

**Detektion und Charakterisierung subtelomerischer  
Chromosomenaberrationen bei Patienten mit mentaler Retardierung  
unklarer Genese durch Multicolour-FISH**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Antje Carolin Ehrbrecht**

aus

Wesel

Bonn, 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referentin: Prof. Dr. G. Schwanitz

2. Referent: Prof. Dr. K. H. Scheidtmann

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik (Direktor: Prof. Dr. P. Propping) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

**Für meine Mutter**

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Allgemeine Grundlagen</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Mentale Retardierung</b>	<b>3</b>
2.1.1 Kryptische Chromosomenaberrationen bei mentaler Retardierung unklarer Genese	3
2.1.2 Subtelomerische Chromosomenaberrationen bei mentaler Retardierung unklarer Genese	4
2.1.3 Techniken zur Untersuchung der Subtelomerregionen	6
2.1.4 Ansatz zur Bestimmung von Kriterien zur Auswahl von MR- Patienten zum Subtelomer-Screening	7
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Analysiertes Zellsystem</b>	<b>14</b>
3.2.1 Chromosomendarstellung aus Lymphozyten	14
<b>3.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b>	<b>14</b>
3.3.1 Subtelomer-FISH	15
3.3.1.1 Kommerzielles Subtelomer-Sonden Set ( <i>ToTelVysion™</i> )	16
3.3.1.1.1 Subtelomer-Screening mittels <i>ToTelVysion™</i>	17
3.3.1.1.2 Enzymatische Vorbehandlung der Präparate	17
3.3.1.1.3 Hybridisierung	18

---

3.3.1.1.4	Stringenzwaschschritte	19
3.3.1.1.5	Gegenfärbung	19
3.3.1.1.6	Auswertung und Dokumentation	20
3.3.1.2	Eigenes Subtelomer-Sonden Set	21
3.3.1.2.1	Subtelomer-Combined Binary Ratio Labelling- (S-COBRA-) FISH	21
3.3.1.2.1.1	DNA-Isolierung aus BAC- und PAC-Klonen	23
3.3.1.2.1.2	DNA-Verdau mittels DNaseI	25
3.3.1.2.1.3	Markierung der Sonden-DNA	26
3.3.1.2.1.4	Fällung der markierten Sonden-DNA	29
3.3.1.2.1.5	Hybridisierung	29
3.3.1.2.1.5	Stringenzwaschungen, Nachweis und Gegenfärbung	30
3.3.1.2.1.6	Auswertung und Dokumentation	31
3.3.1.2.2	Untersuchung durch Subtelomer-Sechs-Farben-FISH	31
3.3.1.2.2.1	Markierung der Sonden-DNA und Durchführung der Sechs-Farben-FISH	33
3.3.2	Bruchpunktbestimmungen durch Zwei- und Drei-Farb-Hybridisierungen	35
3.3.2.1	Prinzip der Bruchpunktbestimmungen	35
3.3.2.2	Durchführung der Bruchpunktbestimmungen	36
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>37</b>
3.5.1	Chemikalien und Lösungen	37
3.5.2	Geräte	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Analysen des konsekutiven Untersuchungskollektivs</b>	<b>42</b>
4.1.1	Alter, Geschlecht, psychomotorische Entwicklung und Anfallsleiden	42
4.1.2	Wachstumsparameter	43
4.1.3	Auffälligkeiten in den Familien	45
4.1.4	Geburts- und Schwangerschaftsanamnese	46
4.1.5	Kongenitale Fehlbildungen und Dysmorphien	47
4.1.6	Anwendung der „Checkliste“-Kriterien auf das konsekutive	48

---

	Untersuchungskollektiv	
<b>4.2</b>	<b>Einordnung der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierungen</b>	<b>51</b>
4.3.1	Ergebnisse der Analysen der subtelomerischen Chromosomenregionen im konsekutiven Untersuchungskollektiv	51
4.3.2	FISH-Untersuchungen der Eltern von Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen	57
4.3.3	Phänotypische Charakterisierung der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen	58
4.3.4	Ergebnisse der Analysen der subtelomerischen Chromosomenregionen der nicht-konsekutiven Patienten	66
4.3.4.1	Phänotypische Charakterisierung von Patient 78	69
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der Subtelomeraberrationen durch FISH</b>	<b>69</b>
4.4.1	Prinzip der Charakterisierung von Deletionen durch FISH	70
4.4.2	Prinzip der Charakterisierung von unbalancierten Translokationen durch FISH	71
4.4.3	Bruchpunktbestimmungen bei den Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen	73
4.4.3.1	Bruchpunktbestimmung bei Patient 29	73
4.4.3.2	Bruchpunktbestimmungen bei Patient 34	74
4.4.3.3	Bruchpunktbestimmung bei Patient 35	77
4.4.3.4	Bruchpunktbestimmungen bei Patient 37	79
4.4.3.5	Bruchpunktbestimmung bei Patient 75	81
4.4.3.6	Bruchpunktbestimmungen bei Patient 78	82
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassende Darstellung der Subtelomeraberrationen</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>Subtelomerische Chromosomenaberrationen im konsekutiven Untersuchungskollektiv</b>	<b>91</b>
<b>5.2</b>	<b>Subtelomeraberrationen und korrespondierende Phänotypen</b>	<b>98</b>

---

	<b>im Detail</b>	
5.2.1	Einzelfalldarstellungen zur Karyotyp-Phänotyp Korrelation	99
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
2.1	Aufbau der Chromosomenenden	5
3.1	Markierungsschemata der S-COBRA-FISH	22
3.2	Schematische Darstellung der Subtelomer-Sechs-Farben-FISH	32
3.3	Schema der Bruchpunktbestimmung	36
3.4	Schema der Bruchpunktbestimmung (Abschluss)	36
4.1	Prozentuale Verteilung der aktuellen Körpermaße im konsekutiven Untersuchungskollektiv	44
4.2	Prozentuale Verteilung der Mikro-, Makro- und Normozephalien im konsekutiven Untersuchungskollektiv	45
4.3	Prozentuale Verteilung der familiären und nicht-familiären MR-Fälle im konsekutiven Untersuchungskollektiv	46
4.4	Prozentuale Verteilung der Dysmorphien und Fehlbildungen im konsekutiven Untersuchungskollektiv	47
4.5	Prozentuale Verteilung der Punkte nach de Vries im konsekutiven Untersuchungskollektiv	49
4.6	Deletion in Yqter nach Sechs-Farben-FISH, Hybridisierung F bei Patient 27	53
4.7	Deletion 14qter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #7 bei Patient 29	54
4.8a	Deletion 2qter nach Sechs-Farben-FISH, Hybridisierung B bei Patient 34	54
4.8b	Duplikation 5pter nach Sechs-Farben-FISH; Hybridisierung A bei Patient 34	55
4.9	Deletion 2qter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #2 bei Patient 35	55
4.10a	Deletion 22qter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #3 bei Patient 37	56
4.10b	Duplikation 7qter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #7 bei Patient 37	56
4.11	Deletion 16pter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #13 bei Patient 75	57
4.12	Prozentuale Verteilung der MR-Schweregrade und Anfallsleiden bei Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenaberrationen	59
4.13	Prozentuale Verteilung der Wachstumsparameter bei Patienten mit und ohne subtelomerischen Chromosomenaberrationen	61
4.14	Prozentuale Verteilung der familiären MR und pathologischen Schwangerschaften der Mütter der Patienten mit und ohne	62



---

	subtelomerische Chromosomenaberrationen	
4.15	Prozentuale Verteilung der Kombinationen aus Dysmorphien und Fehlbildungen bei Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenaberrationen	63
4.16a	Deletion 11qter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #11	67
4.16b	Duplikation 16qter nach <i>ToTelVysion</i> -Hybridisierung mit #13	67
4.17	Stammbaum der Familie von Patient 78	68
4.18	Schema der Bruchpunktbestimmung bei Deletionen mit nicht-überlappenden Klonen	70
4.19	Schema der Bruchpunktbestimmung bei Deletionen mit überlappenden Klonen	71
4.20	Schema der Bruchpunktbestimmung bei Duplikationen mit nicht-überlappenden Klonen	72
4.21	Ergebnisse der FISH zur Bruchpunktbestimmung bei Patient 29	74
4.22a	Ergebnisse der FISH zur Bruchpunktbestimmungen der Deletion in 2qter bei Patient 34	76
4.22b	Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation in 5pter bei Patient 34	77
4.23	Ergebnisse der FISH zur Bruchpunktbestimmung bei Patient 35	78
4.24a	Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation 7qter bei Patient 37	80
4.24b	Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Deletion auf 22qter bei Patient 37	81
4.25	Prinzip der Bruchpunktbestimmungen beim balancierten Translokationsträger	84
4.26a	Bruchpunktbestimmungen der Deletion auf Chromosom 11 beim balancierten Translokationsträger	85
4.26b	Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation auf Chromosom 16 bei Patient 78	87

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
2.1	„Checkliste“ zur Untersuchung von MR-Patienten auf kryptische subtelomerische Chromosomenaberrationen	9
3.1	Untersuchungskollektiv in der Übersicht	12
3.2a	Markierungsschema der S-COBRA-FISH, Hybridisierung A	27
3.2b	Markierungsschema der S-COBRA-FISH, Hybridisierung B	28
3.3	Schematische Darstellung der Fluorochromanteile an der Sondenmarkierung der Sechs-Farben-FISH	32
3.4	Euchromatische Sonden zur Identifizierung der akrozentrischen Chromosomen	33
3.5	Markierungsschemata zur Herstellung der 7 Hybridisierungsmixe der Sechs-Farben-FISH	33
4.1	Einordnung der MR-Patienten in Gruppen	43
4.2	Häufigkeiten der einzelnen Fehlbildungen und Dysmorphien im konsekutiven Untersuchungskollektiv	48
4.3	Häufigkeiten der Punkte nach de Vries im konsekutiven Untersuchungskollektiv	49
4.4	Wachstumsparameter der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten	50
4.5	Dysmorphien und Fehlbildungen bei den nicht-konsekutiv untersuchten Patienten	51
4.6	Anzahl der mit der jeweiligen Untersuchungsmethode analysierten Patienten und Anzahl der detektierten Subtelomeraberrationen	52
4.7	Beschreibung der subtelomerischen Chromosomenaberrationen im konsekutiven Untersuchungskollektiv	52
4.8	Art der subtelomerischen Chromosomenstörung, Geschlecht, MR-Schweregrad, motorische Entwicklung und Anfallsleiden der Patienten mit Subtelomeraberrationen	58
4.9	MR-Schweregrad und Anfallsleiden der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen	58
4.10	Wachstumsparameter der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen	59
4.11	Wachstumsparameter der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen	60
4.12	Familiäre MR und pathologische SS der Mütter der MR-Patienten mit	61

---

	subtelomerischen Chromosomenaberrationen	
4.13	Familiäre MR und pathologische Schwangerschaften der Mütter der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen	61
4.14	Einordnung der Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen in Kategorien aus Dysmorphien und Fehlbildungen	62
4.15	Kategorien aus Fehlbildungen und Dysmorphien der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen	63
4.16	Übersicht über die Fehlbildungen und Dysmorphien bei Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen	64
4.17	Verteilung der Fehlbildungen und Dysmorphien der Patienten mit und ohne Subtelomeraberrationen	64
4.18	Verteilung der Punkte nach de Vries et al. (2001) für die Patienten mit subtelomerischen Chromosomenstörungen	65
4.19	Beschreibung der subtelomerischen Chromosomenaberrationen der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten	66
4.20	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis bei Patient 29	73
4.21	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 2 bei Patient 34	75
4.22	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 5 bei Patient 34	76
4.23	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis bei Patient 35	78
4.24	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 7 bei Patient 37	79
4.25	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 22 bei Patient 37	80
4.26	Verwendete Sonden mit Distanz zum Telomer und Hybridisierungsergebnis bei Patient 75	82
4.27	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 11 bei Patient 78	83
4.28	Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 16 bei Patient 78	85
4.29	Zusammenfassung der subtelomerischen Chromosomenaberrationen der konsekutiv und nicht-konsekutiv untersuchten MR-Patienten	87

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol
DG	Deckglas
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FraX	Fragiles X-Syndrom
GG	Geburtsgewicht
GS	Gaumenspalte
GTG	G-Banden nach Trypsin durch Giemsa
h	Stunden
k. A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaare
KU	Kopfumfang
LKG-Spalte	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte
m	männlich
M	Molar
Mb	Megabasenpaare
mm	Millimeter
min	Minuten
mind.	mindestens
mg/µg/ng	Milli-/Mikro-/Nanogramm
ml/µl/nl	Milli-/Mikro-/Nanoliter
MR	mentale Retardierung
OT	Objektträger
o. B.	ohne Befund
PAC	P1 Artificial Chromosome
r	Ringchromosom
RT	Raumtemperatur
RBA	Reverse Banden nach BrdU und AcridinOrange
RT	Raumtemperatur
S-COBRA FISH	Subtelomer- Combined Binary Ratio Labelling FISH
sek	Sekunden
SS	Schwangerschaft
QFQ	Q-Banden mit Fluoreszenz durch Quinacrin mustard
ÜN	über Nacht
ULS	Universal Linkage System
U/min (engl.: rpm)	Umdrehungen pro Minute
w	weiblich
#	Hybridisierungsmix (ToTelVysion™)

## 1. Einleitung

Mentale Retardierung (MR) betrifft etwa 3% der Bevölkerung, wobei die leichte Form der mentalen Retardierung (IQ 50-70) mit einer Prävalenz von deutlich über 2% häufiger auftritt als die mittlere bis schwere Form (IQ <50) (Butler et al., 1999). Als häufigste Ursache werden Chromosomenanomalien angegeben (4-28%), daneben spielen zahlreiche endo- und exogene Faktoren eine Rolle. In etwa 40-60% der Fälle bleibt die mentale Retardierung jedoch unklarer Genese. In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung so genannter kryptischer, also unter dem Auflösungsvermögen konventionell zytogenetischer Untersuchungsverfahren (3-10Mb) liegender Chromosomenaberrationen bei der Entstehung von mentaler Retardierung aufgeklärt. Als bekannteste Beispiele interstitieller kryptischer Chromosomenstörungen sind die Mikrodeletionssyndrome zu nennen (z. B. DiGeorge-Syndrom; Deletion in 22q11.2). Eine besonders viel versprechende Kandidatenregion für die Suche nach gehäuften kryptischen Aberrationen bei Patienten mit mentaler Retardierung stellen die Subtelomerregionen dar (Knight et al., 1999). Zum einen weisen die distalen Subtelomerregionen nichthomologer Chromosomen Sequenzhomologien auf (Knight und Flint, 2000), die in meiotischen Fehlpaarungen resultieren können, zum anderen ist die Rekombinationsfrequenz an den Chromosomenenden erhöht (Laurie und Hultén, 1985; Blouin et al., 1995). Das Zusammenspiel dieser beiden Faktoren bedingt eine Erhöhung der Aberrationsfrequenz. Darüber hinaus werden die Subtelomerbereiche als genreichste Regionen des menschlichen Genoms angenommen (Saccone et al., 1992). Die Kombination aus erhöhter Aberrationsfrequenz und hoher Gendichte impliziert eine Beteiligung subtelomerischer Chromosomenaberrationen an zahlreichen genetisch bedingten Störungen, deren Ursachen bislang unklar waren. Für überaus komplexe Organe, wie das menschliche Gehirn, in dem etwa ein Drittel aller bekannten mRNAs exprimiert werden, dürften Subtelomerstörungen demnach besonders häufig Konsequenzen haben.

Erste Untersuchungen an MR-Kollektiven bestätigten die Beteiligung subtelomerischer Chromosomenstörungen an der Entstehung von mentaler Retardierung (Flint et al., 1995; Knight et al., 1999). Mittlerweile reichen die Angaben zur Prävalenz von Subtelomeraberrationen bei Patienten mit mentaler Retardierung von 0% bis 29,4% (Xu und Chen, 2003; de Vries et al., 2003). Die Untersuchung aller relevanten Subtelomerregionen bei einem Patienten bedeutet die aufwendige Analyse von 43 genomischen Loci. Dementsprechend wurden zahlreiche Methoden, sowohl molekulargenetische, wie *Mikrosatelliten-Analyse* oder *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)*, als auch molekularzytogenetische, wie *Comparative Genomic Hybridization (CGH)* und *Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)*, zum so genannten *Subtelomer-Screening* erprobt. Seit der Veröffentlichung und Kommerzi-

alisierung des so genannten *Second Generation Probe Panel* (Knight et al., 2000) wird die FISH als effiziente und zuverlässige molekularzytogenetische Methode am häufigsten angewandt.

In Anbetracht des hohen Zeit- und Kostenaufwands der Untersuchungsverfahren wurden erste Ansätze zur Vorselektion von MR-Patienten, für die ein Subtelomer-Screening für sinnvoll erachtet wurde, anhand klinischer Merkmale postuliert. So veröffentlichten de Vries et al. (2001) eine so genannte „Checkliste“, in der nach einem Punktesystem definierte klinische Parameter wie prä- und postnatale Wachstumsretardierung oder Dismorphien und bestimmte Fehlbildungen bewertet werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von 82 Patienten mit mentaler Retardierung unklarer Genese auf das Vorliegen kryptischer subtelomerischer Chromosomenaberrationen durch FISH. Es folgte deren exakte Charakterisierung durch Bruchpunktbestimmungen mittels FISH. Schließlich wurde eine phänotypische Zuordnung der ermittelten Träger subtelomerischer Störungen in publizierte klinische Spektren als Basis für die Einengung von Kandidatenregionen durchgeführt.

In Anbetracht der Komplexität dieser Untersuchungen sollte eine Möglichkeit zur Vorselektion der MR-Patienten zum Subtelomer-Screening überprüft werden. Dazu wurde eine bereits veröffentlichte Auswahl klinischer Einschlusskriterien auf das eigene Kollektiv angewandt und Vor- und Nachteile der gewählten Faktoren aufgezeigt.

## 2. Allgemeine Grundlagen

### 2.1 Mentale Retardierung

Mentale Retardierung (MR) wird definiert als signifikante Einschränkung der kognitiven und adaptiven Funktionen, die sich vor dem 18. Lebensjahr manifestiert (Battaglia et al., 2003).

Bei ungefähr 3% der Bevölkerung ist eine mentale Retardierung diagnostizierbar. Im deutschen Sprachraum unterscheidet man die mittlere bis schwere (IQ<50) von der leichten Form (IQ 50-70). Letztere tritt mit einem Anteil von weit über 2% recht häufig auf (Butler et al., 1993). Bei Fällen mit schwerer mentaler Retardierung, die mit einer Prävalenz von 0,3% bis 0,4% deutlich seltener auftreten, werden gehäuft kongenitale Fehlbildungen und Dismorphien beobachtet (Bodensteiner und Schäfer, 1995; Curry et al., 1997).

Die Ursachen für mentale Retardierung aller Schweregrade sind vielfältig. Neben den häufigen Chromosomenanomalien (4-28%) sind dies eine Reihe endogener und exogener Faktoren. Dazu zählen Mentale Retardierung/Fehlbildungs- (MR/MCA-, **Mental Retardation/ Multiple Congenital Anomalies-**) Syndrome bekannter Genese (3-7%) und monogene Erkrankungen (3-9%). Auch strukturelle Anomalien des zentralen Nervensystems (7-17%), Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen (2-10%), Umwelt- und Teratogeneinwirkungen (5-13%), "kulturell-familiäre" Faktoren (3-12%), unklassifizierte Syndrome (1-5%) und endokrine bzw. metabolische Ursachen (1-5%) sind an der Entstehung von mentaler Retardierung ursächlich beteiligt.

Bei etwa 40-60% der Betroffenen mit mentaler Retardierung aller Schweregrade kann bisher keine Ursache ermittelt werden. Dabei gelingt die Diagnosestellung bei den schweren Formen häufiger (in bis zu 70% der Fälle) als bei leichter mentaler Retardierung (in 35-55% der Fälle), welche in genetischer Hinsicht eher als multifaktoriell bedingt aufzufassen ist (Propping et al., 1989). Unter den Ursachen der schweren mentalen Retardierung sind Chromosomenaberrationen mit 24% besonders häufig, während diese nur 4-8% der Fälle mit leichter Retardierung verursachen.

#### 2.1.1 Kryptische Chromosomenaberrationen bei mentaler Retardierung unklarer Genese

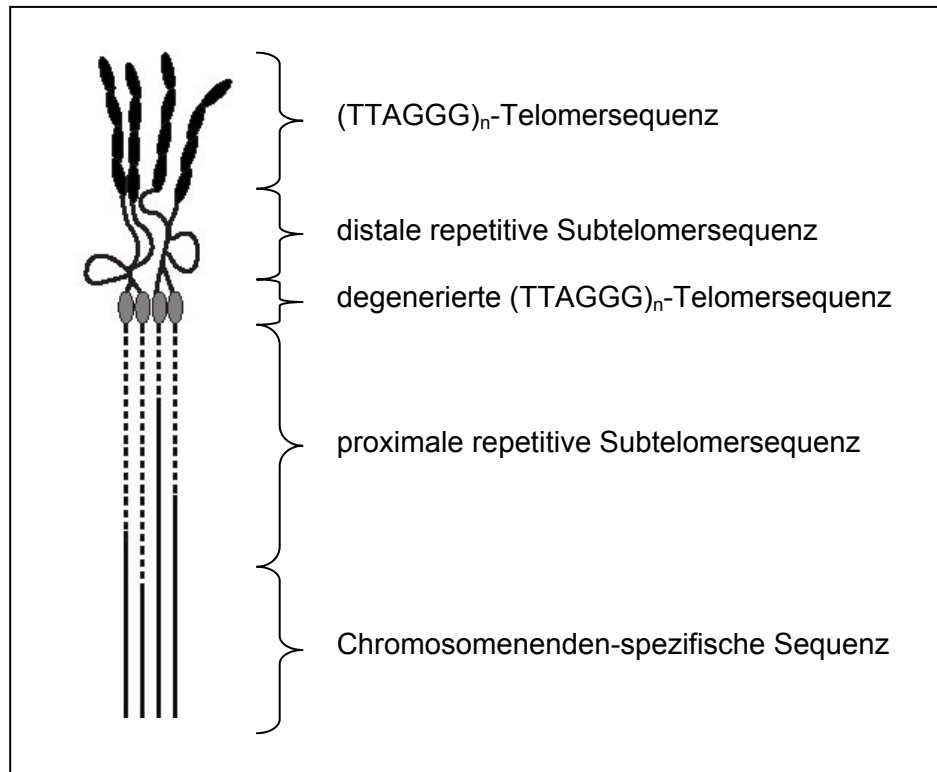
In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung einer weiteren Klasse genetischer Ursachen bei mentaler Retardierung klar, die so genannten kryptischen Chromosomenaberrationen. Eine chromosomale Störung ist dann als kryptisch zu bezeichnen, wenn sie unter dem Auflösungsvermögen konventionell zytogenetischer Bänderungstechniken, also unter einer Größe von 3-10 Megabasen (Mb), liegt.

Bekannte Beispiele für interstitielle kryptische Chromosomenaberrationen sind Mikrodeletionssyndrome wie das DiGeorge-/Velokardiofaziale Syndrom (Deletion in der Sub-Bande 22q11.2) oder das Williams-Beuren-Syndrom (Deletion in der Sub-Bande 7q11.23). Die ursächlichen Deletionen sind nur wenige Mb groß und werden durch gezielte molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden, wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Durch die Anwendung dieser Methoden hat sich die Diagnostik bei Betroffenen mit mentaler Retardierung grundlegend gewandelt. Vor der routinemäßigen Anwendung der FISH war beispielsweise die konventionell nachweisbare Deletion des kurzen Armes von Chromosom 5, die das Cri du chat-Syndrom verursacht, mit 1/50.000 Lebendgeburten die am häufigsten nachgewiesene strukturelle Chromosomenaberration. Heutzutage wird für nur eine der durch FISH diagnostizierbaren Mikrodeletionen, die das DiGeorge-Syndrom verursacht, eine Häufigkeit von mindestens 1/4.000 Lebendgeburten angenommen (Burn und Goodship, 1996). Kryptische Chromosomenaberrationen stellen somit eine häufige Form der Chromosomenmutation dar. Ein aktuelles Beispiel für die Entdeckung immer neuer Mikrodeletionen mit klinischer Relevanz ist die das NSD1-Gen umfassende Mikrodeletion in der Chromosomenbande 5q35, die eine Ursache des Sotos-Syndroms ist (Kurotaki et al. 2002). Bisher wurden solche Deletionen mehr oder weniger zufällig entdeckt. Im Falle des Sotos-Syndroms war z. B. eine balancierte Translokation bei einem Patienten der entscheidende Hinweis auf die verantwortliche Chromosomenregion. Im Zusammenhang mit mentaler Retardierung gelten die subtelomerischen Chromosomenregionen als besonders viel versprechende Kandidatenregionen für die Suche nach Bereichen gehäufte kryptischer Aberrationen (Knight et al., 1999).

### **2.1.2 Subtelomerische Chromosomenaberrationen bei mentaler Retardierung unklarer Genese**

Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Aufbau der menschlichen Chromosomenenden. Die subtelomerischen Chromosomenregionen sind proximal im Anschluss an die repetitiven Telomer-Sequenzen lokalisiert. Sie setzen sich zusammen aus einem distalen Bereich, der komplexe Familien repetitiver DNA enthält und Homologien zu zahlreichen Chromosomenenden aufweist. Er geht proximal, über einen weiteren repetitiven Bereich, in die nicht repetitiven, Chromosomenenden-spezifischen Sequenzen über. Im Grenzbereich zwischen der distalen und proximalen Region werden degenerierte Telomer-Sequenzen vermutet (Knight und Flint, 2000).





