, Biesecker LG (2000) Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet.* 66(2):419-27
- Rosenberg MJ, Killoran C, Dziadzio L, Chang S, Stone DL, Meck J, Aughton D, Bird LM, Bodurtha J, Cassidy SB, Graham JM Jr, Grix A, Guttmacher AE, Hudgins L, Kozma C, Michaelis RC, Pauli R, Peters KF, Rosenbaum KN, Tiftt CJ, Wargowski D, Williams MS, Biesecker LG (2001) Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum Genet.* 109(3):311-8
- Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Dagna Bricarelli F, Bonaglia M, Bedeschi M, Borgatti R (2001) Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet.* 38(6):417-20
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G (1992) The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(11):4913-7
- Sandlin CJ, Dodd BS, Dumars KW, Bartley IA, Bernstein R, Lamb A. (1995) Phenotypes associated with terminal deletion of the short arm of chromosome one. *Am J Hum Genet.* 57: A130
- Schinzel A, Schmid W, Auf der Maur P, Moser H, Degenhardt KH, Geisler M, Grubisic A (1981) Incomplete trisomy 22. I. Familial 11/22 translocation with 3:1 meiotic disjunction. Delineation of a common clinical picture and report of nine new cases from six families. *Hum Genet.* 56(3):249-62
- Schinzel A (1984) Notes on clinical findings in autosomal chromosome aberrations. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations, Walter de Gruyter: 35-40*
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273(5274):494-7
- Shaffer LG, Spikes AS, Macha M, Dunn R (1996) Identification of a subtle chromosomal translocation in a family with recurrent miscarriages and a child with multiple congenital anomalies. A case report. *J Reprod Med.* 41(5):367-71
- Shaffer LG, Kashork CD, Bacino CA, Benke PJ (1999) Caution: telomere crossing. *Am J Med Genet.* 87(3):278-80
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG (1997) Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet.* 61(3):642-50

- Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC (2001) Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet.* 9(7):527-32
- Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RH, Flint J, Donnai D, Biesecker L (1999) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet.* 36(5):405-11
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 12(4):368-75
- Uhrig S, Bolzer A, Cleve B, Speicher MR (1997) Einsatz von Vielfarben-FISH Techniken in der klinischen Diagnostik. *Med. Genetik* 9, 563-569
- van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM (2002) Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet.* 39(8):546-53
- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG (2002) High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 70(5):1269-76
- Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, De Moor B, Van Hummelen P, Marynen P, Fryns JP, Devriendt K (2005) Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem.* 53(3):413-22
- Viot G, Gosset P, Fert S, Prieur M, Turleau C, Raoul O, De Blois MC, Lyonnet S, Munnich A, Vekemans M (1998) Cryptic subtelomeric rearrangements detected by FISH in mentally retarded and dysmorphic patients. *Am J Hum Genet.* 63 (suppl): A10
- Vorsanova SG, Koloti D, Sharonin VO, Soloviev V, Yurov YB (1998) FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am J Hum Genet. Suppl* 65: A154
- Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska M, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V, Bartsch O (2004) Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet A.* 128(4):364-73
- Wargowski D, Sekhon G, Laxvova R, Thompson K, Kent C (1991) Terminal deletions of band 1p36: emergence of two overlapping phenotypes. *Am J Hum Genet.* 49:278

- Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999) Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol.* 52(5):243-51
- Wenger SL, Steele MW, Becker DJ (1988) Clinical consequences of deletion 1p35. *J Med Genet.* 25(4):263
- Wexler P, Gilfillan T, McGavran L, Sujansky E (1991) Deletions (1)(p36.3) and the potential role of high resolution chromosome analysis. *Am J Hum Genet.* 49:278
- White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, Bakker B, van Ommen GJ, Breuning MH, den Dunnen JT (2002) Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet.* 71(2):365-74
- Wieczorek D, Holtvogt J, Thonig S, Gillessen-Kaesbach G (1998) A female patient with partial duplication 22 (q13-->qter). *Clin Dysmorphol.* 7(4):289-94
- Wiegant J, Wiesmeijer CC, Hoovers JM, Schuurin E, d'Azzo A, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK (1993) Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet Cell Genet.* 63(1):73-6
- Wilkie AO, Higgs DR, Rack KA, Buckle VJ, Spurr NK, Fischel-Ghodsian N, Ceccherini I, Brown WR, Harris PC (1991) Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell.* 1991 64(3):595-606
- Wong AC, Ning Y, Flint J, Clark K, Dumanski JP, Ledbetter DH, McDermid HE (1997) Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *Am J Hum Genet.* 60(1):113-20
- Young RS, Weaver DD, Kukulich MK, Heerema NA, Palmer CG, Kawira EL, Bender HA (1984) Terminal and interstitial deletions of the long arm of chromosome 7: a review with five new cases. *Am J Med Genet.* 17(2):437-50
- Youngman S, Bates GP, Williams S, McClatchey AI, Baxendale S, Sedlacek Z, Altherr M, Wasmuth JJ, MacDonald ME, Gusella JF, et al (1992) The telomeric 60 kb of chromosome arm 4p is homologous to telomeric regions on 13p, 15p, 21p, and 22p. *Genomics.* 14(2):350-6
- Zollino M, Di Stefano C, Zampino G, Mastroiacovo P, Wright TJ, Sorge G, Selicorni A, Tenconi R, Zappala A, Battaglia A, Di Rocco M, Palka G, Pallotta R, Altherr MR, Neri G (2000) Genotype-phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet.* 94(3):254-61