**Abbildung 2.1:** Aufbau der Chromosomenenden (nach Knight und Flint, 2000).

Die meiotische Homologenpaarung beginnt an den Chromosomenenden (Barlow und Hultén, 1996; Scherthan et al., 1996). Wie bereits erwähnt, weisen die distalen Subtelomerbereiche nichthomologer Chromosomen Sequenzhomologien auf. Fehlpaarungen während der Meiose werden daher begünstigt. Darüber hinaus ist die Rekombinationsfrequenz an den Chromosomenenden erhöht (Laurie und Hultén, 1985; Blouin et al., 1995). Die Kombination aus erhöhter Rekombinationsfrequenz und erhöhter Wahrscheinlichkeit für meiotische Fehlpaarungen bedingt eine Steigerung der Aberrationsfrequenz in den subtelomerischen Chromosomenbereichen. Die subtelomerischen Chromosomenregionen weisen außerdem einen überproportional hohen Gehalt an GC-reichen H3-Isochoren auf und werden demzufolge als die genreichsten Bereiche des menschlichen Genoms angesehen (Saccone et al., 1992). Bei Aberrationen dieser Regionen ist daher mit deutlichen phänotypischen Konsequenzen zu rechnen. Die Faktoren **hohe Gendichte** und **erhöhte Aberrationsfrequenz** implizieren, dass subtelomerische Chromosomenaberrationen bei einer Vielzahl genetisch bedingter Störungen bislang unklarer Genese beteiligt sein könnten. Dies gilt besonders für überaus komplexe Organe wie das menschliche Gehirn, in dem etwa ein Drittel der bekannten mRNAs exprimiert werden. Subtelomerische Chromosomenaberrationen sollten demnach unter anderem häufig eine mentale Retardierung zur Folge haben. In ersten Studien wurde der Zusammenhang zwischen subtelomerischen Chromosomenstörungen und mentaler Retardierung unklarer Genese bestätigt. Im Jahr 1995 veröffentlichten Flint und Mitarbeiter die erste systematische Untersuchung eines größeren

Patientenkollektivs (99 MR-Patienten) auf kryptische subtelomerische Aberrationen und schätzten die Gesamthäufigkeit subtelomerischer Chromosomenstörungen bei Patienten mit idiopathischer mentaler Retardierung auf 7,4% (Flint et al., 1995). Dies wurde an einem größeren Kollektiv (insgesamt 466 Patienten) bestätigt, in dem bei 7,4% der Patienten mit schwerer und bei 0,5% der Patienten mit leichter mentaler Retardierung subtelomerische Chromosomenaberrationen aufgedeckt wurden (Knight et al., 1999). Die Veröffentlichung eines vollständigen, gut charakterisierten Sondensets zur Untersuchung aller Subtelomerregionen nur ein Jahr später („Second generation probe panel“, Knight et al., 2000) ermöglichte zuverlässigere Untersuchungen an den subtelomerischen Chromosomenregionen, und es wurden mehrere Studien veröffentlicht, in denen subtelomerische Chromosomenaberrationen bei Patienten mit mentaler Retardierung analysiert wurden.

Xu und Chen (2003) fassten 21 dieser Studien mit 2490 MR-Patienten zusammen. Die Angaben zur Prävalenz subtelomerischer Chromosomenaberrationen reichten dabei von 0% bis 29,4% mit einem Mittelwert von 4,6%. Als Ursachen für diese großen Unterschiede wurden uneinheitliche klinische Kriterien bei der Kollektivzusammenstellung, variierende Kollektivgrößen und unterschiedliche Untersuchungsmethoden mit unterschiedlicher Sensitivität und Auflösung angegeben.

Da die Untersuchung aller Subtelomere eines Patienten die differentielle Darstellung von 43 Chromosomenregionen (Subtelomerregionen der kurzen Arme (pter) und der langen Arme (qter) aller 23 Chromosomen, abzüglich der kurzen Arme (pter) der fünf akrozentrischen Chromosomen, die kein relevantes Euchromatin enthalten) erfordert, gewann die Entwicklung effizienter Untersuchungstechniken zunehmend an Bedeutung.

### 2.1.3 Techniken zur Untersuchung der Subtelomerregionen

Durch molekulargenetische Methoden wurden zunächst VNTR (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats) geeigneter Lokalisation untersucht (Flint et al., 1995), später wurde STRP-Typing (**S**ingle **T**andem **R**epeat **P**olymorphism) zum Subtelomer-Screening eingesetzt (Slavotinek et al., 1999). Die im Jahr 2000 von der Arbeitsgruppe um John Armour entwickelte, auf PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) basierende Technik der **M**ultiplex **A**mplifiable **P**robe **H**ybridisation (MAPH) wurde ebenfalls für Subtelomer-Analysen verwendet (Sismani et al., 2001). Zuletzt wurden die Techniken des Automatisierten Fluoreszenz-Genotyping (Rio et al., 2002) sowie einer Array-basierten CGH (Veltman et al., 2002) als geeignete Methoden zur Detektion subtelomerischer Chromosomenaberrationen beschrieben.

Die häufigste angewendete Methode zur Untersuchung subtelomerischer Chromosomenregionen, die **F**luoreszenz **i**n **s**itu **H**ybridisierung (FISH), ist im Gegensatz zu den oben beschriebenen Techniken in der Lage, auch balancierte Chromosomenaberrationen

nachzuweisen. Die meisten veröffentlichten Subtelomer-Studien wurden mit kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt, die 15 (ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel, Vysis) bis 23 Hybridisierungen (Chromoprobe Multiprobe T System, Cytocell) erfordern. Aufgrund der erforderlichen Menge an Untersuchungsmaterial sowie des zeitlichen und finanziellen Aufwands dieser kommerziellen Kits gewannen Multicolour-FISH-Ansätze immer mehr an Bedeutung und wurden ständig weiterentwickelt.

So entwickelten Fauth et al. (2001) eine effiziente Multicolour-FISH-Strategie, bei der zwei unterschiedliche SONDENSETS kombiniert wurden. Das erste Set bestand aus mikrodissezierten Sonden aus den Subtelomerregionen, die etwa 5-10 Mb groß waren. Diese wurden unter Verwendung von sieben Fluorochromen kombinatorisch markiert, wobei die p- und q-Arme eines Chromosoms jeweils dieselbe Farbe besaßen. In einer zweiten Hybridisierung wurden Sonden des „Second generation probe panel“ (Knight et al., 2000) in einer Zwei-Farb-Hybridisierung zur Differenzierung der p- und q-Arme aller meta- und submeta-zentrischen Chromosomen eingesetzt. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist, dass die Auflösung bei der Detektion unbalancierter Translokationen durch das erste SONDENSET determiniert wird. Diese liegt für solch komplexe Sonden bei kombinatorischer Markierung mit sieben Fluorochromen zwischen 320kb und 2,6Mb (Azofeifa et al., 2000).

Engels et al. entwickelten 2003 die Subtelomer-Combined Binary Ratio Labelling-FISH (S-COBRA-FISH). Diese Methode verwendete Sonden des „Second generation probe panel“ (Knight et al., 2000), um durch die Kombination aus *ratio*- und binärer Markierung in nur zwei Hybridisierungen alle 43 relevanten Subtelomerregionen differentiell darzustellen. Das Prinzip der S-COBRA-FISH wird unter 3.3.1.2.1 näher erläutert werden. Die Auflösung dieser Methode ist einzig begrenzt durch die Lokalisation der Sonden, die durchschnittlich 230kb vom Telomer entfernt liegen (Knight et al., 2000) und liegt somit höher als die der o. g. Methode von Fauth et al. (2001).

In Anbetracht der Komplexität der Untersuchungsmethoden sowie der hohen Kosten wurde parallel versucht, vor dem Subtelomer-Screening bei Patienten mit MR eine phänotypische Vorauswahl zu treffen und so die Zahl der zu untersuchenden Patienten zu verringern.

#### **2.1.4 Ansatz zur Bestimmung von Kriterien zur Auswahl von MR-Patienten zum Subtelomer-Screening**

Knight et al. (1999) fanden in ihrer Studie bei Patienten mit leichter mentaler Retardierung in 0,5% der Fälle subtelomerische Chromosomenaberrationen, bei Patienten mit schwerer mentaler Retardierung waren es 7,4%. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Häufigkeit subtelomerischer Chromosomenaberrationen bei Patienten mit schwerer im Vergleich zu Patienten mit leichter mentaler Retardierung erhöht ist.

De Vries et al. veröffentlichten im Jahr 2001 eine Studie, in der sie phänotypische Merkmale und familiäre Risikofaktoren bei 110 Patienten mit mentaler Retardierung ohne subtelomere Chromosomenaberrationen und bei 29 MR-Patienten mit nachgewiesener subtelomere Störung gegenüberstellten (vgl. Tabelle 2.1). Ziel ihrer Untersuchungen war die Ermittlung klinischer Auswahlkriterien zum Subtelomer-Screening durch statistische Analyse von Merkmalen, die in den beiden Gruppen variierten. Sie erstellten eine so genannte „Checkliste“, in der bestimmten Merkmalen Punkte zugeordnet wurden, die als Bewertung zum Subtelomer-Screening dienen sollten (vgl. Tabelle 2.1). So verglichen sie zunächst die Prävalenz familiärer mentaler Retardierung in der Gruppe der Patienten ohne subtelomere Chromosomenstörungen mit der in der Gruppe der Patienten mit Subtelomeraberrationen. Eine positive Familiengeschichte war in der Gruppe der Träger subtelomere Chromosomenaberrationen mehr als dreimal so hoch wie in der Gruppe der MR-Patienten ohne eine solche Störung. Der Parameter „Familiarität der mentaler Retardierung“ wurde in der „Checkliste“ berücksichtigt und erbrachte bei familiärer mentaler Retardierung, die mit den Mendelschen Regeln in Einklang gebracht werden konnte, einen und bei nicht-mendelnder mentaler Retardierung zwei Punkte. In diesem Zusammenhang wurden auch pathologische Schwangerschaften in den Familien der MR-Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen untersucht. Da jedoch nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Parameter nicht in der „Checkliste“ etabliert. Der Vergleich der Geburtsgewichte der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen zeigte einen stark signifikanten Unterschied auf, denn mehr als vier mal so viele Patienten mit Subtelomeraberration waren bei Geburt dystroph, verglichen mit Patienten ohne Störung der Subtelomerregionen. Pränatale Wachstumsretardierung wurde demnach in der „Checkliste“ berücksichtigt und mit zwei Punkten bewertet. Bezüglich der postnatalen Wachstumsanomalien wurden Mikro- und Makrozephalie sowie Minder- und Hochwuchs in die „Checkliste“ übernommen und mit je einem Punkt bewertet, obwohl keiner dieser Parameter statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen aufwies. Zur Untersuchung fazialer Dysmorphien wurden nur solche vergleichend betrachtet, die in der Gruppe der Probanden mit subtelomere Chromosomenaberrationen mit einer Häufigkeit von über 10% beobachtet wurden. Dazu zählten ein asymmetrisches Gesicht, Hypertelorismus, ansteigende Lidachsen, Auffälligkeiten der Ohren, der Nase und des Auges. In der „Checkliste“ berücksichtigt wurden, trotz der fehlenden Signifikanz beim Vergleich aller fazialen Dysmorphien, Hypertelorismus, Ohranomalien und Auffälligkeiten der Nase. Zur Vergabe von Punkten mussten mindestens zwei Dysmorphien vorliegen (ein Punkt), weitere Dysmorphien wurden mit einem weiteren Punkt bewertet. Die nicht-fazialen Dysmorphien und kongenitalen Anomalien, die untersucht wurden, mussten bei mindestens 10% der

Träger subtelomerischer Chromosomenstörungen vorhanden sein. Gehirn- und Nierenfehlbildungen wurden nicht statistisch analysiert, da bezüglich dieser Organe für zahlreiche Patienten keine Untersuchungsergebnisse vorlagen. Die untersuchten Auffälligkeiten waren: Haarauffälligkeiten, Handanomalien, Herzfehler, Hypospadie und Kryptorchismus. Obwohl auch hier für keines der Merkmale statistisch signifikante Unterschiede herausgearbeitet wurden, übernahmen de Vries et al. (2001) die Handanomalien, den Herzfehler und die Hypospadie in die „Checkliste“ und bewerteten die einzelnen Parameter mit je einem Punkt, wobei maximal zwei Punkte zu vergeben waren. Bei Vorliegen aller Parameter bei einem MR-Patienten wäre eine maximale Punktzahl von zehn zu erreichen. Anfallsleiden als zentralnervöse Störung, die gehäuft im Zusammenhang mit mentaler Retardierung beschrieben werden, wurden von de Vries et al. (2001) nicht statistisch analysiert.

<b>Merkmal</b>	<b>Punkte</b>
<b>Familiarität der MR</b>	
Familiäre MR, passend zu Mendelschem Erbgang	<b>1</b>
Familiäre MR, nicht passend zu Mendelschem Erbgang	<b>2</b>
<b>Pränatale Wachstumsretardierung</b>	<b>2</b>
<b>Postnatale Wachstumsretardierung</b> (max. 2 Punkte)	
Mikro-/ Makrozephalie	<b>1</b>
Minder-/ Hochwuchs	<b>1</b>
<b>Faziale Dysmorphien</b> (mindestens zwei Dysmorphien) (Hypertelorismus, Ohranomalien, Auffälligkeiten der Nase)	<b>2</b>
<b>Nicht-faziale Dysmorphien und kongenitale Fehlbildungen</b> (max. 2 Punkte)	
Handanomalien	<b>1</b>
Herzfehler	<b>1</b>
Hypospadie	<b>1</b>

**Tabelle 2.1:** „Checkliste“ zur Untersuchung von MR-Patienten auf kryptische subtelomerische Chromosomenaberrationen.

Die Anwendung der „Checkliste“-Kriterien auf ihr Kollektiv von Patienten mit und ohne Subtelomeraberrationen zeigte, dass bei allen Patienten mit Subtelomerstörung mindestens drei Punkte vergeben werden konnten. Die Wahl dieses Wertes als Schwelle hätte zu einem Ausschluss von rund 20% der MR-Patienten zum Subtelomer-Screening geführt, ohne einen Träger einer Subtelomerstörung zu verpassen und so die Effizienz der Untersuchungen deutlich erhöht. Ein Schwellenwert von vier Punkten hätte zur Ersparnis des Subtelomer-Screenings bei 35% der MR-Patienten geführt. Allerdings wären dann 11% der Patienten mit

subtelomerischer Chromosomenaberration ebenfalls nicht gescreent und demnach nicht nachgewiesen worden.

Die Autoren räumen ein, dass diese „Checkliste“ nicht endgültig sein kann, und dass größere prospektive Studien nötig seien, um die Eignung einer solchen Vorselektion zu überprüfen. Da es aber keine weiteren konkreten Ansätze für eine klinische Vorselektion gibt, sollte die „Checkliste“ solange hilfreich sein, bis effizientere und kostengünstigere Screening-Verfahren zur Verfügung stehen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv

Das Bonner Kollektiv von Patienten mit mentaler Retardierung umfasste am 31.10.2003 205 Probanden. Bei allen Patienten wurde nach Untersuchung durch Fachärzte für Humangenetik oder Kinderärzte eine mentale Retardierung diagnostiziert. Der Grad der mentalen Retardierung reichte von milden bis hin zu mittleren bis schweren Formen. Ein Großteil der Patienten wies zusätzlich kraniofaziale Dysmorphien oder Fehlbildungen oder Kombinationen aus beiden auf. Es wurden sowohl Fälle aus Familien mit mehr als einem Betroffenen als auch isoliert auftretende Fälle erfasst. Obligatorisch ausgeschlossen wurden Patienten mit bekannten Ursachen für mentale Retardierung, wie:

- auffälliger Chromosomenbefund
- Schwangerschafts- und geburtsanamnestische Komplikationen (inklusive teratogener Noxen)
- Stoffwechselerkrankungen
- Postnatale Schäden bzw. Noxen (Verletzungen, Infektionen etc.)
- Vorliegen eines erkennbaren Syndroms mit bekannten Ursachen (z. B. Prader-Willi-Syndrom, Angelman-Syndrom, etc.)

Für alle Patienten lagen normale Chromosomenbefunde mit einer Auflösung von mindestens 400 Banden pro haploidem Genom vor. Alle Patienten des Kollektivs wurden im Rahmen einer genetischen Beratung von klinischen Genetikern untersucht. Neben anamnestischen Daten wurde das äußere Erscheinungsbild der Patienten erfasst und dokumentiert. Folgende Kriterien wurden berücksichtigt:

Anamnese	- Schwangerschaft - Geburt - psychomotorische Entwicklung
Erhebung des körperlichen Status	- Körpergröße, Gewicht, Kopfumfang - kraniofaziale Dysmorphien

Angaben zu Skelettdeformitäten, internistischen Problemen sowie dem neurologischen Status wurden weitestgehend den fachärztlichen Befunden entnommen.

Fotografisch dokumentiert wurden der Habitus, das Gesicht *en face* und beide Profile, sowie ggf. Hände und Füße.

Von den 205 MR-Patienten wurden 76 konsekutiv untersucht, d. h. die Probanden wurden in der Reihenfolge analysiert, in der sie ins Kollektiv aufgenommen wurden. Patienten wurden

im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, wenn das Untersuchungsmaterial, also die Lymphozytenpräparationen, von unzureichender Qualität waren. Darüber hinaus wurden sechs weitere Patienten unabhängig von der konsekutiven Reihenfolge analysiert. Die Gründe für die Untersuchung dieser Patienten waren eine sehr gute Sedimentqualität zur Etablierung der Untersuchungsmethoden (Patienten 79, 80, 81), eine weitere Schwangerschaft der Mutter (Patient 78) sowie Anfragen von Fachärzten für Humangenetik aus anderen Humangenetischen Instituten (Patienten 77 und 82). Tabelle 3.1 zeigt das Untersuchungskollektiv in der Übersicht. Dargestellt ist das Geschlecht der Patienten (m=männlich, w=weiblich), das Alter, der Karyotyp, das Ergebnis der molekulargenetischen FraX (Fragiles X-Syndrom) -Diagnostik (falls vorhanden) und ggf. Ergebnisse der molekularzytogenetischen Zusatzdiagnostik.

Patient	m/w	Alter (J)	Chromosomenanalyse		FraX	Mikrodeletions-Analysen
			Bänderung	Bandenzahl		
1	m	7	QFQ, RBA	400-500	o. B.	
2	m	8	QFQ	k. A.	o. B.	AS o. B.
3	m	9	QFQ	k. A.	o. B.	
4	w	10	QFQ, RBA	~450	o. B.	AS o. B.
5	m	10	QFQ, RBA	k. A.	o. B.	
6	w	9	QFQ	k. A.	o. B.	
7	w	7	QFQ	~450	o. B.	
8	w	14	GTG, RBA	450-500	k. A. <sup>o</sup>	SMS o. B.
9	m	7	extern o. B.*	k. A.	o. B.	AS o. B.
10	m	4	GTG, RBA	~450	o. B.	DGS o. B.
11	w	7	extern o. B.*	~450	o. B.	WBS + PWS o. B.
12	w	12	extern o. B.*	k. A.	o. B.	SMS o. B.
13	m	18	QFQ	k. A.	o. B.	
14	m	20	QFQ	k. A.	o. B.	
15	w	2	GTG, RBA	450-500	o. B.	DGS + WHS o. B.
16	m	9	GTG, RBA	400-500	o. B.	
17	m	10	GTG, QFQ	400-450	o. B.	
18	m	9	GTG, RBA	450-550	o. B.	
19	m	8	GTG, RBA	400-500	o. B.	
20	m	8	QFQ	450-500	o. B.	DGS o. B.
21	w	4	GTG, RBA	~450	o. B.	
22	m	10	QFQ, RBA	k. A.	o. B.	
23	m	13	GTG, RBA	450-500	o. B.	
24	w	15	extern o. B.*	k. A.	o. B.	
25	w	18	QFQ	k. A.	o. B.	
26	m	7	GTG, RBA	~400	o. B.	
27	m	8	QFQ, RBA	~400	o. B.	

**Tabelle 3.1:** Untersuchungskollektiv in der Übersicht. Die Patienten 1-76 wurden konsekutiv, die Patienten 77-82 nicht-konsekutiv analysiert.

\* Angaben zur Bänderung liegen nicht vor. <sup>o</sup> FraX-Syndrom klinisch unwahrscheinlich

AS = Angelman-Syndrom, DGS = DiGeorge-Syndrom, PWS = Prader-Willi-Syndrom, SMS = Smith-Magenis-Syndrom, WBS = Williams-Beuren-Syndrom, WHS = Wolf-Hirschhorn-Syndrom



Patient	m/w	Alter (J)	Chromosomenanalyse		FraX	Mikrodeletions-Analysen
			Bänderung	Bandenzahl		
28	m	5	GTG, RBA	~450	o. B.	
29	m	4	GTG, RBA	~400	o. B.	PWS o. B.
30	w	6	QFQ	350-400	k. A.°	
31	m	10	GTG, RBA	450-550	o. B.	
32	w	5	QFQ	~450	o. B.	
33	w	9	GTG, RBA	~450	o. B.	
34	m	6	GTG, RBA	400-500	o. B.	
35	w	6	GTG, RBA	~400	o. B.	PWS o. B.
36	w	37	GTG, RBA	400-500	o. B.	PWS + SMS o. B.
37	m	5	GTG, RBA	~450	o. B.	
38	m	4	GTG	500-550	o. B.	
39	m	9	GTG, RBA	~450	o. B.	
40	w	14	GTG	~450	o. B.	
41	w	21	GTG, RBA	450-500	o. B.	
42	m	11	GTG, RBA	~450	o. B.	
43	m	5	GTG, RBA	450-500	o. B.	
44	m	4	GTG, RBA	~450	k. A.°	
45	m	13	QFQ	k. A.	o. B.	
46	m	16	QFQ	k. A.	o. B.	
47	w	5	GTG, RBA	~400	k. A.°	AS + PWS o. B.
48	m	11	extern o. B.*	k. A.	o. B.	AS o. B.
49	w	11	extern o. B.*	k. A.	o. B.	
50	m	9	extern o. B.*	k. A.	o. B.	WBS o. B.
51	m	8	QFQ, RBA	k. A.	o. B.	
52	w	10	GTG, CBG	~450	k. A.°	
53	w	6	extern o. B.*	k. A.	k. A.°	
54	m	3	GTG, RBA	500-550	k. A.°	
55	m	13	GTG, QFQ	~500	o. B.	
56	m	4	QFQ, RBA	~400	k. A.°	
57	w	3	GTG	~400	o. B.	
58	w	4	GTG, RBA	~450	o. B.	WBS o. B.
59	m	9	extern o. B.*	k. A.	o. B.	AS o. B.
60	m	7	QFQ, RBA	~450	o. B.	
61	w	11	QFQ, GTG	k. A.	o. B.	
62	m	3	extern o. B.*	k. A.	o. B.	
63	w	6	extern o. B.*	k. A.	k. A.°	
64	m	4	extern o. B.*	k. A.	o. B.	
65	w	8	GTG, RBA	~450	o. B.	
66	m	4	GTG, RBA	450-500	o. B.	
67	m	5	QFQ	~400	o. B.	
68	w	3	GTG, RBA	~500	o. B.	
69	w	4	GTG, RBA	~450	o. B.	SMS + WHS o. B.
70	m	4	GTG, RBA	~450	o. B.	WBS + WHS o. B.
71	m	9	GTG, RBA	~450	o. B.	

**Tabelle 3.1, Fortsetzung:** Untersuchungskollektiv in der Übersicht. Die Patienten 1-76 wurden konsekutiv, die Patienten 77-82 nicht-konsekutiv analysiert.

\* Angaben zur Bänderung liegen nicht vor. ° FraX-Syndrom klinisch unwahrscheinlich

AS = Angelman-Syndrom, DGS = DiGeorge-Syndrom, PWS = Prader-Willi-Syndrom, SMS = Smith-Magenis-Syndrom, WBS = Williams-Beuren-Syndrom, WHS = Wolf-Hirschhorn-Syndrom

Patient	m/w	Alter (J)	Chromosomenanalyse		FraX	Mikrodeletions-Analysen
			Bänderung	Bandenzahl		
72	w	5	extern o. B.*	k. A.	k. A.°	
73	m	7	QFQ, RBA	~400	o. B.	
74	m	13	GTG, RBA	~500	o. B.	
75	w	8	GTG, RBA	~450	o. B.	
76	w	14	GTG, RBA	450-500	o. B.	
77	m	17	GTG, RBA	~450	o. B.	
78	m	6	GTG	400-450	o. B.	
79	m	7	GTG, QFQ	400-500	o. B.	SMS o. B.
80	w	14	QFQ, RBA	~450	o. B.	
81	w	5	extern o. B.*	k. A.	k. A.	
82	w	3	extern o. B.*	k. A.	k. A.	

**Tabelle 3.1, Fortsetzung:** Untersuchungskollektiv in der Übersicht. Die Patienten 1-76 wurden konsekutiv, die Patienten 77-82 nicht-konsekutiv analysiert.

\* Angaben zur Bänderung liegen nicht vor. ° FraX-Syndrom klinisch unwahrscheinlich

AS = Angelman-Syndrom, DGS = DiGeorge-Syndrom, PWS = Prader-Willi-Syndrom, SMS = Smith-Magenis-Syndrom, WBS = Williams-Beuren-Syndrom, WHS = Wolf-Hirschhorn-Syndrom

## 3.2 Analysiertes Zellsystem

In der vorliegenden Arbeit wurden zytogenetische und molekularzytogenetische Untersuchungen an präparierten Meta- und Interphasestadien von Zellen des peripheren Blutes der Patienten durchgeführt.

### 3.2.1 Chromosomendarstellung aus Lymphozyten

Lymphozyten als ausdifferenzierte Zellen teilen sich in der Regel im peripheren Blut nicht mehr. Werden sie aber in Kultur genommen und durch ein Mitogen stimuliert, verlassen die Lymphozyten ihren G<sub>0</sub>-Status und treten wieder in den Zellzyklus ein. In der vorliegenden Arbeit wurde Phytohämagglutinin (PHA) zur selektiven Transformation und klonalen Proliferation der T-Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet.

Die Kurzzeitkultivierung PHA-stimulierter Lymphozyten aus Vollblut erfolgte in den eigenen Versuchen über 72 Stunden in Gewebekulturflaschen bei 37°C im Brutschrank.

Zur Aufarbeitung und Präparation der Lymphozyten wurden in den eigenen Untersuchungen Standardverfahren verwendet (Wegener, R.-D.; 1999).

## 3.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Bei der *in situ* Hybridisierung (ISH) handelt es sich um eine molekularzytogenetische Methode, mit deren Hilfe DNA-Zielsequenzen in Geweben, Zellen und Chromosomenpräparaten „in situ“, also „in der natürlichen Lage“ detektiert werden können. Dies geschieht durch Hybridisierung komplementärer, markierter DNA-Sequenzen (Sonden-DNA) mit einzelsträngigen DNA-Zielsequenzen. Es bilden sich Hybride.

Langer et al. (1981) entwickelten Markermoleküle, die zu einer weiten Verbreitung der ISH beitrugen. So wurde die nichtradioaktive **Fluoreszenz in situ Hybridisierung** oder FISH (Pinkel et al., 1986) als einfache, schnelle und sichere Methode etabliert. Infolge der aufkommenden Möglichkeit der molekularen Klonierung standen immer mehr DNA-Sequenztypen für die Hybridisierung zur Verfügung. Neben der Entwicklung unterschiedlicher Fluorochrome führte diese Sondenvielzahl zur Evaluation zahlreicher FISH-Techniken. In Abhängigkeit von der Fragestellung kommen zentromerspezifische Sonden, library-DNA-Proben bzw. whole chromosome paints (wcp) und Single Copy-Sonden einzeln oder in Kombination zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Single Copy-Sonden verwendet. Diese lokusspezifischen Sonden enthalten Sequenzen, die nur einmal im Genom vorliegen und finden z. B. in der klinischen Diagnostik zur Analyse von Mikrodeletionssyndromen (z. B. DiGeorge-Syndrom) Anwendung. Auch der spezifische Nachweis der subtelomerischen Chromosomenregionen erfolgt über Single Copy-Sonden.

Der Nachweis der hybridisierten Sonden-DNA kann direkt oder indirekt erfolgen. Indirekt markierte Sonden tragen ein so genanntes Reporter-molekül, z. B. ein Hapten wie Biotin, Digoxigenin oder Dinitrophenol, an ein Nukleotid gebunden. Der Nachweis erfolgt über Antikörper oder andere hochaffin an die jeweilige Reportergruppe bindende Moleküle, welche dann ihrerseits mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Bei *direkt markierten Sonden* sind die Fluoreszenzfarbstoffe direkt an Nukleotide gekoppelt und somit in die Sonde inkorporiert. Der Vorteil der direkten Markierung liegt in der Zeitersparnis bei der Detektion der Sonde. Nachteilig ist, dass die Möglichkeit einer nachträglichen Signalverstärkung nicht gegeben ist.

### 3.3.1 Subtelomer-FISH

Die Untersuchung der 43 relevanten subtelomerischen Chromosomenregionen erfordert den Einsatz von insgesamt 41 verschiedenen Sonden, da für die Chromosomenenden Xp/Yp und Xq/Yq aufgrund von Homologie jeweils die gleichen Sonden verwendet werden. In Einzelhybridisierungen würden die Untersuchungen mit 41 Sonden einen außerordentlich hohen Arbeitsaufwand erfordern (vgl. 2.1.2). Die Kombination verschiedener Fluorochrome zur Sondenmarkierung und die sich daraus ergebende Möglichkeit der Anwendung von Multicolour-FISH Ansätzen ermöglicht eine deutliche Erhöhung der Untersuchungseffizienz. Bei der Untersuchung der Subtelomerregionen von Patienten mit mentaler Retardierung fanden insgesamt drei verschiedene FISH-Techniken mit zwei unterschiedlichen SONDENSETS Anwendung. So wurde zunächst das kommerzielle Subtelomer SONDENSET „*ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel*“ der Firma Vysis verwendet, mit dem in 15 Hybridisierungen alle 43 relevanten Subtelomerregionen differentiell darstellbar sind.

Darüber hinaus fand die **Subtelomer-Combined Binary Ratio Labelling FISH (S-COBRA FISH)**, die durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluorochromen die simultane Visualisierung von 24 Farben ermöglichte, Anwendung. Mit Hilfe dieser Methode konnten in zwei Hybridisierungen alle Subtelomerregionen differentiell dargestellt werden (Engels et al., 2003).

Zuletzt wurde die **Subtelomer-Sechs-Farben-FISH**, die im Institut für Humangenetik in Bonn entwickelt wurde, genutzt. Durch den Einsatz dreier Fluorochrome ermöglichte diese Technik die Darstellung von sechs visuell unterscheidbaren Sonden in einer Hybridisierung.

Für die beiden letztgenannten FISH-Techniken wurde zum größten Teil das von Knight et al. (2000) beschriebene so genannte „Second generation probe panel“, das BAC- (**B**acterial **A**rtificial **C**hromosome) und PAC- (**P**1 **A**rtificial **C**hromosome) Sonden für alle subtelomerischen Chromosomenregionen enthält, benutzt.

### 3.3.1.1 Kommerzielles Subtelomer-Sonden Set (**ToTelVysion™**)

Zur Untersuchung der subtelomerischen Chromosomenregionen wurde bei 50 konsekutiv und zwei nicht-konsekutiv analysierten Patienten das „ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel“ der Firma Vysis verwendet. Mit Hilfe dieses Sets werden die 43 euchromatischen Subtelomerregionen durch den Einsatz von 41 Sonden (vgl. 2.1.3) in insgesamt 15 Hybridisierungen auf das Vorliegen von Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen untersucht. Die Sonden dieses Sets sind direkt markiert mit den Fluorochromen SpectrumGreen (Falschfarbe „grün“) und SpectrumOrange (Falschfarbe „rot“) (Vysis). Vier der insgesamt 15 Sondenmischungen enthalten zwei Subtelomer-Sonden in den reinen Farben zur Darstellung der p- und q-Arme je eines Chromosoms. Elf weitere Sondenmischungen enthalten jeweils drei subtelomerisch lokalisierte Sonden, zwei in den reinen Farben und eine dritte bestehend aus einer 1:1-Mischung der o. g. Fluorochrome (Falschfarbe „gelb“). Zusätzlich enthalten 10 von 11 dieser Drei-Farb-Hybridisierungssets Zentromersonden (CEP) oder euchromatische Sonden (LSI), die mit dem Fluorochrom SpectrumAqua direkt markiert sind. Diese sollen die Identifizierung der nur mit einer Sonde (Falschfarbe „gelb“) markierten Chromosomenenden gewährleisten. Tabelle A1 im Anhang zeigt das Schema der 15 Hybridisierungen und charakterisiert die einzelnen Sonden.

Das kommerziell erhältliche ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel der Firma Vysis enthält subtelomerische DNA-Sonden, die zwischen 60 und 191kb groß sind und nach Herstellerangaben Loci enthalten, welche schätzungsweise höchstens 300kb vom Chromosomenende entfernt liegen.

### 3.3.1.1.1 Subtelomer-Screening mittels *ToTelVysion*<sup>TM</sup>

Das „ToTelVysion<sup>TM</sup> Multi-color FISH Probe Panel“ der Firma Vysis ermöglichte die differentielle Darstellung aller 41 relevanten Subtelomerregionen in 15 Hybridisierungen. Voraussetzung für die Anwendung dieses kommerziell erhältlichen Kits waren Lymphozyten-Präparate, die auf insgesamt 15 Arealen mit einem Durchmesser von je 12mm mindestens 12-15 analysierbare Metaphasen enthielten. Neben der Anzahl der Metaphasen spielten deren Chromosomenlänge und -spreitung sowie die Menge zytoplasmatischer Reste eine Rolle für ihre Analysierbarkeit.

### 3.3.1.1.2 Enzymatische Vorbehandlung der Präparate

Bei Zellpräparationen mit einem erhöhten Zytoplasmaanteil kann eine enzymatische Vorbehandlung mit RNase A und Pepsin die Qualität der Hybridisierung verbessern.

Die RNase A bewirkt den Abbau einzelsträngiger RNA und verhindert so eine unspezifische Hybridisierung der Sonden-DNA mit zellulärer RNA.

Pepsin als proteolytisches Enzym baut Membran- und vor allem Zytoplasmareste, die die Chromosomen umschließen können, ab und bewirkt durch diese Permeabilisierung ein erleichtertes Eindringen der Sonden-DNA.

Eine anschließende Postfixierung mit vernetzenden Molekülen wie Formaldehyd dient der Erhaltung der Chromosomenmorphologie.

In den eigenen Versuchen wurde stets eine Vorbehandlung der Lymphozyten-Präparate zur Optimierung der Hybridisierungsergebnisse durchgeführt.

#### Durchführung:

- Präparate nach 70% Ethanol-Inkubation lufttrocknen
- je 100µl RNase A-Lösung auf Objektträger (OT) pipettieren, Deckglas (DG) auflegen
- 10 Minuten (min) bei 37°C inkubieren
- DG entfernen, 2x5 min waschen mit 2xSSC bei Raumtemperatur (RT)
- 10 min in Pepsinlösung inkubieren (37°C)
- 2x5 min waschen mit 1xPBS (RT)
- 10 min in Postfixierungslösung inkubieren (RT)
- 2x5 min waschen mit 1xPBS (RT)
- aufsteigende Ethanolreihe (70%/90%/absolut (abs.)), je 3 min (RT)
- OT lufttrocknen

### 3.3.1.1.3 Hybridisierung

Zur Hybridisierung müssen bei doppelsträngiger DNA sowohl Ziel- als auch Sonden-DNA denaturiert werden, d. h. die DNA-Doppelstränge werden getrennt. Im Rahmen der Hybridisierung werden nun markierte Nukleinsäuresonde und unmarkierte Ziel-DNA, jeweils einzelsträngig vorliegend, zusammengebracht. Dabei macht man sich die Reassoziationskinetik einzelsträngiger Nukleinsäuren zunutze, bei der sich durch die Basenpaarung von Adenin und Thymin (A-T) und Guanin und Cytosin (G-C) komplementäre Sequenzen zusammenlagern, also hybridisieren. Dieser Prozess kann nur unter bestimmten Bedingungen, abhängig von der Temperatur und der Salzkonzentration im Milieu, optimal ablaufen mit dem Ziel, möglichst viele Heteroduplices aus Sonden- und Ziel-DNA und möglichst wenig Homoduplices aus Ziel-Ziel-DNA und Sonden-Sonden-DNA zu bilden.

Die Paarungsgenauigkeit der Heteroduplices einer Hybridisierung wird maßgeblich durch die Stringenz der Reaktion bestimmt. In diesem Zusammenhang ist die Schmelztemperatur  $T_m$  von Bedeutung. Sie bezeichnet diejenige Temperatur, bei der die Hälfte der doppelsträngigen DNA unter festgelegten Bedingungen in Einzelstränge dissoziiert vorliegt und ist somit auch ein Maß für die Stabilität von DNA-Doppelsträngen.  $T_m$  ist abhängig von den folgenden Faktoren:

1. Stranglänge:

Je länger ein DNA-Fragment ist, umso mehr Wasserstoffbrücken werden zwischen den Basen ausgebildet, und umso höher ist  $T_m$ .

2. Basenzusammensetzung:

In einer G-C-Basenpaarung werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet, während es bei A-T-Basenpaarungen nur zwei sind. Daher erhöht sich die Schmelztemperatur  $T_m$  mit steigendem GC-Gehalt.

3. Lösungszusammensetzung:

Formamid hemmt die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen einzelsträngigen Nukleinsäuren und setzt so die Schmelztemperatur  $T_m$  herab. Monovalente Kationen hingegen stabilisieren DNA-Doppelstränge und erhöhen so die Schmelztemperatur.

Damit ergibt sich die Möglichkeit, die Bedingungen bei der Hybridisierung optimal einzustellen. Die optimale Hybridisierungstemperatur kann bis zu 25°C unter der Schmelztemperatur  $T_m$  liegen. Für menschliche DNA läge diese Temperatur in einem so hohen Bereich, dass die Aufrechterhaltung der Zell- und Chromosomenmorphologie nicht gewährleistet wäre. Die Formamidzugabe senkt die Schmelz- und damit die Hybridisierungstemperatur, so dass eine Hybridisierung bei 30-45°C ermöglicht wird. Das im Hybridisierungsansatz ebenfalls enthaltene inerte Polyanion Dextransulfat fungiert als Matrix und bewirkt so eine lokale Erhöhung der Sondenkonzentration, wodurch die Geschwindigkeit der

Hybridisierung erhöht wird, ohne dass die Genauigkeit der Basenpaarungen, also die Stringenz, beeinflusst wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Stringenz mit zunehmender Formamidkonzentration, zunehmender Temperatur und abnehmender Salzkonzentration ansteigt.

#### Durchführung:

##### *a. Denaturierung der Objektträger*

- OT je 3 min in Denaturierungslösung 1 inkubieren (75°C)
- 1-2 min in 2xSSC (4°C) inkubieren
- aufsteigende Ethanolreihe (70% (-20°C)/90% (RT)/abs. (RT)), je 3 min
- OT lufttrocknen

##### *b. Denaturierung der Sonden*

- je 1,5µl Sondenmix (1-15) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren
- 5 min bei 75°C denaturieren

##### *c. Hybridisierung*

- denaturierte Sonde auf denaturierten OT auftragen
- DG (Ø 12mm) auflegen und mit Fixogum versiegeln
- über Nacht (ÜN) in feuchter Kammer bei 37°C (Brutschrank) inkubieren

#### **3.3.1.1.4 Stringenzwaschschritte**

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgen stringente Waschschritte, die fehlgepaarte Sonden, die unspezifische Signale liefern würden, entfernen.

#### Durchführung:

##### *Stringenzwaschung*

- Fixogum entfernen
- DG in Waschlösung 2 (RT) ablösen
- 2 min waschen in Waschlösung 1 (73°C)
- 1,5 min waschen in Waschlösung 2 (RT)

#### **3.3.1.1.5 Gegenfärbung**

Die Gegenfärbung dient der späteren Erkennung und Identifizierung der Chromosomen, da der verwendete, in die DNA interkalierende Farbstoff DAPI (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol) ein spezifisches, bandenartiges Muster auf den Chromosomen erzeugt.

Durchführung:

- OT 9 min in DAPI-Lösung inkubieren
- 2-3x spülen mit aqua dest.
- aufsteigende Ethanolreihe (70%/90%/abs.), je 3 min (RT)
- OT lufttrocknen und mit ~40µl Citifluor eindecken (DG 24x60mm)

**3.3.1.1.6 Auswertung und Dokumentation**

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop Axioplan der Firma Zeiss. Dieses war ausgestattet mit einer Sensys Charged Coupled Device-Kamera (CCD) der Firma Photometrics. Zur Darstellung der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe wurden folgende Filterblöcke der Firma AHF Analysetechnik AG verwendet:

- DAPI MC-0 (DAPI) Filterset aus:  
Anregungsfilter D360/50  
Strahlenteiler 400 DCLP  
Sperrfilter D 470/40
- SpectrumGreen HQ-Filterset für Cy2 (FITC) sel. aus:  
Anregungsfilter HQ 480/40  
Strahlenteiler Q 505 LP  
Sperrfilter HQ 527/30
- SpectrumOrange HQ-Filterset für Cy3 aus:  
Anregungsfilter HQ 545/30  
Strahlenteiler Q 570 LP  
Sperrfilter HQ 610/75
- SpectrumAqua Filterset für DEAC (Aqua) aus:  
Anregungsfilter D 436/20  
Strahlenteiler 455 DCLP  
Sperrfilter D 480/30

Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der Software Cytovision 2.81 der Firma Applied Imaging. Es wurden pro Hybridisierungsregion für jeden Fall mindestens 5 Metaphasen zur Dokumentation aufgenommen. Aufgrund möglicher Polymorphismen der durch die Sonden dieses Kits abgedeckten Chromosomenregionen wurden alle Aberrationen, die mit dem ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel nachgewiesen wurden, mit Sonden des eigenen SONDENSSETS überprüft.



### 3.3.1.2 Eigenes Subtelomer-Sonden Set

Neben dem beschriebenen ToTelVysion-Sondenset wurden Sonden aus dem im eigenen Haus zusammengestellten Sondenset, welches überwiegend aus Sonden des „Second generation probe panel“ nach Knight et al. (2000) besteht, verwendet. Es handelte sich dabei um BAC (**B**acterial **A**rtificial **C**hromosome) und PAC (**P**1 **A**rtificial **C**hromosome)-Klone, die als Inserts subtelomerische Sonden enthielten, welche zwischen 100 und 200kb groß waren. Die Sonden lagen überwiegend weniger als 500kb vom Chromosomenende entfernt. Im Durchschnitt besaßen die Sonden bekannter Lokalisation einen Abstand von ca. 230kb zum Telomer. Sie wurden für die eigenen Untersuchungen in zwei FISH-Techniken, der Subtelomer-COBRA- und der Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, eingesetzt. Dazu musste die Sonden-DNA nach ÜN-Kultur der Wirts-Bakterien zunächst aus PAC- und BAC-Klonen isoliert, dann verdaut, gereinigt und zuletzt fluoreszenzmarkiert werden. Jede Sonde wurde in so genannten „Locus-Checks“ auf ihre Hybridisierungseffizienz geprüft. Sonden mit starken subtelomerischen Kreuzhybridisierungen, die also neben den gewünschten Signalen in der Zielsequenz noch weitere Signale in subtelomerischen Regionen des Genoms aufwiesen, wurden nicht ins Sondenset übernommen. Ebenso wurden Sonden, die zu geringe Signalintensitäten lieferten, ausgeschlossen. Tabelle A2 im Anhang zeigt eine Übersicht des eigenen Sondensets.

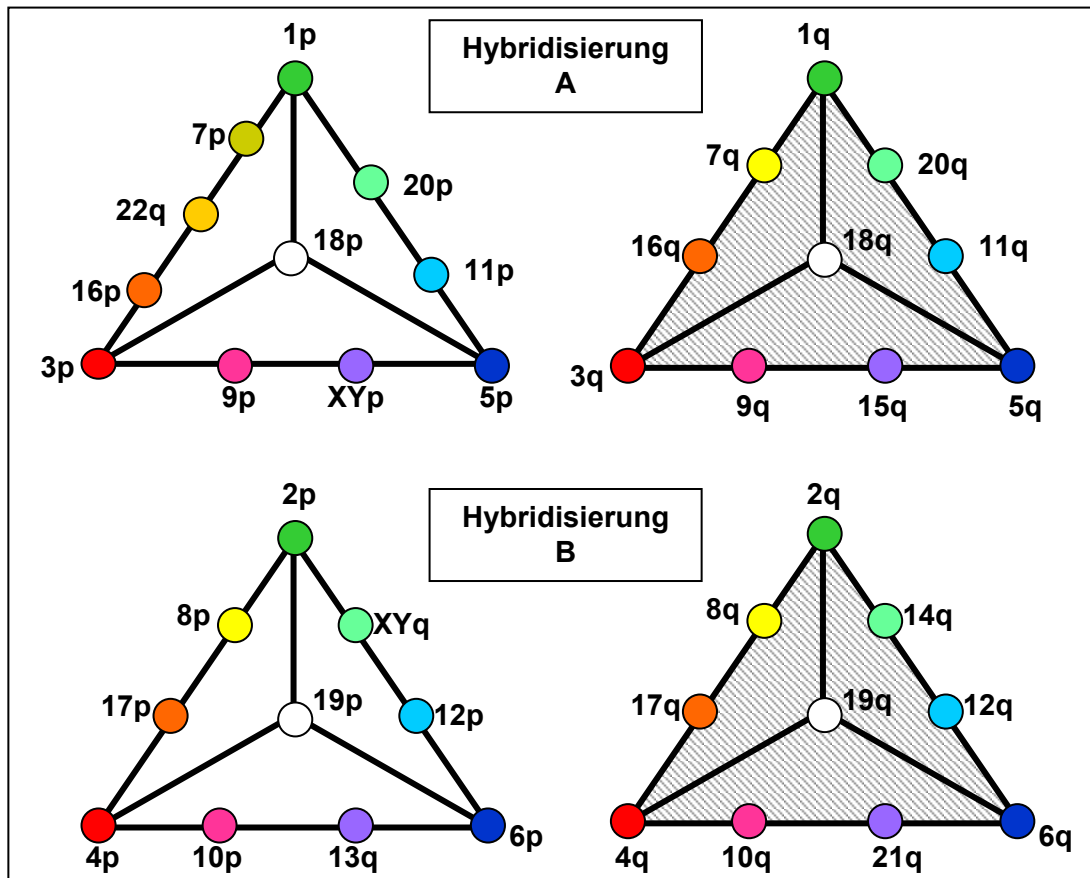
#### 3.3.1.2.1 Subtelomer-Combined Binary Ratio Labelling- (S-COBRA-) FISH

Zur Untersuchung der subtelomerischen Chromosomenregionen auf Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen mit Hilfe des eigenen Sondensets wurde zunächst die **S**ubtelomer-**C**ombined **B**inary **R**atio Labelling-(S-COBRA-) FISH etabliert und zur Untersuchung von acht konsekutiven und drei nicht-konsekutiven Patienten angewendet (Engels et al., 2003). Diese Methode ermöglichte die simultane, differentielle Visualisierung der 43 Subtelomerregionen mit 41 Sonden in nur zwei Hybridisierungen.

Das COBRA-Prinzip wurde von Tanke et al. (1999) für whole chromosome paints (wcp) zur Darstellung aller menschlichen Chromosomen unter Verwendung von vier Fluorochromen entwickelt. Dabei wurden zunächst drei spektral gut voneinander unterscheidbare Fluorochrome, dGreen (Falschfarbe „grün“), Cy3 (Falschfarbe „rot“) und Cy5 (Falschfarbe „blau“), sowohl in ihrer reinen Form als auch in festgelegten Mischungsverhältnissen zur Sondenmarkierung eingesetzt (*ratio*-Markierung). Zur *ratio*-Markierung wurden die Fluorochrome paarweise in festgelegten Verhältnissen so gemischt, dass neben den beiden reinen Farben drei voneinander unterscheidbare Mischfarben entstanden. Zur Verdoppelung der Anzahl der Farben wurde das so generierte Set von 12 differenzierbaren Farben aus drei Fluorochromen einmal mit und einmal ohne Zugabe eines vierten, so genannten binären

Fluorochroms verwendet. Basierend auf der Verwendung von vier Fluorochromen wurden so 24 eindeutig unterscheidbare Farben erzeugt.

Zur Untersuchung der Subtelomere, welche die simultane Visualisierung von 43 Chromosomenregionen durch 41 Sonden erfordert, wurde das klassische COBRA-Prinzip leicht modifiziert. Es gelang, alle 41 Sonden in zwei Hybridisierungen (Hybridisierungen A und B) differentiell darzustellen. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 3.1, die die Markierungsschemata der Subtelomer-COBRA in Form von Farbdreiecken wiedergibt.



**Abbildung 3.1:** Markierungsschemata der S-COBRA-FISH. Die Sonden in den reinen Farben liegen auf den Eckpunkten, die Sonden in den *ratio*-Farben auf den Kanten der Dreiecke. Durch Markierung mit allen drei reinen Fluorochromen entsteht zusätzlich die in der Mitte der Dreiecke dargestellte, weiße Sonde. Die binäre Markierung ist durch die Schraffur symbolisiert.

Die Eckpunkte der Dreiecke spiegeln die reinen Fluorochrome wieder, auf den Kanten sind die durch paarweises Mischen der Fluorochrome erzeugten *ratio*-Farben symbolisiert. So wurden durch Mischen zweier Fluorochrome neben den reinen Farben je zwei Mischfarben generiert. Eine Ausnahme bildete dabei das linke Dreieck in Hybridisierung A, für das neben den reinen Fluorochromen rot und grün insgesamt drei Mischfarben erzeugt wurden. Auf diese Weise ergaben sich pro Dreieck 9 (bzw. 10 im linken Dreieck der Hybridisierung A) eindeutig voneinander unterscheidbare *ratio*-Farben. Durch die Kombination aller drei reinen Farben rot, grün und blau wurde eine 10. Farbe (bzw. 11. Farbe für Hybridisierung A, linkes Dreieck) erzeugt, dargestellt in der Mitte der Farbdreiecke („weiß“). Auf der linken Seite sind

die primären Farbdreiecke abgebildet. Dieselben *ratio*-Farben wurden zusätzlich unter Beimischung des *binären* Fluorochroms DNP-ULS<sup>®</sup>, welches indirekt über einen LaserPro IR 790-konjugierten Antikörper („violett“) nachgewiesen wird, eingesetzt (dargestellt durch Schraffur der rechten Dreiecke in Abbildung 3.1). Auf diese Weise wurden in Hybridisierung A 21 und in Hybridisierung B 20 eindeutig differenzierbare Sonden simultan erzeugt.