## **8. Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich sowohl bei der Arbeit im Labor als auch während der Zeit der Auswertung und des Schreibens unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.D. Zang für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die humorvolle und angenehme Unterstützung während der gesamten Zeit der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Thomas Martin danke ich für die Geduld und nette Unterstützung während der gesamten Zeit der Arbeit und insbesondere für seine Hilfe während der Phase der Auswertung der Ergebnisse, sowie für die konstruktive Kritik bei der Korrektur der Entwürfe.

Bei Herrn Arno Freiler, Frau Sylvia Reichardt möchte ich mich für die Erledigung der Routinearbeiten im Zellkulturlabor herzlich bedanken.

Bei Herrn Dr. Georg Weber und Herrn Dr. Volker Jung möchte ich mich für die Hilfe bei Computerproblemen und moralischen „Durchhängern“ bedanken.

Dem ärztlichen Team der Pädiatrischen Klinik der Universitätsklinik des Saarlandes möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Behandlung der gemeinsamen kleinen Patienten und Patientinnen danken.

Den beiden besten Freundinnen, die ich mir auf dieser Welt nur vorstellen kann, Simone Storck und Andrea Peters, danke ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt und mich stets bedingungslos unterstützt haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung während meiner Studienzeit und für die wertschätzende, verlässliche und liebevolle Begleitung durch mein Leben bedanken.

Bei meinem zukünftigen Ehemann Karsten Gensheimer möchte ich mich für seine Liebe und seinen unerschütterlichen Optimismus bedanken, die mich aus so manch einem Tief geholt haben. Mit Dir zusammen kann ich alles schaffen....

---

# CURRICULUM VITAE

## MICHAELA BRAND

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Geburtsdatum: 07.09.1976  
 Geburtsort: Krefeld

### SCHULAUUSBILDUNG

---

1983-1987	Grundschule	Krefeld
1987-1996	Fichte-Gymnasium	Krefeld
Abschluß: Abitur		

### HOCHSCHULAUUSBILDUNG

---

Ab 1996	Medizinstudium	Uni des Saarlandes	Homburg/Saar
3/1999	Physikum		
3/2000	1. Staatsexamen		
3/2002	2. Staatsexamen		
4/2003	3. Staatsexamen		

#### Farmulaturen

8/2000	Chirurgie	Good Hope Hospital	Birmingham (GB)
9/2000	Pädiatrie	Good Hope Hospital	Birmingham (GB)
3/2001	Chirurgie	Praxis Dr. Geisbüsch	Neustadt/Wstr
8/2001	Orthopädie	Shriners Hospital	Tampa, FL (USA)

#### Praktisches Jahr 05/2002 - 03/2003

Psychiatrie	P.D. Dr. Heinz	Universitätsklinikum	Homburg/Saar
Innere	Prof. Dr. Köhler	Universitätsklinikum	Homburg/Saar
Chirurgie	Prof. Dr. Steudel	Universitätsklinikum	Homburg/Saar

---

## ÄRZTLICHE TÄTIGKEITEN

---

07/2003 bis 08/2004 Ärztin im Praktikum in der Neurologischen  
Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder **Trier**

Seit 09/2004 Assistenzärztin im Pfalzkllinikum für Psychiatrie:

09/2004 bis 08/2005 am Standort Pfalzkllinikum **Klingenmünster**

Seit 08/2005 am Standort Pfalzkllinikum **Kaiserslautern**

### Tagungsbeiträge im Zusammenhang mit der Dissertation:

#### Poster:

Brand, M; Zang, KD; Martin, T (2001) Screening for subtle chromosomal rearrangements of mentally retarded and dysmorphic children by Spectral Karyotyping and complete subtelomeric probe kit.  
3<sup>rd</sup> European Cytogenetics Conference, Paris July 2001

Martin, T; Oehl-Jaschkowitz, B; Reichardt, S; Brand, M; Zang, KD (2002) Subtelomerische Deletion 8p bei einem Kind mit fazialer Dysmorphie, Entwicklungsretardierung und Herzfehler. 1. Südwestdeutscher Syndromtag, Heidelberg Februar 2002

#### Vortrag:

Martin, T; Christmann, A; Reichardt, S; Brand, M; Oehl-Jaschkowitz, B; Zankl, M; Zang, KD (2002) Screening for subtle chromosomal rearrangements in 75 mentally retarded and dysmorphic children.  
14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Leipzig Oktober 2002