Die Sonden wurden so auf die Dreiecke verteilt, dass die p- und q-Arme der meta- und submetazentrischen Chromosomen in derselben Hybridisierung untersucht wurden und die entsprechenden Sonden jeweils die identische *ratio*-Farbe besaßen. Zur Unterscheidung der p- und q-Signale eines Chromosoms wurde eine der beiden Sonden, in der Regel die für den q-Arm, zusätzlich mit dem binären Fluorochrom markiert. Die p-Arme der akrozentrischen Chromosomen wurden nicht analysiert, weil deren Subtelomerregionen nicht euchromatisch und damit für die Untersuchung irrelevant sind. Die Sonden für die q-Arme der akrozentrischen Chromosomen wurden so auf die beiden Hybridisierungen verteilt, dass eine gute morphologische Unterscheidbarkeit der markierten Chromosomen anhand ihrer Gegenfärbung gegeben war.

#### **3.3.1.2.1.1 DNA-Isolierung aus BAC- und PAC-Klonen**

Zur Durchführung der S-COBRA-FISH musste die Sonden-DNA möglichst frei von bakterieller genomischer DNA sein. Daher wurde zur DNA-Isolation aus PAC- und BAC-Klonen die so genannte „cleared lysate/double acetate“-Methode nach Bruce Roe (University of Oklahoma; [www.genome.ou.edu/DbIAcetateProcV3.html](http://www.genome.ou.edu/DbIAcetateProcV3.html)) gewählt. Dieses Verfahren beinhaltet zwei Azetatfällungen, mehrere Einfrierschritte und DNA-Fällungen sowie abschließende Phenol-Extraktionen zur Gewinnung reiner DNA mit außerordentlich geringer Kontamination durch bakterielle DNA.

In den eigenen Untersuchungen wurden Kulturvolumina von 250ml gewählt, wobei für PAC-Klone Kanamycin und für BAC-Klone Chloramphenicol als Antibiotika zugegeben wurden. Die PAC- und BAC-Klone wurden als Glycerol-Stammlösungen (25% Glycerol/25% H<sub>2</sub>O/50% LB-Medium) bei -70°C gelagert.

##### Durchführung:

- als Vorkultur 3ml LB-Medium mit ~1µl Glycerol-Stammlösung animpfen
- 6-7 Stunden (h) bei 37°C im Schüttelinkubator (250 Umdrehungen/Minute (U/min)) inkubieren
- 1l-Kulturkolben mit je 250ml LB-Medium befüllen, mit 40-80µl der Vorkultur animpfen, ÜN bei 37°C im Schüttelinkubator (250U/min) inkubieren
- Zellsuspension in 250ml-Zentrifugationsgefäße überführen
- 15 min bei 5.000U/min zentrifugieren (Ultrazentrifuge, 4°C)

- 
- Überstand verwerfen, Sediment mind. 2 h einfrieren (-70°C)
  - 10ml P1-Lösung zum aufgetauten Sediment geben, mit Einmal-Pipetten gründlich resuspendieren
  - 5 min bei RT inkubieren
  - 20ml P2-Lösung zugeben, Gefäße verschließen, ca. 8-10x invertieren
  - 5 min bei RT inkubieren
  - 15 ml P3-Lösung (4°C) zugeben, Gefäße verschließen, ca. 8-10x invertieren
  - ÜN bei -20°C inkubieren
  - aufgetaute Lösung 15 min bei 10.000U/min zentrifugieren (Ultrazentrifuge, 4°C)
  - Überstand erneut 15 min bei 10.000U/min zentrifugieren (s. o.)
  - Überstand durch Gaze in neues 250ml-Zentrifugationsgefäß überführen
  - 45ml (1xGesamtvolumen) 2-Propanol (Isopropanol) zugeben, mischen
  - 15 min bei 5.000U/min zentrifugieren (Ultrazentrifuge, 4°C)
  - Überstand verwerfen, DNA-Pellet kurz trocknen lassen
  - 4,5ml 10:50 TE-Puffer zugeben, DNA-Pellets lösen (37°C)
  - Lösung in 50ml-Zentrifugationsgefäß überführen
  - 2,25ml 7,5M Kaliumazetat-Lösung zugeben, mischen
  - 30-45 min bei -70°C inkubieren
  - aufgetaute Lösung 10 min bei 6.000U/min zentrifugieren (Ultrazentrifuge, 4°C)
  - Überstand mit 2 ½ Volumen (~18ml) Ethanol abs. versetzen
  - 15 min bei 8.000U/min zentrifugieren (Ultrazentrifuge, 4°C)
  - Überstand verwerfen, DNA-Pellet kurz trocknen lassen
  - 700µl 50:50 TE-Puffer zugeben, DNA-Pellets im Schüttelinkubator lösen (37°C, 250U/min)
  - 15µl RNase A-Lösung zugeben
  - 30 min bei 37°C inkubieren
  - Lösung in 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen
  - 700µl Phenol zugeben, mischen
  - 5 min bei 12.000U/min zentrifugieren (Kühlzentrifuge, 4°C)
  - wässrigen Überstand in neues 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
  - 700µl Phenol zugeben, mischen
  - 5 min bei 12.000U/min zentrifugieren (Kühlzentrifuge, 4°C)
  - wässrigen Überstand in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen
  - 700µl 2-Propanol (Isopropanol) zugeben
  - 5 min bei 14.000U/min zentrifugieren (Kühlzentrifuge, 4°C)

- Überstand verwerfen, 500µl 70% Ethanol zugeben
- 5 min bei 14.000U/min zentrifugieren (Kühlzentrifuge, 4°C)
- Überstand verwerfen, DNA-Pellets trocknen lassen
- 40µl EB-Puffer zugeben, DNA-Pellets lösen (Thermomixer, 750U/min, 37°C)
- 10µl ( $\frac{1}{4}$  x Gesamtvolumen) 10M Ammoniumazetat und 125µl ( $2 \frac{1}{2}$  x Gesamtvolumen) Ethanol abs. (-20°C) zugeben, mischen
- 30 min in Eiswasser inkubieren
- 30 min bei 14.000U/min zentrifugieren (Kühlzentrifuge, 4°C)
- Überstand verwerfen, 500µl 70% Ethanol zugeben
- 5 min bei 14.000U/min zentrifugieren (Kühlzentrifuge, 4°C)
- Überstand verwerfen, DNA-Pellets trocknen lassen
- 30-50µl EB-Puffer zugeben, DNA-Pellets lösen (Thermomixer, 750U/min, 37°C)

### 3.3.1.2.1.2 DNA-Verdau mittels DNaseI

Zur Hybridisierung musste die genomische Sonden-DNA von 100-200kb auf eine Fragmentlänge von 100-600bp gebracht werden. Dies geschah mit Hilfe des Enzyms DNaseI, welches DNA unspezifisch fragmentiert.

#### Durchführung:

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der dargestellten Reihenfolge zusammengegeben:

Sonden-DNA (5-10µg)	xµl
10xNP-Puffer	12,5µl
dH <sub>2</sub> O	yµl
DNaseI-Lösung	25µl
Gesamtvolumen	125µl

Die Ansätze wurden, abhängig von der geschätzten DNA-Menge, für 3-6 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte gelelektrophoretisch auf 1%-igen Agarose-Gelen. Sonden-DNAs mit Fragmentlängen zwischen 100 und 600bp wurden aufgereinigt, um Salze und Proteine zu entfernen. Dazu wurde das PCR Purification Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Konzentrationen der gelösten DNAs wurden photometrisch bestimmt und mittels EB-Puffer auf 50-150ng/µl eingestellt.

### 3.3.1.2.1.3 Markierung der Sonden-DNA

Zur Markierung der Sonden-DNA für die S-COBRA-FISH eignete sich besonders das Universal Linkage System (ULS<sup>®</sup>) (Kreatech, NL). Durch dieses Verfahren wird die Sonden-DNA chemisch durch kovalente Bindung eines fluorochromgekoppelten, monoreaktiven cis-Platin-Derivats markiert. Dieses Markierungssystem wurde aufgrund seiner Stärke, Effizienz und Reproduzierbarkeit gewählt. Zur Erzeugung der 10 (Hybridisierung A) bzw. 11 (Hybridisierung B) verschiedenen Sondenfarben wurden die „ratio“-Farben dGreen-ULS<sup>®</sup> (Falschfarbe „grün“), Cy<sup>™</sup>3-ULS<sup>™</sup> (Falschfarbe „rot“) und Cy<sup>™</sup>5-ULS<sup>™</sup> (Falschfarbe „blau“) verwendet. Die binäre Markierung der Sonden erfolgte indirekt mittels Dinitrophenyl (DNP)-ULS<sup>®</sup>.

Die Tabellen 3.2a und 3.2b zeigen die Markierungsschemata der Hybridisierungen A und B der S-COBRA-FISH. Grau unterlegt sind diejenigen Sonden, die die binäre Markierung tragen.

Hybridisierung A	„ratio“-Markierung			Binäre Markierung Dinitrophenyl- ULS® in ng
	dGreen-ULS® in ng (%)	Cy™3-ULS™ in ng (%)	Cy™5-ULS™ in ng (%)	
Subtelomer- Sonde				
1p	58 (100)			
7p	113 (75)	33 (25)		
22q	77 (42)	106 (58)		
16p	19 (17)	88 (83)		
3p		142 (100)		
9p		99 (70)	43 (30)	
Xp/Yp		51 (36)	92 (64)	
11p	27 (26)		76 (74)	
20p	61 (62)		37 (38)	
5p			82 (100)	
18p	200 (33)	200 (33)	200 (33)	
1q	180 (100)			158
7q	106 (70)	46 (30)		115
16q	58 (38)	96 (62)		96
3q		142 (100)		99
9q		88 (64)	50 (36)	87
15q		53 (37)	91 (63)	95
5q			203 (100)	185
11q	37 (20)		148 (80)	146
20q	48 (61)		31 (39)	36
18q	94 (38)	70 (28)	84 (34)	95
<b>Summe in ng</b>	1078	1214	1137	1112
<b>ULS-Zugabe (µl)</b>	2,26	2,55	2,39	2,22

Tabelle 3.2a: Markierungsschema der S-COBRA-FISH, Hybridisierung A.

Hybridisierung B	„ratio“-Markierung			Binäre Markierung Dinitrophenyl- ULS® in ng
	dGreen-ULS® in ng (%)	Cy™3-ULS™ in ng (%)	Cy™5-ULS™ in ng (%)	
Subtelomer- Sonde				
2p	135 (100)			
8p	110 (69)	49 (31)		
17p	40 (40)	59 (60)		
10p		130 (67)	65 (33)	
4p		150 (100)		
13q		30 (34)	58 (66)	
6p			200 (100)	
12p	63 (36)		113 (64)	
Xq/Yq	61 (55)		50 (45)	
19p	55 (32)	57 (33)	61 (35)	
2q	135 (100)			113
8q	99 (69)	45 (31)		73
17q	16 (28)	41 (72)		42
4q		150 (100)		121
10q		112 (62)	68 (38)	122
21q		41 (25)	125 (75)	92
6q			142 (100)	85
12q	40 (23)		134 (77)	50
14q	81 (68)		38 (32)	45
19q	80 (33)	80 (33)	80 (33)	100
<b>Summe in ng</b>	915	944	1134	843
<b>ULS-Zugabe (µl)</b>	1,92	1,98	2,38	1,69

**Tabelle 3.2b:** Markierungsschema der S-COBRA-FISH, Hybridisierung B.

Zur Markierung wurden die Sonden-DNAs in separaten Ansätzen für jedes Fluorochrom auf Eis zusammen pipettiert. Anschließend wurde der Farbstoff zugegeben. Dabei war zu beachten, dass pro Mikrogramm DNA 2,1 Mikroliter (1,05 Units) ULS-Markierungslösung zur Markierung zu verwenden waren. DNP-ULS® wurde in einer Menge von 2,0 Mikroliter (1,0 Unit) pro Mikrogramm DNA eingesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 65°C für dGreen-, Cy™3- und Cy™5-ULS™ und bei 85°C für Dinitrophenyl (DNP)-ULS®.



Durchführung:

- Sonden-DNAs in entsprechende Reaktionsgefäße („grün“, „rot“, „blau“, „DNP“ pipettieren (vgl. Tabelle 3.2a/b), mischen
- ULS-Lösung (vgl. Tabelle 3.2a/b) zugeben, mischen, abzentrifugieren
- 15 min bei 65°C (für dGreen-, Cy™3-, Cy™5-ULS™) bzw. 30 min bei 85°C (für DNP-ULS®) inkubieren
- Abstoppen der Reaktion mit 5-fachem Volumen Puffer 1 (PB) des PCR Purification Kits (Qiagen)
- Reinigung der Markierungsansätze mit dem PCR Purification Kit nach Herstellerangaben
- markierte DNA mit 30µl EB-Puffer eluieren

**3.3.1.2.1.4 Fällung der markierten Sonden-DNA**

Die in Puffer aufgenommenen, separat markierten DNAs mussten zur Hybridisierung zunächst gemeinsam gefällt werden, um anschließend in Hybridisierungslösung aufgenommen werden zu können. Die Fällung erfolgte mit Ammoniumazetat, Ethanol und einem 25-fachen Überschuss an humaner Cot1-DNA.

Durchführung:

- $\frac{1}{4}$  des Gesamtvolumens Ammoniumazetat, 2  $\frac{1}{2}$ -faches Volumen Ethanol und 25-fache Menge Cot1-DNA zugeben, mischen
- mindestens 30 min in Eiswasser inkubieren
- 30 min bei 14.000 U/min zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- 500µl 70% Ethanol zugeben, 5 min bei 14.000 U/min zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- DNA-Pellets trocknen (Thermomixer, 37°C)
- 13µl Hybridisierungslösung zugeben und Sonden-DNAs  $\ddot{U}$ N lösen (Thermomixer, 750U/min, 37°C)

**3.3.1.2.1.5 Hybridisierung**

Die Hybridisierungen wurden auf enzymatisch vorbehandelten Metaphasepräparationen durchgeführt. Die Vorbehandlung mit RNase A und Pepsin erfolgte wie im Abschnitt 3.3.1.1.2 beschrieben. Das Prinzip der Hybridisierung ist in Abschnitt 3.3.1.1.3 beschrieben. Für die eigenen Sonden war ein so genanntes „Preannealing“, also eine Prä-Hybridisierung mit Cot1-DNA, notwendig. In dieser Phase sättigt Cot1-DNA als hochrepetitive DNA repetitive Sequenzen auf der Sonden-DNA ab und verringert so unspezifische Kreuzhybridisierungen der Sonden.

*a. Denaturierung der Sonden*

- Sonden 7 ½ min bei 80°C denaturieren
- 1 min in Eiswasser abkühlen
- 30-60 min bei 37°C inkubieren („Preannealing“)

*b. Denaturierung der OT*

- 80µl Denaturierungslösung 2 auf OT pipettieren
- mit DG (24x60mm) luftblasenfrei eindecken
- 1 min 20 Sekunden (sek) bei 80°C denaturieren (Thermocycler)
- DG abschlagen, 1-2 min in 2xSSC (4°C) inkubieren
- aufsteigende Ethanolreihe (70% (-20°C)/90% (RT)/abs. (RT)), je 3 min
- OT lufttrocknen

*c. Hybridisierung*

- Sonde auf denaturierten OT auftragen
- DG (21x25mm) auflegen
- OT mit DG nach unten hängend in Querküvette stecken
- 48 Std. bei 37°C in feuchter Kammer (60% Formamid/2xSSC) inkubieren

**3.3.1.2.1.5 Stringenzwaschungen, Nachweis und Gegenfärbung**

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden stringente Waschschriffe durchgeführt, um fehlgepaarte Sonden, die unspezifische Signale liefern würden, zu entfernen. DNP-ULS<sup>®</sup> als Hapten wurde mittels eines LaserPro IR790-konjugierten Antikörpers der Firma Molecular Probes immunochemisch nachgewiesen.

Durchführung:

- DG in Waschlösung A abwaschen (5-10 min)
- 5 min waschen in Waschlösung A (37°C)
- 2x5 min waschen in Waschlösung B (45°C)
- 3 min waschen in Waschlösung A (37°C)
- 2x5 min waschen in Waschlösung C (60°C)
- 20 min waschen in Waschlösung A (RT)
- 5 min waschen in Waschlösung A (RT)
- Rabbit α DNP 1:200 in 1xTBS/0,5% Blocking Reagent (BR) verdünnen
- 100µl Antikörperlösung auf OT pipettieren, DG auflegen (24x60mm), 30 min bei 37°C inkubieren
- DG entfernen, 3x3 min waschen in TNT (RT)

- Goat  $\alpha$  rabbit/LaserPro IR790 1:200 in 1xTBS/0,5% BR verdünnen
- 100 $\mu$ l Antikörperlösung auf OT pipettieren, DG auflegen (24x60mm), 30 min bei 37°C inkubieren
- DG entfernen, 3x3 min waschen in TNT (RT)
- OT 9 min in DAPI-Lösung inkubieren
- 1-2x spülen mit aqua dest.
- aufsteigende Ethanolreihe (70%/90%/abs.), je 3 min (RT)
- OT lufttrocknen und mit ~40 $\mu$ l Citifluor eindecken (DG 24x60mm)

#### **3.3.1.2.1.6 Auswertung und Dokumentation**

Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgten durch den Projektleiter. Diese Arbeiten wurden in Leiden (Niederlande) am LUMC (Leiden University Medical Centre) durchgeführt. Die Mikroskop- und Aufnahmeausstattung sowie die Vorgehensweise der Bilderstellung sind den Publikation von Tanke et al. (1999) und Engels et al. (2003) zu entnehmen.

Die angefertigten Bilder wurden im Rahmen der eigenen Arbeit mit Hilfe des Colour-Proc Bildanalyseprogramms ausgewertet. Für jeden Fall wurden pro Hybridisierung 4-7 Metaphasen dokumentiert und visuell analysiert.

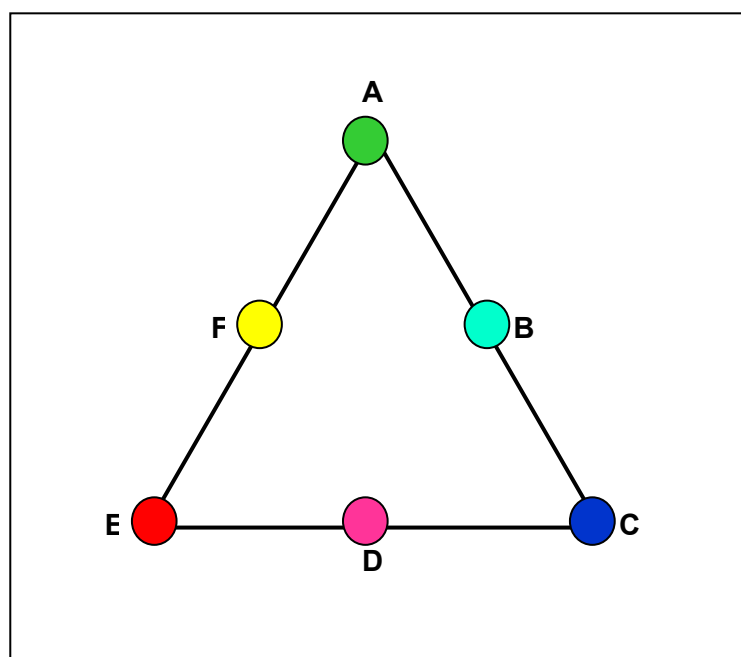
#### **3.3.1.2.2 Untersuchung durch Subtelomer-Sechs-Farben-FISH**

Die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH wurde zur simultanen, differenziellen Visualisierung von bis zu sechs verschiedenen Subtelomer-Sonden in einer Hybridisierung entwickelt. Zur Untersuchung der 41 relevanten Chromosomenregionen waren demnach sieben Hybridisierungen notwendig. Mit Hilfe dieser Methode wurden 18 Patienten konsekutiv und ein Patient nicht-konsekutiv untersucht. Dabei wurden die beschriebenen Sonden des eigenen SONDENSSETS (vgl. 3.3.1.2) verwendet.

Die Sonden wurden entsprechend denen der S-COBRA-FISH chemisch mittels ULS™ markiert (vgl. 3.3.1.2.1.3). Dazu wurden drei Sonden einer Hybridisierung mit den reinen Fluorochromen dGreen-ULS®, Cy™3- und Cy™5-ULS™ markiert, für die drei weiteren Sonden dieser Hybridisierung wurden jeweils 1:1 Mischungsverhältnisse der Fluorochrome verwendet (vgl. Tabelle 3.3 und Abbildung 3.2).

Sonde	dGreen-ULS <sup>®</sup>	Cy <sup>™</sup> 3-ULS <sup>™</sup>	Cy <sup>™</sup> 5-ULS <sup>™</sup>	Falschfarben
A	100%			Grün
B	50%		50%	Türkis
C			100%	Blau
D		50%	50%	Violett
E		100%		Rot
F	50%	50%		Gelb

**Tabelle 3.3:** Schematische Darstellung der Fluorochromanteile an der Sondenmarkierung der Sechsfarben-FISH.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Subtelomer-Sechsfarben-FISH.

Zur optimalen Kombination der sechs Sonden einer Hybridisierung waren einige Parameter zu beachten. So sollten, zur einfacheren Identifizierung der Chromosomen, p- und q-Arme desselben Chromosoms in einer Hybridisierung untersucht werden. Darüber hinaus sollten sich die Chromosomen einer Hybridisierung in ihrer Morphologie unterscheiden. Außerdem mussten diejenigen Sonden, die gemeinsam hybridisiert werden sollten, eine vergleichbare Signalstärke und Hybridisierungseffizienz besitzen.

Eine Ausnahme bildeten dabei die akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22, für die keine Signale im p-Arm vorlagen und deren eindeutige Charakterisierung anhand der Gegenfärbung nicht immer gewährleistet war. Zur Identifizierung dieser Chromosomen wurden zusätzliche Sonden ausgewählt, die proximal im q-Arm lagen und die mit den Subtelomer-Sonden für die akrozentrischen Chromosomen gemeinsam eine Hybridisierung bildeten (vgl. Tabelle 3.4).

Chromosom	Chromosomenregion	Klonbezeichnung
13	13q12.11	RP11-408E05
14	14q11.2	RP11-98N22
15	15q11.2	RP11-307C10
21	21q11.2	RP11-270M7
22	22q11.21	RP11-81B03

**Tabelle 3.4:** Euchromatische Sonden zur Identifizierung der akrozentrischen Chromosomen (nach: [www.ensembl.org/homo\\_sapiens/cytoview](http://www.ensembl.org/homo_sapiens/cytoview)).

Aufgrund unterschiedlich starker Sonden, d. h. unterschiedlich großer und starker Signale in der Hybridisierung, variierten die einzusetzenden DNA-Mengen für jede Sonde. Die oben angegebenen Mischungsverhältnisse von 1:1 entsprechen dem Idealzustand. In den eigenen Untersuchungen wurden diese aufgrund unterschiedlicher Farbintensitäten, wiederum beruhend auf der Sondenstärke, angepasst, um eine eindeutige Unterscheidbarkeit zu gewährleisten.

Die DNA-Isolierung aus BAC- und PAC-Klonen erfolgte wie unter 3.3.1.2.1.1 beschrieben. Die Sonden-DNAs wurden mittels DNaseI verdaut wie in Abschnitt 3.3.1.2.1.2 dargestellt.

### 3.3.1.2.2.1 Markierung der Sonden-DNA und Durchführung der Sechs-Farben- FISH

Das Prinzip der Markierung mit dem Universal Linkage System (ULS<sup>®</sup>) ist in Abschnitt 3.3.1.2.1.3 erläutert. Die Markierungsschemata der Sechs-Farben-FISH sahen nach den entsprechenden Optimierungen wie folgt aus:

Hybridisierung A		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
5q	101	101 (100)		
3q	170	68 (40)		102 (60)
7p	102			102 (100)
5p	86		39 (45)	47 (55)
3p	78		78 (100)	
7q	319	191 (60)	138 (40)	

Hybridisierung B		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
6q	109	109 (100)		
19p	242	109 (45)		133 (55)
2p	142			142 (100)
6p	242		109 (45)	133 (55)
19q	57		57 (100)	
2q	142	85 (60)	57 (40)	

Hybridisierung C		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
12p	123	123 (100)		
4q	243	146 (60)		97 (40)
9q	145			145 (100)
12q	268		121 (45)	147 (55)
4p	100		100 (100)	
9p	200	120 (60)	80 (40)	

Hybridisierung D		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
1q	91	91 (100)		
16p	74	37 (50)		37 (50)
20p	79			79 (100)
1p	72		32 (45)	40 (55)
16q	97		97 (100)	
20q	55	30 (55)	25 (45)	

Hybridisierung E		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
10q	284	284 (100)		
18q	174	96 (55)		78 (45)
11p	72			72 (100)
10p	512		256 (50)	256 (50)
18p	504		504 (100)	
11q	130	72 (55)	58 (45)	

Hybridisierung F		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
8q	101	101 (100)		
Xq/Yq	78	39 (50)		39 (50)
17p	59			59 (100)
8p	112		56 (50)	56 (50)
Xp/Yp	100		100 (100)	
17q	80	40 (50)	40 (50)	

Hybridisierung G		Sonden-Menge in ng (Farbanteile in %)		
Sonde	DNA-Menge (ng)	grün	rot	blau
21q	116	116 (100)		
14q	84	42 (50)		42 (50)
15q	167		75 (45)	92 (55)
22q	115		115 (100)	
13q	74	41 (55)	33 (45)	
<b>Sonden zur Identifizierung der akrozentrischen Chromosomen</b>				
22q11.21	46	46 (100)		
14q11.2	106	53 (50)		53 (50)
21q11.2	105			105 (100)
15q11.2	86		43 (50)	43 (50)
13q12.11	126	63 (50)	63 (50)	

Tabelle 3.5: Markierungsschemata zur Herstellung der Hybridisierungsmixe der Sechs-Farben-FISH.

Die Hybridisierungsmixe wurden gemäß den Markierungsschemata (Tabelle 3.5) hergestellt. Die Markierung mit ULS™, Fällung und die Hybridisierung erfolgten entsprechend den Abschnitten 3.3.1.2.1.3, 3.3.1.2.1.4 und 3.3.1.2.1.5. Die Stringenzwaschungen wurden durchgeführt wie unter 3.3.1.2.1.6 dargestellt, wobei der immunochemische Nachweis entfiel. Die Auswertung und Dokumentation erfolgten wie unter 3.3.1.1.6 beschrieben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass in der Sechs-Farben-FISH anstelle des Filters für DEAC der Filter für den Infrarot-Farbstoff Cy5 zur Auswertung benötigt wurde (HQ-Filterset für Cy5 aus: Anregungsfilter HQ 620/60, Strahlenteiler Q 660 LP, Sperrfilter HQ 700/75; AHF Analysetechnik AG). Zur Dokumentation wurden für jeden Fall pro Hybridisierung mindestens 6 Metaphasen aufgenommen.

### **3.3.2 Bruchpunktbestimmungen durch Zwei- und Drei-Farb-Hybridisierungen**

Bei Patienten, bei denen im Rahmen der Arbeit subtelomerische Chromosomenaberrationen festgestellt wurden, wurden die Deletionen bzw. partiellen Trisomien durch exakte Bruchpunktbestimmungen mittels FISH näher charakterisiert.

#### **3.3.2.1 Prinzip der Bruchpunktbestimmungen**

Der Nachweis von Aberrationen im Rahmen eines Subtelomer-Screenings ermöglicht zunächst lediglich eine Aussage über diejenige chromosomale Region, die durch die zur Detektion verwendete Sonde abgedeckt ist. Um die Lage und Größe der Aberration genauer zu erfassen, wurde nach folgender Vorgehensweise verfahren:

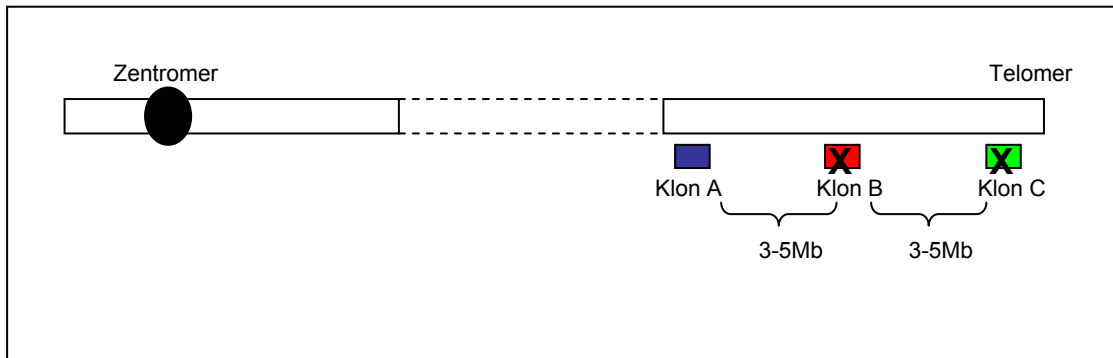
Zunächst wurden in geeigneten Datenbanken Sonden in Form von PAC- und BAC-Klonen ausgewählt, die das aberrante Chromosomenende in Abständen von etwa 3-5Mb großräumig abdecken.

In den eigenen Untersuchungen wurden die Sonden zur exakten Charakterisierung der Größen der Deletionen bzw. der trisomen Fragmente mittels der Ensembl Datenbank des Sanger Centers ([www.ensembl.org/homo\\_sapiens/cytoview](http://www.ensembl.org/homo_sapiens/cytoview)) ausgewählt und mit Hilfe der Datenbank der University of California, Santa Cruz ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu), Version Juli 2003) näher charakterisiert.

Die Sonden wurden als BAC- bzw. PAC-Klone aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt. Tabelle A3 im Anhang zeigt alle zur Bruchpunktbestimmung verwendeten Klone mit ihren Lokalisationen und Größen.

Abbildung 3.3 zeigt das Vorgehen bei der Bruchpunktbestimmung schematisch am Beispiel einer Deletion. Die Klone A, B und C liegen jeweils 2-5Mb voneinander entfernt. Die Kreuze auf den Klonen B und C symbolisieren eine Deletion dieser Sonden, Klon A hybridisiert als

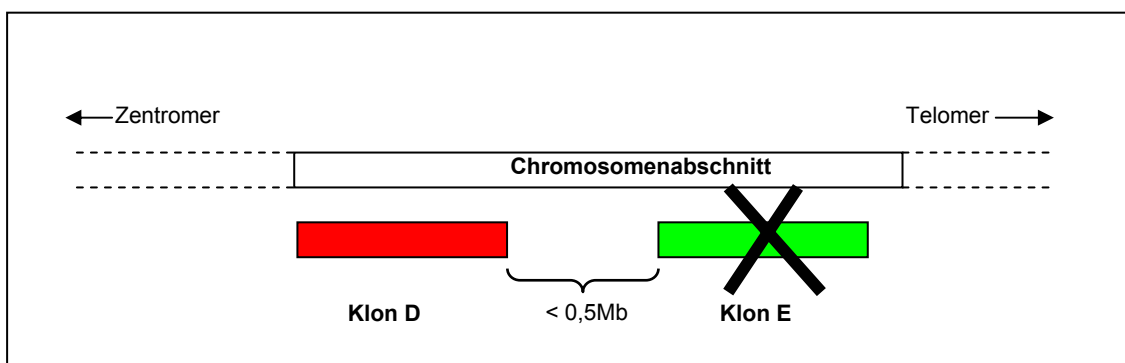
einzigste Sonde regelrecht. Damit steht fest, dass der Bruchpunkt der Aberration zwischen Klon A und Klon B liegt.



**Abbildung 3.3:** Schema der Bruchpunktbestimmung.

Mit dieser Information werden dann in den Datenbanken zwei bis drei weitere Klone ausgewählt, die zwischen dem letzten deletierten und ersten disom vorhandenen Klon, im Beispiel aus Abbildung 3.3 zwischen den Klonen A und B, liegen. Dieses Vorgehen wird wiederum für die eingegrenzte Region wiederholt. So wird sukzessive die Auflösung der Bruchpunktbestimmung erhöht, das heißt in diesem Fall, dass der Abstand zwischen den hybridisierten Sonden geringer wird.

In Abbildung 3.4 ist eine Möglichkeit für den Abschluss der Bruchpunktbestimmung schematisch dargestellt. Die Klone D und E haben einen Abstand von weniger als 500kb, was der von uns angestrebten Auflösung der Bruchpunktbestimmungen entspricht. Klon E ist deletiert, Klon D noch vorhanden. Die begrenzenden Klone werden so sorgfältig wie möglich auf eventuelle Unterschiede der Signalintensität zwischen dem deletierten und dem normalen Chromosom ausgewertet. Der Bruchpunkt in diesem Beispiel liegt vermutlich zwischen den Klonen D und E.



**Abbildung 3.4:** Schema der Bruchpunktbestimmung (Abschluss).

### 3.3.2.2 Durchführung der Bruchpunktbestimmungen

Die DNA-Isolierung aus PAC- und BAC-Klonen und der DNase-Verdau der isolierten DNAs erfolgten wie unter 3.3.1.2.1.1 und 3.3.1.2.1.2 beschrieben. Die Sonden-DNAs wurden mit



ULS™ markiert wie unter 3.3.1.2.1.3 beschrieben. Zur Bestimmung der Bruchpunkte wurden die o. g. Sonden in Zwei- oder Drei-Farb-Hybridisierungen eingesetzt. Die Sonden der Zwei-Farb-Experimente wurden mittels dGreen-ULS® und Cy™3-ULS™, die dritte Sonde der Drei-Farb-Experimente wurde mit Cy™5-ULS™ markiert. Es wurden für jede Sonde 250ng DNA zur Markierung verwendet. Die Fällung ist weitestgehend in 3.3.1.2.1.4 erläutert. Da in den Bruchpunktbestimmungen aber DNA-Mengen unter einem Mikrogramm markiert werden mussten, wurden zur Unterstützung der Fällung noch DNA aus Heringsspermien (DNA MB grade, fish sperm DNA) sowie tRNA aus Hefe (yeast tRNA) zugefügt. Beide wurden in 50-fachem Überschuss zur markierten DNA gegeben. Die Hybridisierung, Stringenzwaschungen und Auswertung erfolgten wie unter 3.3.1.2.2.1 beschrieben.

### 3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der phänotypischen Daten von Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenaberrationen wurde der **Chi-Quadrat-Test** ( $\chi^2$ -Test) angewendet. Dieser Test ermöglicht die Prüfung auf Übereinstimmung bei zwei oder mehr Verteilungen, an die nahezu keine Bedingungen (wie z. B. normalverteilte Daten) gestellt werden. Die Nullhypothese dieses Tests lautet: „Die geprüften Verteilungen entstammen der gleichen Grundgesamtheit.“ Für die vorliegenden Untersuchungen bedeutet das: Es gibt keinen Unterschied bei Patienten mit und ohne Subtelomeraberrationen für bestimmte, analysierte Parameter. Die Prüfgröße  $\chi^2$  erlaubt, die *Wahrscheinlichkeit P* dafür abzuschätzen, dass die Nullhypothese vermutlich gilt. Kleine P-Werte ( $\leq 0,05$ ) bedeuten, dass die Nullhypothese signifikant zurückgewiesen wird, große P-Werte bestätigen sie. In der vorliegenden Arbeit heißt das: P-Werte  $\leq 0,05$  bedeuten, dass es für den jeweils analysierten Parameter bei Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenaberrationen signifikante Unterschiede gibt. Größere P-Werte zeigen an, dass keine signifikanten Unterschiede bestehen. Darüber hinaus gilt: Je größer  $\chi^2$  ist, desto kleiner ist der P-Wert (die Wahrscheinlichkeit) zur Bestätigung der Nullhypothese und umgekehrt.

Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software SPSS für Microsoft® Windows.

### 3.5 Materialien und Geräte

#### 3.5.1 Chemikalien und Lösungen

Agarose	GIBCO BRL, 15510-027
Ammoniumazetat	Merck, 1.01116.1000
Bacto-Tryptone	Becton Dickinson 211705

---

Bacto-Yeast	Becton Dickinson 212750
Blocking Reagent	BR, Roche, 1096176
Bromphenolblau	Merck, 1.59102.0001
BSA	Bovine Serum Albumine, DNase-frei, Pharmacia Biotech, 27-8915
Chloramphenicol	12,5mg/ml; water-soluble, Sigma, C3175, Gebrauchslösung: 0,0125mg/ml LB-Medium
Citifluor AF1	Glycerol/PBS, Plano GmbH, R1320
Cot1-DNA	1mg/ml, human, Roche, 1581074
Cy <sup>TM</sup> 3-ULS <sup>TM</sup>	Cy3 ULS Labelling Kit, Amersham Biosciences, RPN 3120 oder Kreatech Diagnostics, ULK102
Cy <sup>TM</sup> 5-ULS <sup>TM</sup>	Cy5 ULS Labelling Kit, Amersham Biosciences, RPN 3121 oder Kreatech Diagnostics, ULK103
DAPI-Lösung	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol, Stammlösung: 10mg/ml (Sigma, D9542), Gebrauchslösung: 1:10.000 Verdünnung
Denaturierungslösung 1	70% Formamid/ 2xSSC, pH 7,0
Denaturierungslösung 2	60% Formamid/2xSSCp, pH 7,0
Dextransulfat	50%; Amersham Biosciences, 17-0340-01
dGreen-ULS <sup>®</sup>	dGreen Direct Labelling Kit, Qbiogene, DLKG 04 oder Kreatech Diagnostics, ULK301
DNA, MB grade	10mg/ml, aus Fischsperma, Roche, 1467140
DNaseI-Lösung	~2000units/mg, Roche, 104159; Stammlösung 1mg/ml; Gebrauchslösung: 1:5000 Verdünnung
DNP-ULS <sup>®</sup>	ULYSIS DNP-ULS, Kreatech Diagnostics, ULK1003
EB-Puffer	10mM Tris/HCl, pH 8,5
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Sigma, EDS
Eisessig	Merck, 1.00063.2511
Ethanol	Merck, 1.00983.2511
Ethidiumbromid	Sigma, E4391
Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biosciences, 170400-02
Fixogum	Marabuwerke GmbH, 290117000
Formaldehyd	37%, Merck, 1.04001.1000
Formamid	Merck, 1.09684.2500 (ggf. Entionisierung: Amberlite Typ MB1 (Korngröße 20-25), Serva AG, 40701)
Glyzerol	Sigma, G2025

Goat anti rabbit	LaserPro™ IR 790 goat anti rabbit IgG, Molecular Probes, L-11044
Hybridisierungslösung	60% Formamid/ 2xSSCp/ 10%Dextransulfat
Kaliumazetat	Merck, 1.04820.1000
Kanamycin	20mg/ml; GIBCO BRL, 11815-032, Gebrauchslösung: 0,02mg/ml LB-Medium
Ladepuffer	2,5xTBE/20% Ficoll/0,1% Bromphenolblau
Längenstandard	100 bp DNA Ladder, GIBCO BRL, 15628-019
LB-Medium	10g Bacto-Tryptone + 5g Bacto-Yeast + 10g NaCl in 1l aqua dest., autoklavieren
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub> , Merck, 8.14733.0500
Natriumchlorid	NaCl, Merck, 1.06404.5000
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck, 6346.1000
di-Natriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Merck, 1.06586.0500
Natriumhydroxid	NaOH, Merck, 1.06495.1000
NP-40 (syn. Igepal)	Vysis, 30-804820
NP-Puffer	10x, 500mM Tris/HCl (pH7,5), 50mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5mg/ml BSA
P1-Lösung	10mM EDTA, pH 8,0
P2-Lösung	0,2M NaOH, 1% SDS
P3-Lösung	50ml 7,5M Kaliumazetat, 23ml Eisessig, 427ml aqua dest.
10xPBS	10x Phosphate Buffered Saline, Roche, 1666789
Pepsin	10% (in 2xSSC), Roche, 108 057
Pepsinlösung:	5µg Pepsin/0,01M HCl
Phenol	Tris-gesättigte Lösung, ICN Biomedicals, 802518
Phytohämagglutinin	PHA, H15, Murex, 30852701
Postfixierungslösung	2,7ml 37% Formaldehyd + 97,3ml 1xPBS/50mM MgCl <sub>2</sub>
2-Propanol	Isopropanol, Merck 1.09634.2511
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, 28106
Rabbit anti DNP	Sigma, D9656
RNase A	DNase-frei, Roche, 109169 <i>für die Vorbehandlung:</i> 20mg/ml 2xSSC; <i>Gebrauchslösung:</i> 1:200 Verdünnung in 2xSSC <i>für die DNA-Isolation:</i> 10mg/ml 2xSSC zum Gebrauch
Salzsäure	HCl, Merck, 1.09057.1000
Sodium-Dodecylsulfat	SDS, Serva, 20783

20xSSC	20x Saline Standard Citrate, Invitrogen, 15557-036
2xSSCp	2xSSC, 0,5M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,0
10xTBE-Puffer	GIBCO BRL, 15581-036
10xTBS	10x Tris Buffered Saline, 1M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,5
10:50 TE-Puffer	10mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM EDTA, pH 8,0
50:50 TE-Puffer	50mM Tris/HCl, pH 7,5; 50mM EDTA, pH 8,0
TNT	1xTBS/0,05%Tween
ToTelVysion™	Multi-color FISH Probe Panel, Vysis, 33-270000
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Serva, 37190
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitan-Monolaureate, Sigma, 1379
Waschlösung 1	0,4xSSC/0,3% NP-40, pH 7,0
Waschlösung 2	2xSSC/0,1% NP-40, pH 7,0
Waschlösung A	2xSSC/0,1% Tween
Waschlösung B	50% Formamid/2xSSC
Waschlösung C	0,1xSSC
Yeast tRNA	10mg/ml 2xSSC, Roche, 109223

### 3.5.2 Geräte

Brutschrank	B6060, Heraeus
Gelektrophoresekammer	Max Submarine Agarose Gel Unit, Modell HE, Hoefer Scientific, San Francisco, USA
Magnetrührer mit Heizung	BibbyStuart, Bibby, Sterlin, Staffordshire, UK
Mikroskop und Zubehör:	
<i>Fluoreszenzmikroskop:</i>	Axioplan, Zeiss
<i>Filter:</i>	
- <u>DAPI</u> :	MC-0 (DAPI) Filterset aus: Anregungsfilter D360/50 Strahlenteiler 400 DCLP Sperrfilter D 470/40
- <u>SpectrumGreen/dGreen-ULS®</u> :	HQ-Filterset für Cy2 sel. aus: Anregungsfilter HQ 480/40 Strahlenteiler Q 505 LP Sperrfilter HQ 527/30
- <u>SpectrumOrange/Cy™3-ULS™</u> :	HQ-Filterset für Cy3 aus: Anregungsfilter HQ 545/30 Strahlenteiler Q 570 LP

---

	Sperrfilter HQ 610/75
- <u>Cy<sup>TM</sup>5-ULS<sup>TM</sup></u> :	HQ-Filterset für Cy5 aus: Anregungsfilter HQ 620/60, Strahlenteiler Q 660 LP, Sperrfilter HQ 700/75
- <u>SpectrumAqua</u> :	Filterset für DEAC (Aqua) aus: Anregungsfilter D 436/20 Strahlenteiler 455 DCLP Sperrfilter D 480/30
alle Filter:	AHF Analysetechnik AG
<i>Kamera</i>	Sensys-CCD, Photometrics, Tucson, USA
<i>Software</i>	Cytovision 2.81, Firma Applied Imaging.
<b>Photometer</b>	GeneQuant pro, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
<b>Reagenzglasschüttler</b>	MELB 1719, Merck eurolab
<b>Schüttelinkubator</b>	Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
<b>Thermocycler</b>	PTC-200, MJ Research
<b>Thermomixer</b>	Comfort, Eppendorf
<b>Waage</b>	A120S, Satorius Analytic, Göttingen
<b>Wasserbäder</b>	WB22 mit Schüttelvorrichtung, Memmert
<b>Zentrifugen und Zubehör:</b>	
<i>Ultrazentrifuge</i>	RC 5B Plus, Sorvall
<i>Rotoren</i>	GSA-Rotor, 6 x 250, Sorvall SS34-Rotor, 8 x 50, Sorvall
<i>Zentrifugationsgefäße</i>	250ml, Polyethylen Oak Ridge Bottle, Sorvall 50ml, Polyethylen Oak Ridge Bottle, Sorvall
<i>Kühlzentrifuge</i>	5417 R, Eppendorf

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Analysen des konsekutiven Untersuchungskollektivs

In den folgenden Abschnitten werden die klinischen Daten des konsekutiven Untersuchungskollektivs zusammengestellt. Dabei werden besonders die so genannten „Checkliste“-Kriterien (de Vries et al., 2001; vgl. Kapitel 2.1.4) berücksichtigt. Dazu zählen Familiarität der mentalen Retardierung, prä- und postnatale Wachstumsanomalien, Dysmorphien sowie kongenitale Fehlbildungen. Darüber hinaus werden das Geschlechterverhältnis, die Schweregrade der mentalen Retardierung, Anfallsleiden, Verhaltensauffälligkeiten sowie Funktionsstörungen der Sinnessysteme bei den Patienten und Aborte bei den Müttern der Patienten erfasst.

#### 4.1.1 Alter, Geschlecht, psychomotorische Entwicklung und Anfallsleiden

Das Untersuchungskollektiv umfasste 76 konsekutiv analysierte Patienten mit mentaler Retardierung (vgl. Tabelle 3.1). Alle Patienten, die im Humangenetischen Institut der Universität Bonn konventionell zytogenetisch untersucht wurden, wiesen bei einer Auflösung von 400-550 Banden/Genom einen normalen Karyotyp auf. Ein Fragiles X (FraX) -Syndrom als zweithäufigste Ursache von mentaler Retardierung wurde für 66 der Patienten (86,8%) molekulargenetisch ausgeschlossen. Bei weiteren zehn Patienten (13,2%) wurde das Vorliegen eines FraX-Syndroms aufgrund der fehlenden klinischen Symptomatik ausgeschlossen und nicht untersucht.

Das Alter der Patienten reichte von zwei bis 37 Jahren. Der Mittelwert lag bei neun, der Median bei acht Jahren.

Geschlechterverteilung: Im gesamten Bonner Kollektiv, das 205 Patienten mit mentaler Retardierung beinhaltete, waren 122 männliche (59,5%) und 83 weibliche (40,5%) Probanden. Unter den 76 konsekutiv untersuchten Patienten waren 45 männlich (59,2%) und 31 weiblich (40,8%). Damit waren sowohl im Gesamtkollektiv als auch im konsekutiven Untersuchungskollektiv mehr männliche als weibliche MR-Patienten.

Psychomotorische Entwicklung: Alle 76 Patienten der konsekutiven Untersuchungsgruppe waren mental retardiert. Bei 46 Patienten (60,5%) wurde eine mittlere/schwere mentale Retardierung diagnostiziert und bei 30 Patienten (39,5%) eine leichte. Eine Verzögerung der motorischen Entwicklung kam bei 73 der Patienten (96,1%) hinzu. Ferner wiesen 27 Patienten (35,5%) eine Muskelhypotonie und 5 Patienten (6,6%) eine Muskelhypertonie auf. Verhaltensauffälligkeiten wie Autoaggression oder Autismus wurden bei zehn Patienten (13,2%) nachgewiesen.

Ein weiterer Parameter, der in den eigenen Untersuchungen erfasst wurde, war „Anfallsleiden“. Darunter litten 16 (21,1%) der 76 analysierten Patienten. De Vries et al. (2001) untersuchten dieses Merkmal nicht.

Die Verteilung der MR-Patienten in Gruppen aus den möglichen Kombinationen von motorischer Retardierung (M), Verhaltensauffälligkeiten (V) und Anfallsleiden (A) zeigt Tabelle 4.1.

	M+/V+/A+	M+/V-/A+	M+/V+/A-	M+/V-/A-	M-/V+/A-	M-/V-/A-
$\Sigma$	4	14	5	50	1	2
%	5,3	18,4	6,6	65,8	1,3	2,6

**Tabelle 4.1:** Einordnung der MR-Patienten in Gruppen. Die Konstellationen M-/V+/A+ und M-/V-/A+ wurden nicht beobachtet.

M = motorische Retardierung, V = Verhaltensauffälligkeit, A = Anfallsleiden; + = vorhanden, - = fehlt

Der mit 65,8% überwiegende Teil der Patienten zeigte neben der mentalen Retardierung eine Verzögerung der motorischen Entwicklung, jedoch keine Anfälle und keine Verhaltensauffälligkeiten. In 18,4% der Fälle lag neben der motorischen Retardierung ein Anfallsleiden ohne Verhaltensanomalien vor, bei 6,6% eine Verhaltensanomalie, aber kein Anfallsleiden. Patienten mit motorischer Retardierung, Verhaltensauffälligkeiten und Anfallsleiden machten 5,3% des konsekutiven Untersuchungskollektivs aus. Patienten mit einer unauffälligen Motorik zeigten entweder keine sonstigen Auffälligkeiten (2,6%) oder aber eine Verhaltensanomalie (1,3%, ein Proband). Patienten mit einer unauffälligen motorischen Entwicklung, die aber ein Anfallsleiden oder eine Kombination aus Anfallsleiden und Verhaltensauffälligkeiten zeigten, gab es in der konsekutiv untersuchten Gruppe nicht.

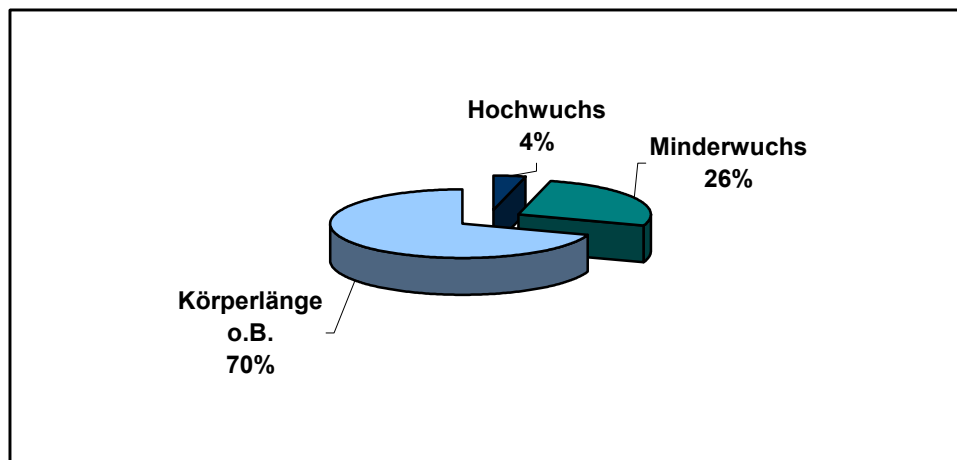
#### 4.1.2 Wachstumsparameter

Zur Analyse der Wachstumsparameter im konsekutiven Untersuchungskollektiv wurde zunächst das Geburtsgewicht (GG) erfasst, um eine pränatale Dystrophie zu ermitteln. Das Geburtsgewicht wurde dabei dem jeweiligen Gestationsalter angepasst. Von den 76 analysierten Patienten zeigten 17 eine pränatale Dystrophie (22,4%) und 59 (77,6%) ein normales Geburtsgewicht.

Von den 17 Patienten, die bei Geburt dystroph waren, zeigten 10 Probanden bei der letzten Untersuchung ein normales Gewicht, die restlichen sieben Patienten lagen mit ihrem Gewicht weiterhin unter der dritten Perzentile. Sechs Patienten, die mit einem normalen Gewicht zur Welt kamen, entwickelten bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt eine Dystrophie.

Im Rahmen der genetischen Beratung wurde die aktuelle Körperlänge der Patienten bestimmt. Von 76 untersuchten Patienten waren 20 (26,3%) minderwüchsig und drei

Probanden wiesen einen Hochwuchs auf (4%). Mit ihren Körpermaßen im Normbereich, also zwischen der 3. und 97. Perzentile, lagen 53 Patienten (69,7%) (vgl. Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** Prozentuale Verteilung der aktuellen Körpermaße im konsekutiven Untersuchungskollektiv (Werte gerundet).

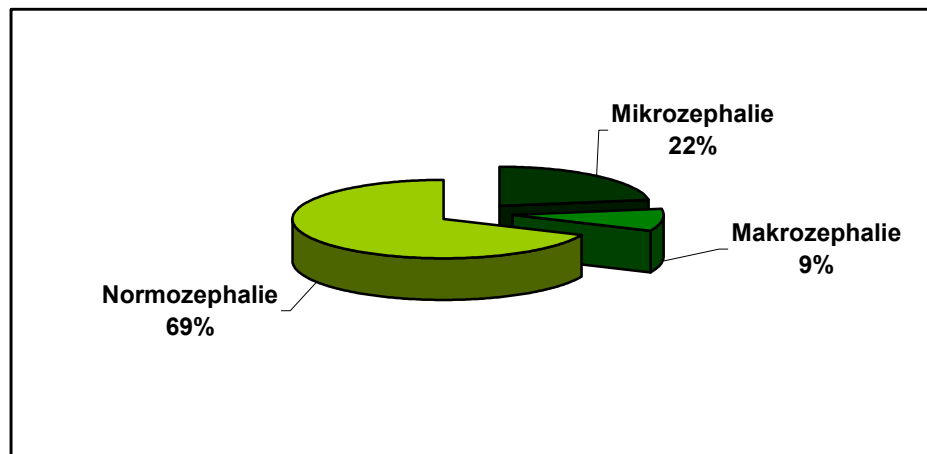
Bei der Erfassung physischer Daten von Patienten mit mentaler Retardierung spielt auch der häufig auffällige Kopfumfang eine Rolle. Unter den 76 Patienten wiesen zum Untersuchungszeitpunkt 17 eine Mikrozephalie auf (22,4%). Bei Geburt waren acht Patienten mikrozephal, zwei dieser Probanden zeigten in der letzten Untersuchung einen normalen Kopfumfang, sechs Patienten lagen mit ihren Kopfumfängen weiterhin unter der dritten Perzentile. Elf der Patienten, die in der letzten Untersuchung eine Mikrozephalie aufwiesen, hatten bei ihrer Geburt eine Normozephalie.

Alle sieben Patienten (9,2%), die zum letzten Untersuchungszeitpunkt eine Makrozephalie hatten, wurden mit einem normalen Kopfumfang geboren. Ein Proband, der mit einer Makrozephalie geboren wurde, hatte bei der letzten Messung einen unauffälligen Kopfumfang.

Bei 52 Patienten wurde eine Normozephalie bestimmt (68,4%).

Die Verteilung der aktuellen Mikro- und Makrozephalien ist in Abbildung 4.2 den unauffälligen Kopfumfängen im Kollektiv gegenübergestellt.



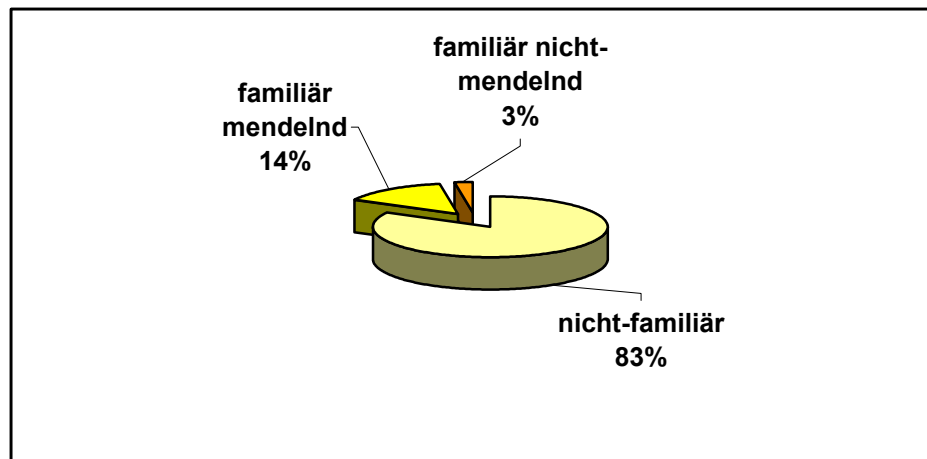


**Abbildung 4.2:** Prozentuale Verteilung der Mikro-, Makro- und Normozecephalien im konsekutiven Untersuchungskollektiv (Werte gerundet).

#### 4.1.3 Auffälligkeiten in den Familien

Für die Familie jedes Probanden wurde ein Stammbaum erstellt. Erfasst wurden alle lebend geborenen Angehörigen aus drei Generationen. Daneben wurden, wenn möglich, alle pathologischen Schwangerschaften, d. h. Aborte, Fehlgeburten und Totgeburten, dokumentiert. Es wurde außerdem eine eventuelle Verwandtschaft der Eltern der Probanden erhoben. Als relevante Auffälligkeiten der Angehörigen wurden mentale Retardierung, Verhaltensauffälligkeiten, angeborene Fehlbildungen und Dysmorphien dokumentiert.

Zunächst wurde so zwischen familiären und de novo MR-Fällen differenziert (vgl. Abbildung 4.3). Bei 63 Patienten oder 82,9% der Fälle war der untersuchte Proband der einzige Betroffene in der Familie, in 17,1% der Fälle (13 Patienten) waren weitere Familienangehörige mental retardiert. Darunter konnte in den Familien von 11 Patienten (14,5%) ein mit den Mendelschen Regeln vereinbarer Erbgang aufgezeigt werden. In den Familien von zwei Patienten (2,6%) lag eine nicht-mendelnde Vererbung der mentalen Retardierung vor. Eine Verwandtenehe wurde bei den Eltern eines Patienten türkischer Herkunft festgestellt, der zu den nicht-familiären MR-Fällen zählte. Für alle weiteren Familien der MR-Patienten wurde keine Konsanguinität nachgewiesen.



**Abbildung 4.3:** Prozentuale Verteilung der familiären und nicht-familiären MR-Fälle im konsekutiven Untersuchungskollektiv (Werte gerundet).

Pathologische Schwangerschaften (Aborte, Tot- und Fehlgeburten) der Mütter der Patienten mit mentaler Retardierung traten im eigenen Untersuchungskollektiv bei 21 der 76 analysierten Fälle (27,6%) auf.

De Vries et al. (2001) untersuchten zwar auch, ob pathologische Schwangerschaften in den Familien der MR-Patienten auftraten, dieser Parameter wurde jedoch nicht in die „Checkliste“ aufgenommen.

#### 4.1.4 Geburts- und Schwangerschaftsanamnese

Zur Erfassung möglicher prä- und perinataler Einflüsse auf den Zustand der MR-Patienten wurden Schwangerschafts- und Geburtsanamnesen erhoben.

Auffälligkeiten in der Schwangerschaft waren ein Polyhydramnion bzw. ein Oligohydramnion in je einem Fall und eine behandlungsbedürftige vorzeitige Wehentätigkeit in einem weiteren Fall. Die Mutter eines Patienten war Epileptikerin und nahm Carbamazepin ein, welches jedoch nach heutigem Wissen keine teratogenen Nebenwirkungen hat.

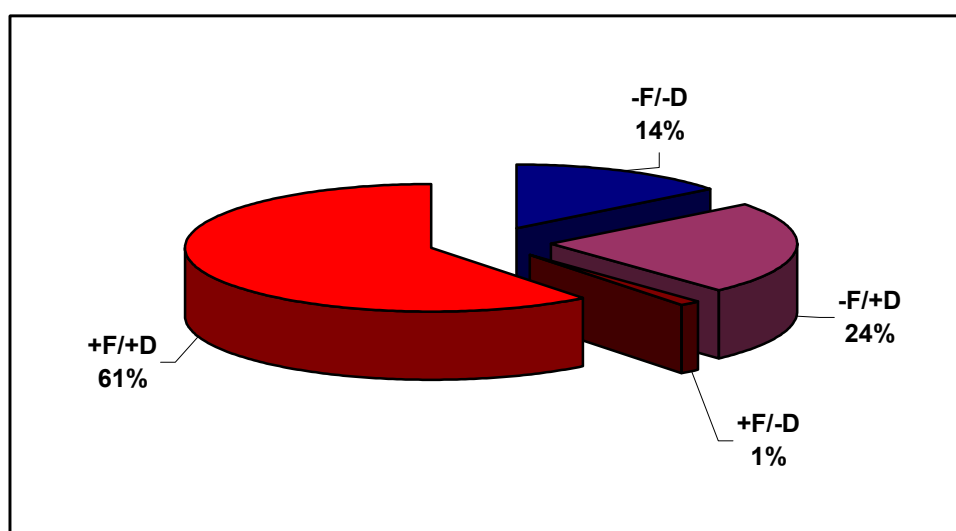
Von den 76 konsekutiv untersuchten Patienten wurden 19 (25%) per Sectio und 57 (75%) normal entbunden. Von den 19 Patienten, die mit einem Kaiserschnitt zur Welt gebracht wurden, lag in 10 Fällen eine pathologische Ursache wie Nabelschnurumschlingung, Plazentainsuffizienz, Geburtsstillstand oder schlechte Herztöne des Kindes vor. Alle weiteren Sectio-Geburten wurden aufgrund obstetrischer Probleme, wie z. B. Beckenendlage des Kindes oder vorherige Sectio-Geburten der Mutter, durchgeführt.

Sechs der 76 Kinder im Untersuchungskollektiv entwickelten nach ihrer Geburt eine Hyperbilirubinämie, drei weitere Neugeborene erlitten kurz nach der Geburt einen Infekt, der antibiotisch behandelt wurde.

#### 4.1.5 Kongenitale Fehlbildungen und Dysmorphien

Bei den Trägern chromosomaler Syndrome ist die Erfassung von Dysmorphien, also morphologischen Abweichungen von der Norm ohne Krankheitswert, ebenso von Bedeutung wie die von Fehlbildungen, d. h. Veränderungen mit Krankheitswert. Abbildung 4.4 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus Fehlbildungen und Dysmorphien im konsekutiven Untersuchungskollektiv. Diese Kombinationen sind:

1. weder Fehlbildungen noch Dysmorphien (-F/-D),
2. keine Fehlbildungen, jedoch Dysmorphien (-F/+D),
3. Fehlbildungen, keine Dysmorphien (+F/-D) und
4. sowohl Fehlbildungen als auch Dysmorphien (+F/+D).



**Abbildung 4.4:** Prozentuale Verteilung der Dysmorphien und Fehlbildungen im konsekutiven Untersuchungskollektiv (Werte gerundet).

-F/-D = weder Fehlbildungen /noch Dysmorphien, -F/+D = keine Fehlbildungen/jedoch Dysmorphien, +F/-D = Fehlbildungen/keine Dysmorphien, +F/+D = Fehlbildungen und Dysmorphien

Von den 76 untersuchten Patienten zeigten 11 weder Dysmorphien noch Fehlbildungen (14,5%), 18 Patienten wiesen keine Fehlbildungen, jedoch Dysmorphien auf (23,7%). Ein Proband war fehlgebildet, ohne Dysmorphien aufzuweisen (1,3%). Sowohl Fehlbildungen als auch Dysmorphien zeigten 46 Patienten (60,5%).

Als Auffälligkeiten der Patienten des konsekutiven Untersuchungskollektivs wurden erfasst: Pathologische Schädelform (Brachy-/Dolichocephalie etc.), Gesichtsspalten (Lippen-Kiefer-Gaumenspalte etc.), Hals-/Thorax-/Abdomenanomalien (Trichterbrust etc.), Extremitätenfehlbildungen (Polydaktylie etc.), und Organfehlbildungen (Herz, Gehirn, Urogenitalsystem). Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der Häufigkeiten dieser Anomalien, zu denen sowohl Fehlbildungen als auch Dysmorphien zählen.

	Schädel			Hals/ Thorax/ Abdomen	Extremi- täten	Organfehlbildungen		
	Faziale Dysmor- phien	Form- anomalien	Gesichts- spalten			Gehirn	Herz	Uro- genital
$\Sigma$	61	7	5	3	2	17	20	17
%	80,3	9,2	6,6	3,9	2,6	22,4	26,3	22,4

**Tabelle 4.2:** Absolute Häufigkeiten und Prozentangaben der einzelnen Fehlbildungen und Dysmorphien im konsekutiven Untersuchungskollektiv.

Faziale Dysmorphien wiesen 61 der 76 analysierten Patienten (80,3%) auf. Schädelformanomalien wurden bei sieben der 76 untersuchten Patienten (9,2%) diagnostiziert, darunter hatten fünf Patienten eine Brachyzehalie (Rundkopf mit abgeflachtem Hinterkopf) und je ein Patient eine Dolichozehalie (Langschädel) und eine milde Akrozehalie (Turmschädel). Gesichtsspalten als Fehlbildungen lagen bei fünf Patienten (6,6%) vor, zwei Patienten zeigten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKG-Spalte), Gaumenspalten wurden bei drei Patienten beobachtet.

Auffälligkeiten an Hals, Thorax oder Abdomen zeigten drei Patienten (3,9%), zwei Patienten hatten eine ausgeprägte Trichterbrust und ein Patient wies eine Zyste am Hals auf. Extremitätenfehlbildungen wurden bei zwei Patienten (2,6%) nachgewiesen. Ein Patient wies eine postaxiale Polydaktylie auf, ein weiterer Patient hatte eine Fußfehlbildung.

Organfehlbildungen wurden bei 37 Patienten (48,7%) diagnostiziert. Herzfehler, die bei 20 Patienten beobachtet wurden (26,3%), traten dabei am häufigsten auf, Gehirnfehlbildungen wurden bei 17 Patienten (22,4%) diagnostiziert. Fehlbildungen des Urogenitalsystems lagen bei 17 Patienten vor (22,4%), dazu zählten zehn Genitalfehlbildungen.

Es wurden auch Funktionsstörungen der Augen und Ohren der Probanden erfasst. Von den 76 konsekutiv untersuchten Patienten hatten 19 Patienten eine Sehstörung (25%) und acht Patienten eine Hörstörung (10,5%).

Tabelle A4 im Anhang zeigt detailliert die Anomalien, die bei den einzelnen Patienten nachgewiesen wurden.

#### 4.1.6 Anwendung der „Checkliste“-Kriterien auf das konsekutive Untersuchungskollektiv

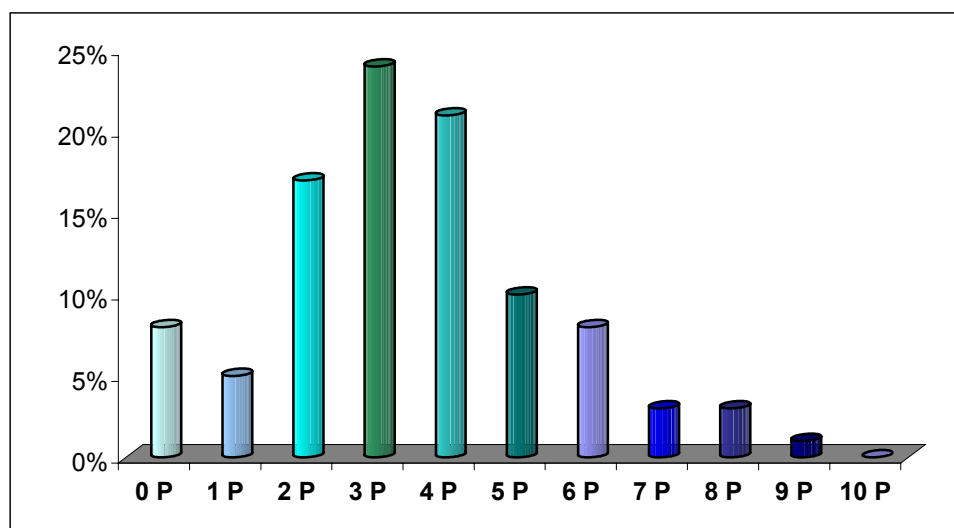
De Vries et al. erstellten eine so genannte „Checkliste“, die laut ihrer im Jahr 2001 publizierten Studie gehäuft bei Patienten mit subtelomerischen Chromosomenstörungen aufgefundene Merkmale von MR-Patienten in einem Punktesystem bewertet. Das Ziel dabei war, eine Vorauswahl derjenigen MR-Patienten zu treffen, für die ein Subtelomer-Screening besonders viel versprechend ist (vgl. Kapitel 2.1.4).

So werden für familiäre mentale Retardierung, abhängig davon, ob die Fälle den Mendelschen Regeln entsprechen oder nicht, ein bzw. zwei Punkte vergeben. Pränatale Wachstumsretardierung bzw. Dystrophie ergeben zwei Punkte und postnatale Wachstumsauffälligkeiten, zu denen Mikro- und Makrozephalie sowie Hoch- und Minderwuchs zählen, jeweils einen Punkt. Beim Vorliegen von zwei fazialen Dysmorphien wird ein Punkt vergeben, ein weiterer Punkt bei mehr als zwei fazialen Dysmorphien. Nicht-faziale Dysmorphien und kongenitale Fehlbildungen, die Handanomalien, Herzfehler und Hypospadie beinhalten, führen ebenfalls zu einer maximalen Punktezahl von zwei (vgl. Tabelle 2.1). So kann bei Erfüllung aller Kriterien eine Höchstpunktzahl von zehn erreicht werden.

Dieses Punktesystem wurde auf das konsekutive Untersuchungskollektiv angewendet (vgl. Tabelle A5 im Anhang). Es wurden im Durchschnitt 3,5 Punkte erreicht, der Median lag bei 3 Punkten. Tabelle 4.3 zeigt eine Übersicht über die Häufigkeiten der erzielten Punkte nach de Vries et al. (2001), Abbildung 4.5 stellt sie graphisch dar.

P*	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Σ	6	4	13	18	16	8	6	2	2	1	0
%	7,9	5,3	17,1	23,7	21,1	10,5	7,9	2,6	2,6	1,3	0

**Tabelle 4.3:** Absolute Häufigkeiten und Prozentangaben der Punkte (\*P) nach de Vries et al. (2001) im konsekutiven Untersuchungskollektiv.



**Abbildung 4.5:** Prozentuale Verteilung der Punkte nach de Vries et al. (2001) im konsekutiven Untersuchungskollektiv.

Es wurden null Punkte (sechs Patienten, 7,9%) bis neun Punkte (ein Patient, 1,3%) vergeben, zehn Punkte wurden nicht verteilt. Einen Punkt erhielten vier Patienten (5,3%) und zwei Punkte bekamen 13 Patienten (17,1%). Drei Punkte wurden an 18 Patienten (23,7%) und damit am häufigsten vergeben. Sechzehn Patienten erhielten vier Punkte (21,1%), acht

Patienten fünf (10,5%) und sechs Patienten sechs Punkte (7,9%). An je zwei Patienten (2,6%) wurden sieben bzw. acht Punkte vergeben.

#### 4.2 Einordnung der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten

Sechs Patienten wurden nicht-konsekutiv analysiert (vgl. Tabelle 3.1, Patienten 77-82). Die Gründe für diese nicht-konsekutiven Untersuchungen waren eine gute Sedimentqualität zur Etablierung der Untersuchungsmethoden bei den Patienten 79, 80 und 81 sowie eine weitere Schwangerschaft der Mutter von Patient 78 und Anfragen von Fachärzten aus anderen humangenetischen Instituten (Patienten 77 und 82). Für vier der Patienten lagen Befunde der konventionellen Chromosomendiagnostik mit Bandenzahlen von über 400 Banden/haploidem Genom vor, für diese Patienten gab es auch negative FraX-Befunde. Von den verbleibenden zwei Patienten waren die Chromosomenanalysen in einem externen Labor unauffällig. Der Phänotyp entsprach nicht dem des FraX-Syndroms, so dass auf Zusatzuntersuchungen verzichtet wurde. Drei der sechs Patienten waren weiblich, drei waren männlich. Fünf dieser Patienten waren mittel bis schwer mental retardiert, einer der Patienten war nur leicht retardiert.

Tabelle 4.4 zeigt die Ergebnisse der Analyse der Wachstumsparameter bei den sechs nicht-konsekutiv untersuchten Patienten.

Patient	Dystrophie	Minderwuchs	Mikrozephalie
77	-	-	-
78	-	-	-
79	-	-	-
80	-	-	-
81	+	+	+
82	+	+	+

**Tabelle 4.4:** Wachstumsparameter der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten. Hochwuchs und Makrozephalie wurden im nicht-konsekutiven Untersuchungskollektiv nicht beobachtet.

+ = vorhanden, - = fehlt

Zwei Patienten des nicht-konsekutiven Untersuchungskollektivs waren bei Geburt dystroph. Die Analyse der aktuellen Wachstumsparameter der Patienten ergab in zwei Fällen einen Minderwuchs, in vier Fällen waren die Längenmaße normal. Ein Hochwuchs wurde bei keinem dieser Patienten festgestellt. Die beiden Patienten, die bereits durch Dystrophie und Minderwuchs auffielen, wiesen auch eine Mikrozephalie auf.

Eine positive Familiengeschichte für mentale Retardierung bestand bei einem Patienten (Patient 78). Ein Anfallsleiden wurde bei Patient 77 beobachtet, pathologische Schwangerschaften kamen bei den Müttern der sechs Patienten nicht vor.

Die Verteilung der möglichen Kombinationen von Dysmorphien und Fehlbildungen (vgl. Kapitel 4.1.5) bei den sechs nicht-konsekutiv untersuchten Patienten ist in Tabelle 4.5 dargestellt.

Patient	D-/F-	D+/F-	D-/F+	D+/F+	Von Fehlbildungen betroffene Organsysteme
77	-	-	+	-	Urogenitalsystem
78	-	-	-	+	Herz
79	+	-	-	-	-
80	-	+	-	-	-
81	-	+	-	-	-
82	-	-	-	+	Gehirn, Herz
<b>Σ</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	

**Tabelle 4.5:** Verteilung der Dysmorphien und Fehlbildungen bei den nicht-konsekutiv untersuchten Patienten.

D = Dysmorphien, F = Fehlbildungen, + = vorhanden, - = fehlt

Ein Patient wies weder Dysmorphien noch Fehlbildungen auf. Zwei Patienten zeigten zwar Dysmorphien, aber keine Fehlbildungen. Ein Patient litt unter einer Fehlbildung (Urogenitalsystem), Dysmorphien fehlten bei ihm. Zwei weitere Patienten hatten sowohl Dysmorphien als auch Fehlbildungen. Bei diesen beiden Patienten wurden Fehlbildungen des Herzens bzw. Fehlbildungen des Gehirns und des Herzens diagnostiziert.

### 4.3 Ergebnisse der FISH

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der FISH-Analysen vorgestellt. Dabei werden zunächst die Ergebnisse der Subtelomer-Screenings im konsekutiven Untersuchungskollektiv mit zwei verschiedenen Sondensets und drei FISH-Techniken beschrieben. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Analysen der sechs Patienten, die außerhalb der konsekutiven Reihenfolge auf subtelomerische Chromosomenaberrationen untersucht wurden, präsentiert.

#### 4.3.1 Ergebnisse der Analysen der subtelomerischen Chromosomenregionen im konsekutiven Untersuchungskollektiv

Von den 76 konsekutiv auf subtelomerische Chromosomenaberrationen untersuchten Patienten wurden 51 mit dem „ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel“ (Vysis) und 25 mit dem eigenen Sondenset analysiert (vgl. Kapitel 3.3.1). Unter den letztgenannten 25 Patienten waren sieben, die durch Subtelomer-COBRA-FISH untersucht wurden und 18, deren Analysen mit Subtelomer-Sechs-Farben-FISH durchgeführt wurden.

Insgesamt wurden sechs subtelomerische Chromosomenaberrationen detektiert. Bei vier der Patienten wurden diese mit dem „ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel“ (Vysis) nachgewiesen. Diese Aberrationen wurden mit Sonden des eigenen Sondensets verifiziert. Die Detektion von zwei weiteren Störungen der Subtelomerregionen erfolgte mit der Subtelomer-Sechs-Farben-FISH. Die Subtelomer-Screenings mittels Subtelomer-COBRA-FISH deckten keine Subtelomeraberrationen auf (vgl. Tabelle 4.6).

Methoden	ToTelVysion™	S-COBRA	Sechs-Farben-FISH
Anzahl Patienten	51	7	18
Aberrationen	4	-	2

**Tabelle 4.6:** Anzahl der mit der jeweiligen Untersuchungsmethode analysierten Patienten und Anzahl der detektierten Subtelomeraberrationen.

Tabelle 4.7 charakterisiert die subtelomerischen Chromosomenaberrationen näher. Es wurden vier Deletionen und zwei unbalancierte Translokationen nachgewiesen.

Patient	Methoden	Art der Aberration	Monosomie	Trisomie
27	6-Farben-FISH	Deletion	Yqter	-
29	ToTelVysion™	Deletion	14qter	-
34	6-Farben-FISH	Unbalancierte Translokation	2qter	5pter
35	ToTelVysion™	Deletion	2qter	-
37	ToTelVysion™	Unbalancierte Translokation	22qter	7qter
75	ToTelVysion™	Deletion	16pter	-

**Tabelle 4.7:** Beschreibung der subtelomerischen Chromosomenaberrationen im konsekutiven Untersuchungskollektiv.

Patient 27 wies nach Hybridisierung mit der Sonde GS-225F6, welche die Regionen Xqter und Yqter nachweist, eine Deletion auf seinem Y-Chromosom auf (Karyotyp: 46,XY,ish del (Y)(q12)(GS-225F6-), vgl. Abbildung 4.6).

Bei Patient 29 wurde mit der Sonde für 14qter des ToTelVysion™-Sondensets (vgl. Tabelle A1 im Anhang) eine Deletion 14qter nachgewiesen, die mit der Sonde GS-200D12 des eigenen Sondensets verifiziert wurde (Karyotyp: 46,XY,ish del (14)(q32)[[sts-X58399, SHGC-36156, sts-AA034492, telomeric IGHV segments]-, GS-200D12-), vgl. Abbildung 4.7).

Bei Patient 34 wurde mit den Sonden RG-172I13 und GS-24H17 für die Subtelomerregionen 2qter und 5pter eine unbalancierte Translokation mit dem Fehlen eines Signals der Sonde für 2qter und einem zusätzlichen Signal der Sonde für 5pter auf dem Ende des langen Armes des derivativen Chromosoms 2 detektiert (Karyotyp: 46,XY,ish der (2)t(2;5)(q37;p15)(RG-172I13-;GS-24H17+), vgl. Abbildung 4.8a und b).

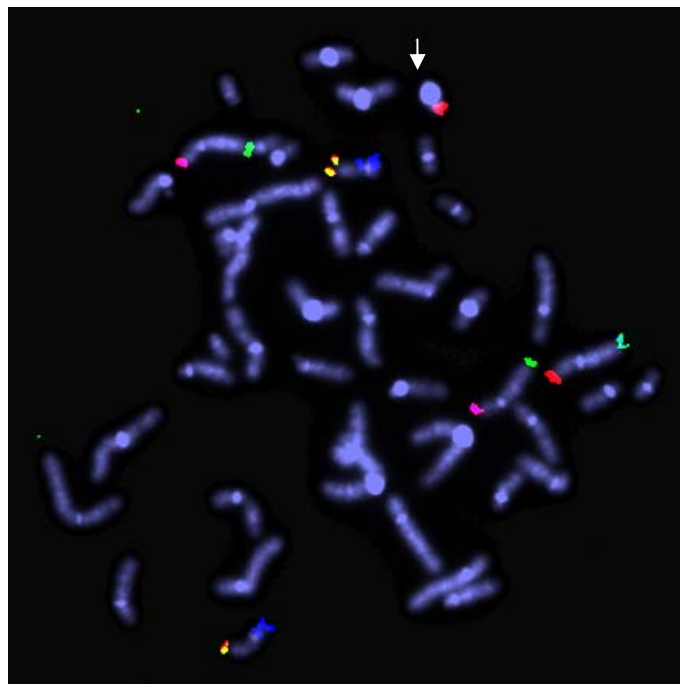
Patient 35 zeigte nach Hybridisierung mit der Sonde für 2qter des ToTelVysion™-Sondensets (vgl. Tabelle A1 im Anhang) eine Deletion im langen Arm von Chromosom 2.



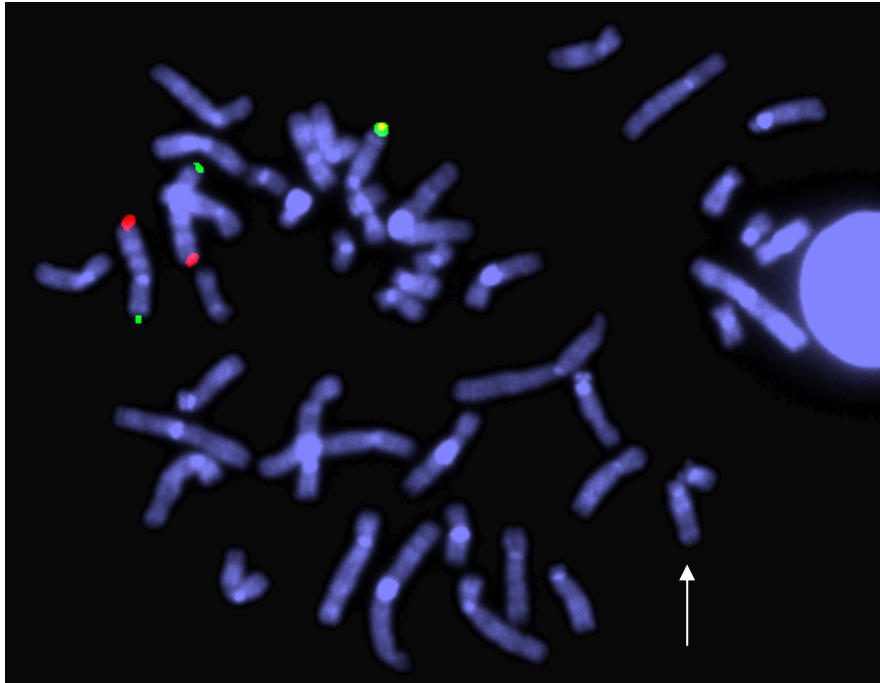
Diese Aberration wurde mit der Sonde RG-172I13 des eigenen Sondensets verifiziert (Karyotyp: 46,XX,ish del (2)(q37)([VIJ yRM2112 (D2S447), 2QTEL47]-, RG-172I13-), vgl. Abbildung 4.9).

Patient 37 war Träger einer unbalancierten Translokation, nachgewiesen mit den Sonden des ToTelVysion™-Sondensets (vgl. Tabelle A1 im Anhang) für die Subtelomerregionen 7qter und 22qter. Dabei fehlte ein Signal der Sonde für 22qter, die Sonde für 7qter hybridisierte zusätzlich zu den regulären Abschnitten noch terminal auf dem derivativen Chromosom 22. Die Translokation wurde auch im Verifizierungsexperiment mit den eigenen Sonden GS-3K23 und GS-99K24 nachgewiesen (Karyotyp: 46,XY,ish der (22)t(7;22)(q36;q13)([VYJ yRM2000 (STS 200H), 7QTEL20]+, GS-3K23+; [MS607 (GenBank X58044), ACR, 22QTEL31 (D22S1726)]-, GS-99K24-), vgl. Abbildung 4.10a und b).

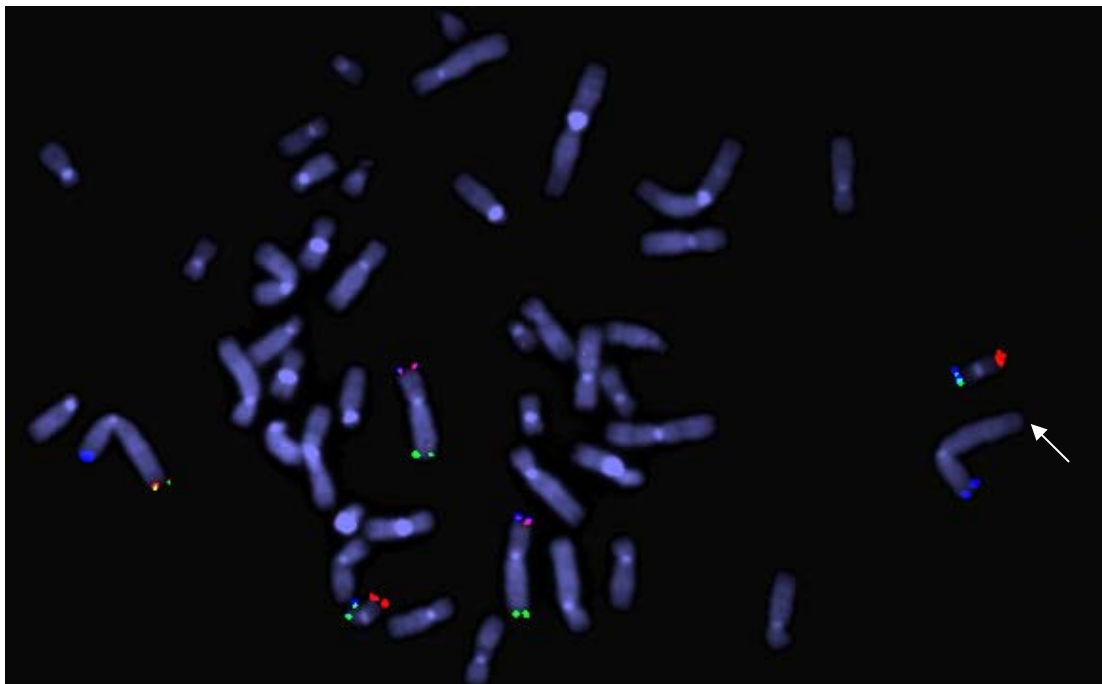
Patient 75 wies eine Deletion im terminalen Bereich des kurzen Armes von Chromosom 16 auf (Abbildung 4.11), detektiert mit der Sonde für 16pter des ToTelVysion™-Sondensets (vgl. Tabelle A1 im Anhang) und verifiziert mit der Sonde GS-12114 des eigenen Sondensets (Karyotyp: 46,XX,ish del (16)(p13) ([SHGC-15336, 16PTEL03 (D16S3399), 16PTEL05 (D16S3400), alpha globin gene cluster]-, GS-12114-)).



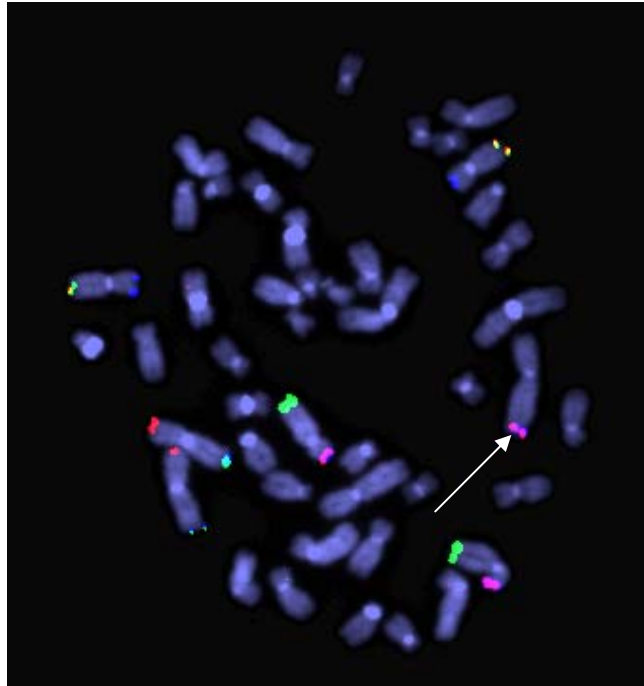
**Abbildung 4.6:** Nachweis einer Deletion in Yqter durch Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, Hybridisierung F bei Patient 27. Das Signal in Yqter fehlte (Pfeil). Regelrechte Signale in den Subtelomerregionen von 8p (*violett*), 8q (*grün*), 17p (*blau*), 17q (*gelb*) und XYpter (*rot*) sowie Xqter (*türkis*).



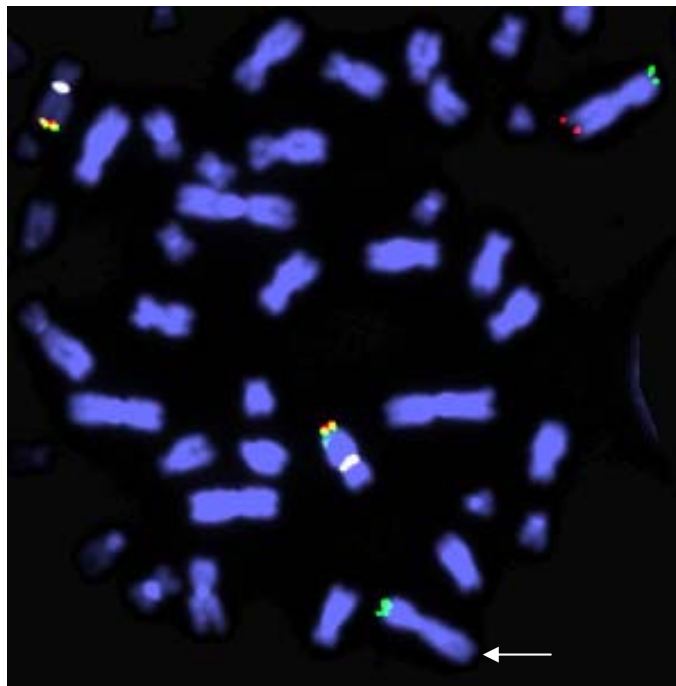
**Abbildung 4.7:** Nachweis einer Deletion 14qter durch *ToTelVysion™*-Hybridisierung mit Hybridisierungsmix 7 (#7) bei Patient 29. Ein Chromosom 14 zeigt ein regelrechtes Signal (*gelb*), der Pfeil zeigt das deletierte Chromosom 14. Regelrechte Signale in 7pter (*grün*) und 7qter (*rot*).



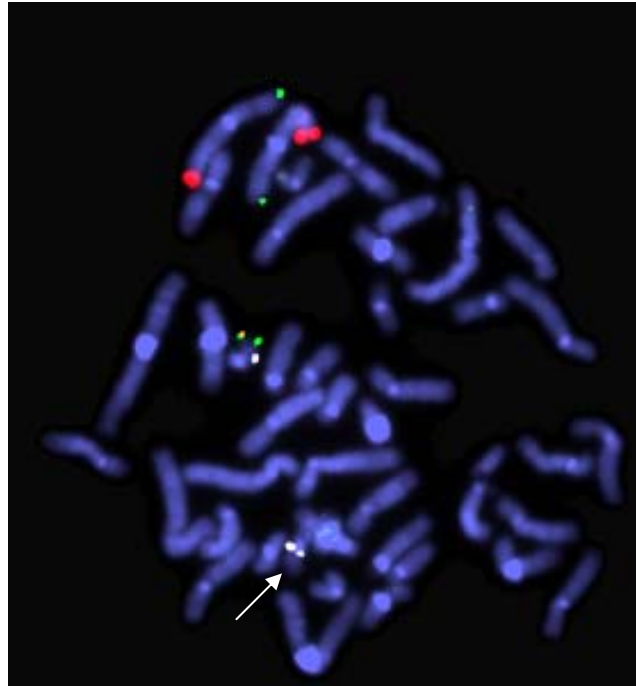
**Abbildung 4.8a:** Nachweis einer Deletion 2qter durch Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, Hybridisierung B bei Patient 34 (*der(2)t(2qter;5pter)*). Ein Chromosom 2 zeigt ein regelrechtes Signal in qter (*gelb*), der Pfeil zeigt auf die Deletion in 2qter. Regelrechte Signale in 6pter (*violett*), 6qter (*grün*), 19pter (*türkis*), 19qter (*rot*) und 2pter (*blau*).



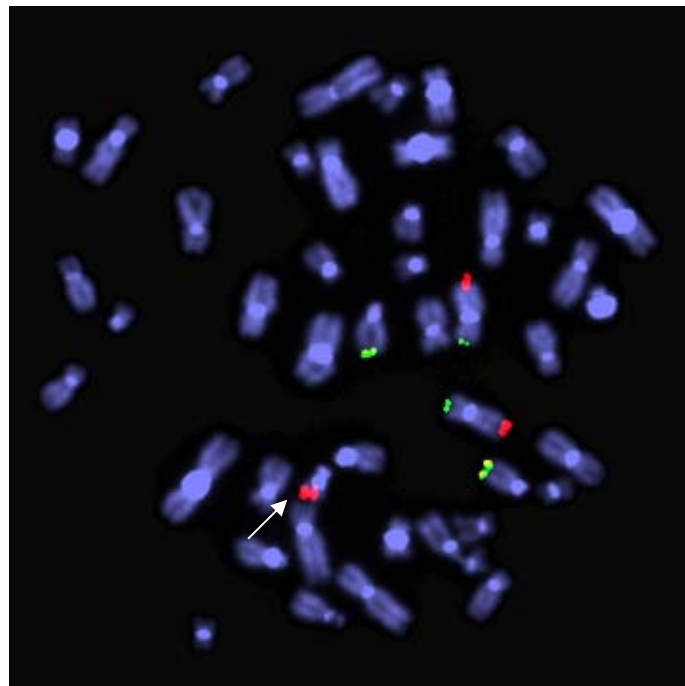
**Abbildung 4.8b:** Nachweis einer Duplikation 5pter durch Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, Hybridisierung A bei Patient 34 ( $\text{der}(2)t(2qter;5pter)$ ). Zusätzliches Signal für 5pter (*violett*) in 2qter (Pfeil). Regelrechte Signale in 3pter (*rot*), 3qter (*türkis*), 7pter (*blau*), 7qter (*gelb*), 5qter (*grün*) und 5pter (*violett*).



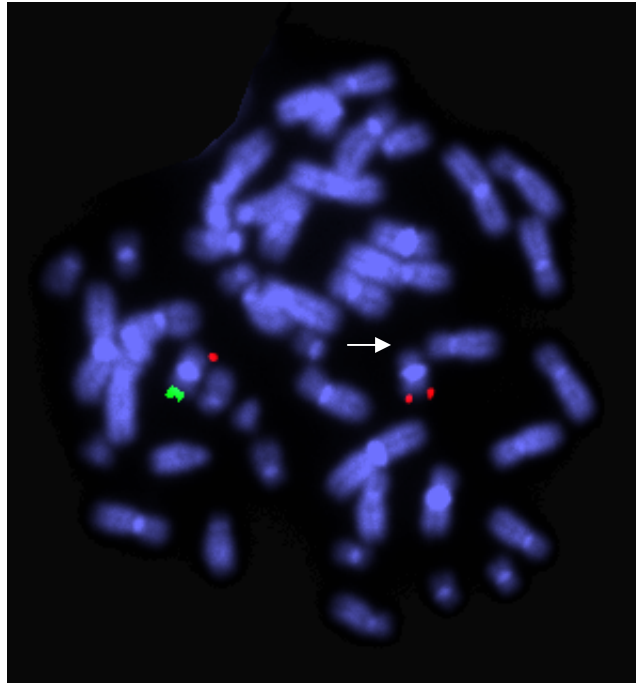
**Abbildung 4.9:** Nachweis einer Deletion 2qter durch *ToTelVysion™*-Hybridisierung mit #2 bei Patient 35. Ein Chromosom 2 zeigt ein regelrechtes Signal in qter (*rot*), der Pfeil weist auf die Deletion in 2qter des derivativen Chromosoms 2. Regelrechte Signale in Xqter (*gelb*), X-Zentromer (*weiß*, Kontrollsonde) und 2pter (*grün*).



**Abbildung 4.10a:** Nachweis einer Deletion 22qter durch *ToTelVysion™*-Hybridisierung mit #3 bei Patient 37 (der(22)t(7qter;22qter)). Ein Chromosom 22 zeigt ein regelrechtes Signal in qter (*gelb*), der Pfeil weist auf die Deletion 22qter des derivativen Chromosoms 22. Regelrechte Signale in 3pter (*grün*), 3qter (*rot*) und LSI BCR (*weiß*, Kontrolle in 22q11.2).



**Abbildung 4.10b:** Nachweis einer Duplikation 7qter durch *ToTelVysion™*-Hybridisierung mit #7 bei Patient 37 (der(22)t(7qter;22qter)). Zusätzliches Signal für 7qter (*rot*) in 22qter (*Pfeil*). Regelrechte Signale in 14qter (*gelb*), 7pter (*grün*) und 7qter (*rot*).



**Abbildung 4.11:** Nachweis einer Deletion 16pter durch *ToTelVysion™*-Hybridisierung mit #13 bei Patient 75. Ein Chromosom 16 zeigt ein regelrechtes Signal in pter (*grün*), die Pfeilspitze weist auf die Deletion im derivativen Chromosom 16. Regelrechte Signale in 16qter (*rot*).

#### 4.3.2 FISH-Untersuchungen der Eltern von Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen

Es wurde geprüft, ob es sich bei den subtelomerischen Chromosomenauffälligkeiten um echte Aberrationen oder um familiäre Varianten ohne klinische Relevanz handelte. Weiterhin wurde untersucht, ob sie beim Träger neu entstanden oder familiär bedingt waren. Daher wurde bei den Eltern analysiert, ob für die Regionen, die beim Kind ein auffälliges Hybridisierungsmuster zeigten, Besonderheiten vorlagen. Es wurden dabei die gleichen Sonden verwendet wie beim Indexpatienten.

Der gesunde Vater von Patient 27, der eine Deletion der Subtelomerregion Yqter zeigte, wies mit derselben Sonde ebenfalls eine Deletion Yqter auf. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Störung nicht um eine „echte“ Chromosomenaberration, sondern um einen Polymorphismus handelte. In den folgenden Abschnitten wird dieser Patient nicht mehr in der Reihe der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen aufgeführt werden.

Für die übrigen fünf Patienten, die subtelomerische Chromosomenstörungen aufwiesen, erbrachten die Analysen der elterlichen Chromosomen mit denselben Sonden, die bei ihren Kindern die Aberrationen aufdeckten, keine pathologischen Ergebnisse. Damit handelte es sich in allen weiteren Fällen um Störungen, die de novo entstanden waren.

### 4.3.3 Phänotypische Charakterisierung der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen

Alle in diesem Abschnitt bearbeiteten Parameter wurden in den Gruppen der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen vergleichend betrachtet. Zur statistischen Auswertung wurde der Chi-Quadrat-Test in der Statistik-Software SPSS für Microsoft® Windows verwendet. Für keines der untersuchten Merkmale war der Unterschied signifikant, da die Stichprobe der Patienten mit Subtelomerstörungen (n=5) zu klein war.

Tabelle 4.8 zeigt eine Übersicht über die Art der Aberrationen, das Geschlecht der Patienten, den Schweregrad der mentalen Retardierung, die motorische Entwicklung sowie das Vorliegen eines Anfallsleidens.

Patient	Aberration	Geschlecht	MR-Schweregrad	Motorische Entwicklung	Anfalls-leiden
29	del(14qter)	männlich	mittel-schwer	retardiert	nein
34	der(2)t(2qter;5pter)	männlich	leicht	retardiert	ja
35	del(2qter)	weiblich	mittel-schwer	retardiert	ja
37	der(22)t(7qter;22qter)	männlich	leicht	retardiert	nein
75	del(16pter)	weiblich	mittel-schwer	retardiert	nein

**Tabelle 4.8:** Übersicht über die Art der subtelomerischen Chromosomenstörung, das Geschlecht, den MR-Schweregrad, die motorische Entwicklung und das Vorliegen eines Anfallsleidens der Patienten mit Subtelomeraberrationen.

Von den fünf Patienten des konsekutiven Untersuchungskollektivs, die subtelomerische Chromosomenaberrationen trugen, waren drei männlich und zwei weiblich. Drei der Patienten waren von einer mittleren bis schweren mentalen Retardierung betroffen, zwei weitere Patienten waren nur leicht mental retardiert. Alle Patienten zeigten eine motorische Verzögerung, zwei der fünf Patienten hatten ein Anfallsleiden.

Verhaltensauffälligkeiten wie Autoaggression oder Autismus wurden bei keinem der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenstörungen festgestellt.

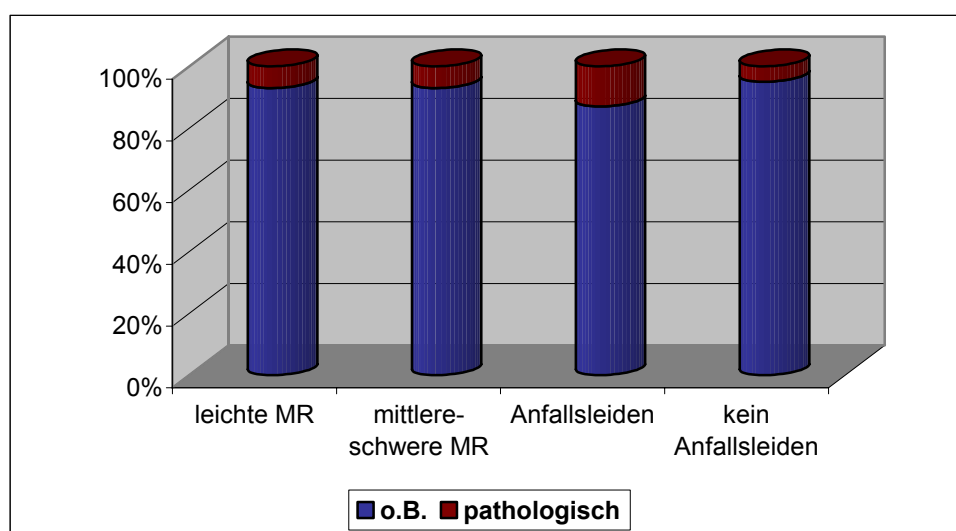
In Tabelle 4.9 werden die Parameter MR-Schweregrad und Anfallsleiden von Patienten mit Subtelomeraberrationen denen der Patienten ohne solche Aberrationen gegenübergestellt.

Subtelomer-Befund	MR-Schweregrad		Anfallsleiden	
	leicht (n=30)	mittel-schwer (n=46)	ja (n=16)	nein (n=60)
<b>o. B. (%)</b>	28 (93,3%)	43 (93,5%)	14 (87,5%)	57 (95%)
<b>Pathologisch (%)</b>	<b>2 (6,7%)</b>	<b>3 (6,5%)</b>	<b>2 (12,5%)</b>	<b>3 (5,0%)</b>

**Tabelle 4.9:** Verteilung der Parameter MR-Schweregrad und Anfallsleiden der Patienten mit (pathologisch) und ohne (o. B.) Subtelomerstörungen im Vergleich.

Von insgesamt 30 Patienten mit leichter mentaler Retardierung waren zwei Patienten Träger einer Subtelomerstörung (6,7%), von 46 Patienten mit mittlerer bis schwerer mentaler Retardierung hatten drei Patienten subtelomerische Chromosomenaberrationen (6,5%). Die Anteile der Patienten mit Subtelomerstörungen waren somit in beiden Gruppen ähnlich groß. Der Anteil der Patienten mit Aberrationen der subtelomerischen Chromosomenregionen war in der Gruppe der Patienten mit Anfallsleiden mit 12,5% mehr als doppelt so hoch wie in der Gruppe der Patienten ohne Anfallsleiden mit 5%.

Abbildung 4.12 zeigt die prozentuale Verteilung der Parameter MR-Schweregrad und Anfallsleiden bei den Patienten mit und ohne Subtelomeraberration als Säulendiagramm.



**Abbildung 4.12:** Prozentuale Verteilung der MR-Schweregrade und Anfallsleiden bei Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenaberrationen im Vergleich (Werte gerundet).

Bei der Analyse der Wachstumsparameter der Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen (vgl. Tabelle 4.10) fiel bei Patient 75 eine pränatale Dystrophie auf, Patient 35 war mikrozephal. Makrozephalie oder Minderwuchs wurden bei keinem der Patienten beobachtet und sind daher in der Tabelle nicht aufgeführt. Patient 29 lag mit seiner Körperhöhe über der 97. Perzentile und war damit hochwüchsig.

Patient	Aberration	GG	Aktuelle Maße	
		Dystrophie	Mikrozephalie	Hochwuchs
29	del(14qter)	-	-	+
34	der(2)t(2qter;5pter)	-	-	-
35	del(2qter)	-	+	-
37	der(22)t(7qter;22qter)	-	-	-
75	del(16pter)	+	-	-

**Tabelle 4.10:** Wachstumsparameter der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen. Makrozephalie und Minderwuchs wurden bei den Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen nicht beobachtet. + = vorhanden, - = fehlt

Tabelle 4.11 zeigt die Gegenüberstellung der Wachstumsparameter der Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenaberrationen.

Subtelomer- Befund	Geburtsgewicht		Körperlänge			Kopfumfang		
	Dyst. (n=17)	o. B. (n=59)	MW (n=20)	HW (n=3)	o. B. (n=53)	Mikr. (n=17)	Makr. (n=7)	o. B. (n=52)
<b>o. B.</b> (%)	16 (94,1%)	55 (93,2%)	20 (100%)	2 (66,7%)	49 (92,5%)	16 (94,1%)	7 (100%)	48 (92,3%)
<b>Pathologisch</b> (%)	<b>1</b> <b>(5,9%)</b>	<b>4</b> <b>(6,8%)</b>	<b>0</b>	<b>1</b> <b>(33,3%)</b>	<b>4</b> <b>(7,5%)</b>	<b>1</b> <b>(5,9%)</b>	<b>0</b>	<b>4</b> <b>(7,7%)</b>

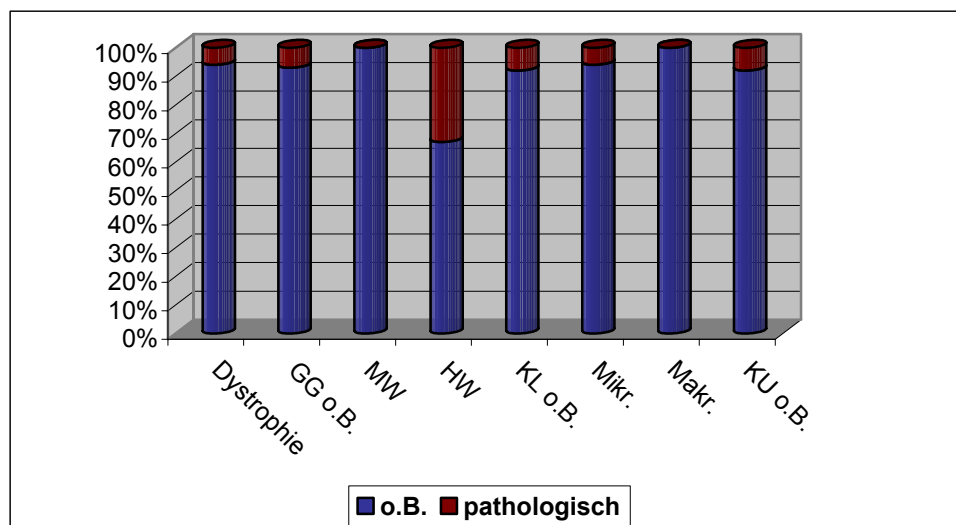
**Tabelle 4.11:** Wachstumsparameter der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen im Vergleich. Dyst. = Dystrophie (Geburtsgewicht <3. Perzentile), MW = Minderwuchs (<3. Perzentile), HW = Hochwuchs (>97. Perzentile), Mikr. = Mikrozephalie (<3. Perzentile), Makr. = Makrozephalie (>97. Perzentile)

Von insgesamt 17 Patienten, die im konsekutiven Untersuchungskollektiv eine Dystrophie aufwiesen, hatte ein Patient eine subtelomerische Chromosomenstörung (5,9%), von 59 Patienten mit normalem Geburtsgewicht waren es vier Patienten (6,8%).

Unter den 20 minderwüchsigen Patienten war keiner Träger einer subtelomerischen Chromosomenaberration. Von drei Patienten mit einer Körperlänge oberhalb der 97. Perzentile hatte einer eine Subtelomerstörung (33,3%). Vier der insgesamt 53 Patienten mit einer normalen Körperlänge wiesen subtelomerische Chromosomenaberrationen auf (7,5%). Von 17 Patienten mit Mikrozephalie war einer Träger einer Subtelomerstörung (5,9%), eine Makrozephalie, die bei insgesamt sieben der konsekutiv analysierten MR-Patienten festgestellt wurde, lag bei keinem der Patienten mit Subtelomeraberration vor. Ein normaler Kopfumfang wurde bei vier Patienten mit pathologischem Subtelomerbefund von insgesamt 52 Patienten mit Normozephalie bestimmt (7,7%).

Das Säulendiagramm in Abbildung 4.13 gibt die prozentuale Verteilung der Wachstumsparameter der Patienten mit Subtelomerstörungen im Vergleich zum restlichen Untersuchungskollektiv wieder.





**Abbildung 4.13:** Prozentuale Verteilung der Wachstumsparameter bei Patienten mit (pathologisch) und ohne (o. B.) subtelomerische Chromosomenaberrationen im Vergleich (Werte gerundet).  
GG = Geburtsgewicht, MW = Minderwuchs, HW = Hochwuchs, KL = Körperlänge, Mikr. = Mikrozephalie, Makr. = Makrozephalie, KU = Kopfumfang

Familienanamnese: Bei einem Patienten mit subtelomerischer Chromosomenaberration gab es in der Familie einen betroffenen Bruder, dessen Untersuchung der Subtelomere einen unauffälligen Befund ergab. Pathologische Schwangerschaften der Mütter der MR-Patienten mit Subtelomerstörungen kamen in drei der fünf Fälle vor (vgl. Tabelle 4.12).

Patient	Aberration	Familiäre MR	Pathologische SS
29	del(14qter)	-	-
34	der(2)t(2qter;5pter)	-	-
35	del(2qter)	-	+
37	der(22)t(7qter;22qter)	-	+
75	del(16pter)	+	+

**Tabelle 4.12:** Familiäre MR und pathologische Schwangerschaften (SS) der Mütter der MR-Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen.

+ = vorhanden, - = fehlt

Tabelle 4.13 zeigt die Gegenüberstellung der Parameter familiäre mentale Retardierung und pathologische Schwangerschaften der Mütter der Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenstörungen.

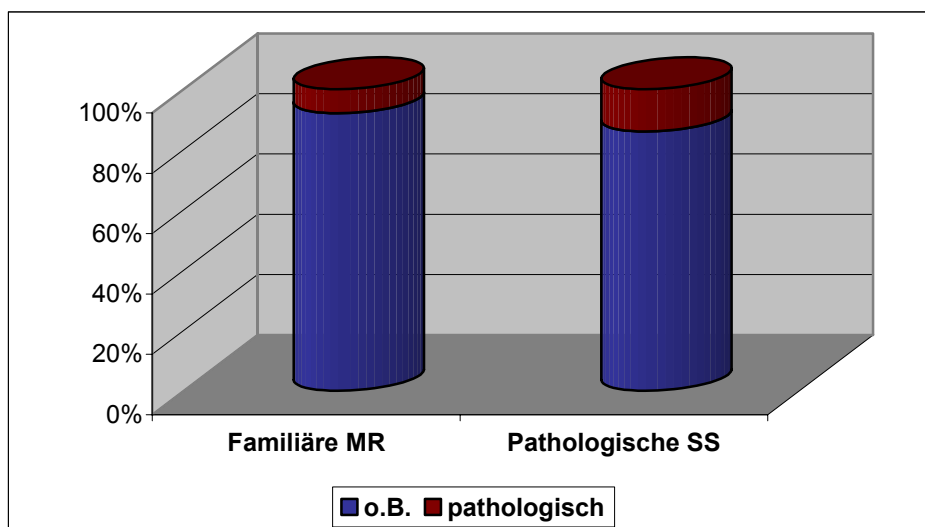
Subtelomer-Befund	Familiäre MR (n=13)	Pathologische SS (n=21)
o. B.	12 (92,3%)	18 (85,7%)
Pathologisch (%)	1 (7,7%)	3 (14,3%)

**Tabelle 4.13:** Verteilung der Parameter familiäre MR und pathologische Schwangerschaften der Mütter der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen im Vergleich.

Von den 13 familiären MR-Fällen des konsekutiven Untersuchungskollektivs war einer unter den Patienten mit subtelomerischer Chromosomenaberration zu finden (7,7%).

Aborte, Fehl- oder Totgeburten der Mütter der Patienten mit mentaler Retardierung wurden in insgesamt 21 der 76 untersuchten Fälle beobachtet. Drei der Mütter der Patienten mit Subtelomeraberration (14,3%) hatten pathologische Schwangerschaften.

Abbildung 4.14 zeigt als Säulendiagramm die prozentuale Verteilung von familiären MR-Fällen und pathologischen Schwangerschaften der Mütter der Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenstörungen.



**Abbildung 4.14:** Prozentuale Verteilung der familiären MR und pathologischen Schwangerschaften der Mütter der Patienten mit (pathologisch) und ohne (o. B.) subtelomerische Chromosomenaberrationen im Vergleich (Werte gerundet).

Die Einordnung der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen in die Kategorien, die sich aus den möglichen Kombinationen aus Dysmorphien und Fehlbildungen zusammensetzen (vgl. Kapitel 4.1.5), ist in Tabelle 4.14 dargestellt.

Patient	Aberration	+F/+D	-F/+D	+F/-D	-F/-D
29	del(14qter)	+	-	-	-
34	der(2)t(2qter;5pter)	+	-	-	-
35	del(2qter)	+	-	-	-
37	der(22)t(7qter;22qter)	-	-	-	+
75	del(16pter)	-	-	-	+

**Tabelle 4.14:** Einordnung der Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen in Kategorien aus möglichen Kombinationen von Dysmorphien und Fehlbildungen  
D = Dysmorphien, F = Fehlbildungen, + = vorhanden, - = fehlt

Drei der Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen hatten sowohl Fehlbildungen als auch Dysmorphien, zwei Patienten hatten weder Fehlbildungen noch

Dysmorphien. Die Kombinationen „Dysmorphien ohne Fehlbildungen“ und „Fehlbildungen ohne Dysmorphien“ traten bei den Patienten mit Subtelomeraberrationen nicht auf.

Tabelle 4.15 zeigt die Einordnung in die o. g. Kategorien aus Fehlbildungen und Dysmorphien der Patienten mit und ohne subtelomerische Chromosomenstörungen im Vergleich.

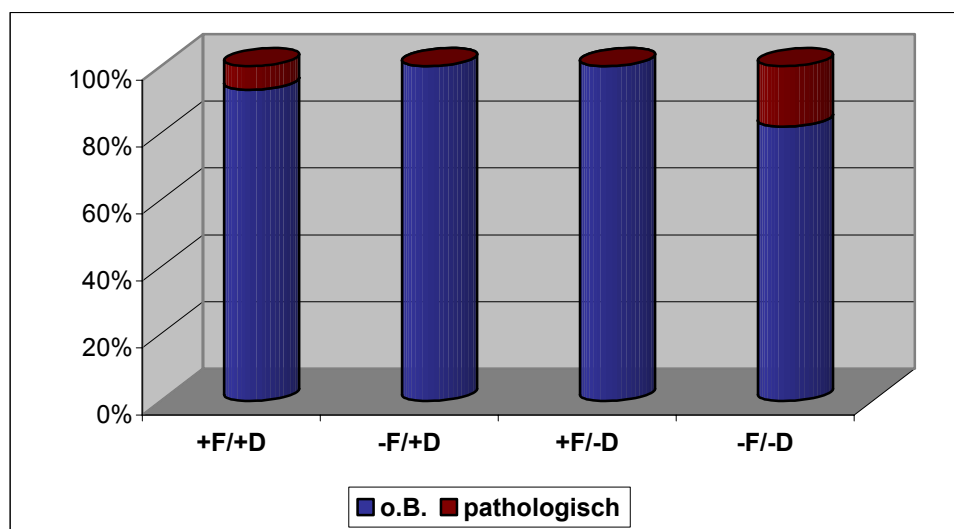
Subtelomer-Befund	+F/+D (n=46)	-F/+D (n=18)	+F/-D (n=1)	-F/-D (n=11)
o. B.	43 (93,5%)	18 (100%)	1 (100%)	9 (81,8%)
Pathologisch (%)	3 (6,5%)	0	0	2 (18,2%)

**Tabelle 4.15:** Verteilung der Kategorien aus den möglichen Kombinationen von Fehlbildungen und Dysmorphien der Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen im Vergleich.

D = Dysmorphien, F = Fehlbildungen, + = vorhanden, - = fehlt

Von insgesamt 46 Patienten, die sowohl Dysmorphien als auch kongenitale Fehlbildungen zeigten, waren drei Patienten Träger einer Subtelomeraberration (6,5%), von 11 Patienten ohne Fehlbildungen und Dysmorphien hatten zwei subtelomerische Chromosomenstörungen (18,2%). Subtelomerstörungen kamen bei Patienten, die nur Fehlbildungen oder nur Dysmorphien aufwiesen, nicht vor.

Die prozentuale Verteilung der Patienten mit und ohne Subtelomeraberrationen in den o. g. Kategorien aus Fehlbildungen und Dysmorphien ist in Abbildung 4.15 als Säulendiagramm vergleichend dargestellt.



**Abbildung 4.15:** Prozentuale Verteilung der Kombinationen aus Dysmorphien und Fehlbildungen bei Patienten mit (pathologisch) und ohne (o. B.) subtelomerische Chromosomenaberrationen im Vergleich (Werte gerundet).

D = Dysmorphien, F = Fehlbildungen, + = vorhanden, - = fehlt

Die Charakterisierung der Dysmorphien und Fehlbildungen der MR-Patienten erfolgte nach fazialen Dysmorphien, pathologischer Schädelform (Brachy-/Dolichocephalie etc.), Gesichtspalten (Lippen-Kiefer-Gaumenspalte etc.), Hals-/Thorax-/Abdomenanomalien (Trichterbrust etc.), Extremitätenfehlbildungen (Polydaktylie etc.) sowie Organ- und Genitalfehlbildungen

(Herz, Gehirn, Urogenitalsystem). Tabelle 4.16 zeigt die Anomalien der Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen.

Patient	Aberration	Schädel		Organfehlbildungen		
		Form-anomalie	Faz. Dym.	Gehirn	Herz	Urogenital
29	del(14qter)	-	+	+	-	+
34	der(2)t(2qter;5pter)	-	+	-	+	+
35	del(2qter)	+	+	-	-	-
37	der(22)t(7qter;22qter)	-	-	-	-	-
75	del(16pter)	-	-	-	-	-

**Tabelle 4.16:** Übersicht über die Fehlbildungen und Dysmorphien bei Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen.

Faz. Dym. = Faziale Dysmorphien, + = vorhanden, - = fehlt

Schädelformanomalien, Gesichtsspalten, Hals-/Thorax-/Abdomenanomalien und Extremitätenfehlbildungen lagen bei den Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen nicht vor (vgl. Tabelle A4 im Anhang). Ein Patient zeigte eine Mikrozephalie, eine echte Fehlbildung. Drei Patienten hatten faziale Dysmorphien. Ein Patient wies eine Herz-, ein weiterer eine Gehirnfehlbildung auf. Zwei Patienten hatten Fehlbildungen des Urogenitalsystems.

Tabelle 4.17 zeigt die Verteilung der Fehlbildungen und Dysmorphien bei Patienten mit und ohne Subtelomeraberrationen im Vergleich.

Subtelomer-Befund	Schädel			Hals/ Thorax/ Abdom. (n=3)	Extremitäten (n=2)	Organfehlbildungen		
	Faz. Dym. (n=61)	Form-anom. (n=7)	Gesichtsspalten (n=5)			Gehirn (n=17)	Herz (n=20)	Urogenital (n=17)
<b>o. B.</b>	58 (95,1%)	7 (100%)	5 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	16 (94,1%)	19 (95%)	15 (86,7%)
<b>Pathologisch (%)</b>	<b>3 (4,9%)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1 (5,9%)</b>	<b>1 (5,0%)</b>	<b>2 (13,3%)</b>

**Tabelle 4.17:** Verteilung der Fehlbildungen und Dysmorphien der Patienten mit und ohne Subtelomeraberrationen im Vergleich.

Von insgesamt 61 MR-Patienten mit fazialen Dysmorphien waren drei Träger einer subtelomerischen Chromosomenaberration (4,9%). Gehirnfehlbildungen, die im konsekutiven Untersuchungskollektiv bei 17 Patienten nachgewiesen wurden, lagen bei einem Patienten mit Subtelomerstörung vor (5,9%). Ein Herzfehler wurde bei insgesamt 20 Patienten diagnostiziert, darunter war ein Proband (5%) mit einer Aberration der

subtelomerischen Chromosomenregionen. Urogenitalfehlbildungen wurden bei 17 Patienten festgestellt, wovon zwei (13,3%) Subtelomeraberrationen trugen.

Nach dem Punktesystem von de Vries et al (2001) (vgl. Kapitel 4.1.6 und Tabelle A5 im Anhang) wurden allen Patienten für definierte Auffälligkeiten wie z. B. faziale Dysmorphien, bestimmte kongenitale Fehlbildungen oder Wachstumsretardierung, die in der „Checkliste“ zusammengefasst sind, Punkte vergeben. Tabelle 4.18 zeigt diese Punkteverteilung für die Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen.

Patient	Familiarität (1P/2P)	Dystrophie (2 P)	Postnatale Wachstumsretardierung		Faziale Dysm. (je 1 P)	Fehlbildungen (je 1 P)	Summe
			Mik/Mak (1P)	Min/Ho (1P)			
29	0	0	0	1	2	2	5
34	0	0	0	0	2	2	4
35	0	0	0	0	2	0	2
37	0	0	0	0	0	0	0
75	1	0	0	0	0	0	1

**Tabelle 4.18:** Verteilung der Punkte nach de Vries et al. (2001) für die Patienten mit subtelomerischen Chromosomenstörungen.

P = Punkte nach de Vries et al. (2001), Mik = Mikrozephalie, Mak = Makrozephalie, Min = Minderwuchs, Ho = Hochwuchs, Dysm. = Dysmorphien

Patient 29 erhielt aufgrund seines Hochwuchses einen, für seine fazialen Dysmorphien zwei und für seine Fehlbildungen, zu denen in diesem Fall die Hypospadie sowie die Handanomalien zählten, zwei weitere Punkte. Insgesamt erhielt dieser Patient mit **fünf** von zehn zu erreichenden Punkten die Maximalpunktzahl unter den Patienten mit Subtelomerstörungen. An Patient 34 wurden aufgrund seiner fazialen Dysmorphien zwei und wegen seiner Fehlbildungen, zu denen nach de Vries et al. (2001) neben dem Herzfehler auch die Handanomalien zählten, weitere zwei Punkte vergeben, was zu einer Gesamtpunktzahl von **vier** führte. Patient 35 erhielt aufgrund seiner fazialen Dysmorphien **zwei** Punkte und Patient 75 **einen** Punkt für die familiäre mentale Retardierung, die den Mendelschen Regeln folgte. Patient 37 zeigte keine der von de Vries bewerteten Auffälligkeiten, es wurde **kein** Punkt vergeben.

Die Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen erreichten im Durchschnitt 2,4 Punkte nach der von de Vries et al. (2001) aufgestellten „Checkliste“. Im Vergleich dazu lag die durchschnittliche „Checkliste“-Punktzahl im gesamten Untersuchungskollektiv bei 3,5, also um einen Punkt höher.

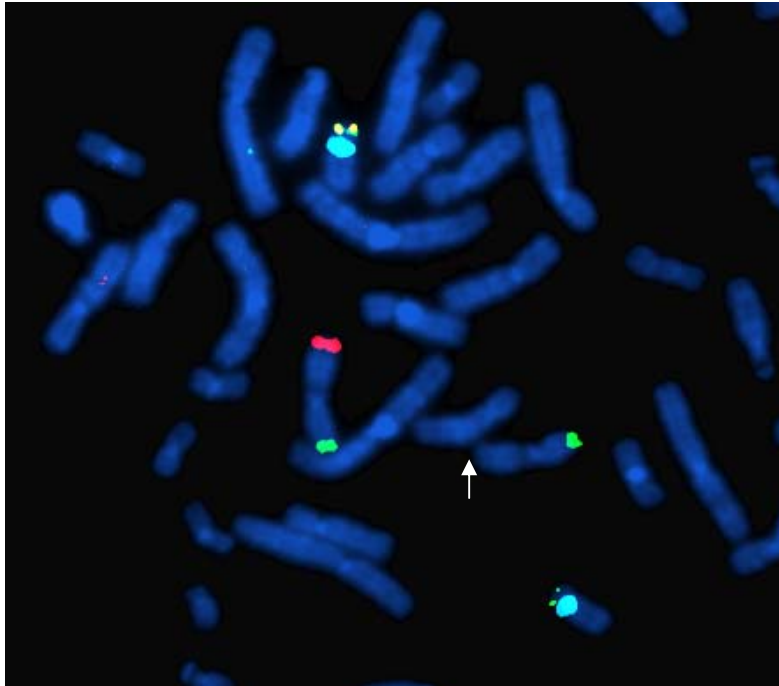
#### 4.3.4 Ergebnisse der Analysen der subtelomerischen Chromosomenregionen der nicht-konsekutiven Patienten

Außerhalb der konsekutiven Reihenfolge wurden sechs weitere Patienten analysiert. Drei dieser Patienten wurden mit Hilfe des ToTelVysion™-Sondensets, zwei Patienten mit Subtelomer-COBRA-FISH und ein Patient durch Subtelomer-Sechs-Farben-FISH auf das Vorliegen subtelomerischer Chromosomenaberrationen untersucht. Tabelle 4.19 gibt eine Übersicht über die Patienten, die angewendeten Untersuchungsmethoden und die Hybridisierungsergebnisse.

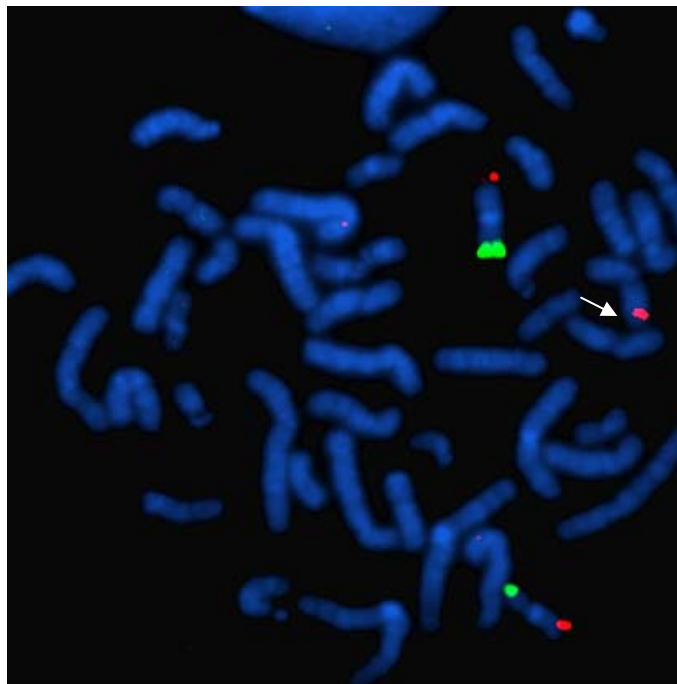
Patient	Untersuchungsmethode	Hybridisierungsergebnis
77	ToTelVysion™	o. B.
78	ToTelVysion™	der(11)t(11qter;16qter)
79	S-COBRA	o. B.
80	Sechs-Farben-FISH	o. B.
81	S-COBRA	o. B.
82	ToTelVysion™	o. B.

**Tabelle 4.19:** Beschreibung der subtelomerischen Chromosomenaberrationen der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten.

Fünf der sechs nicht-konsekutiv untersuchten Patienten zeigten unauffällige Hybridisierungsergebnisse. Patient 78 wies eine unbalancierte terminale Translokation der langen Arme von Chromosom 11 und Chromosom 16 auf. Dabei lag der Abschnitt 11qter monosom und der Abschnitt 16qter trisom vor. Diese Chromosomenstörung wurde mit den Sonden GS-770G7 und GS-240G10 des eigenen Sondensets verifiziert (Karyotyp: 46,XY,ish der (11)t(11;16)(q25;q24)([VIJ yRM2072]-, GS-770G7-; [16QTEL013]+, GS-240G10+), vgl. Abbildung 4.16a und b).

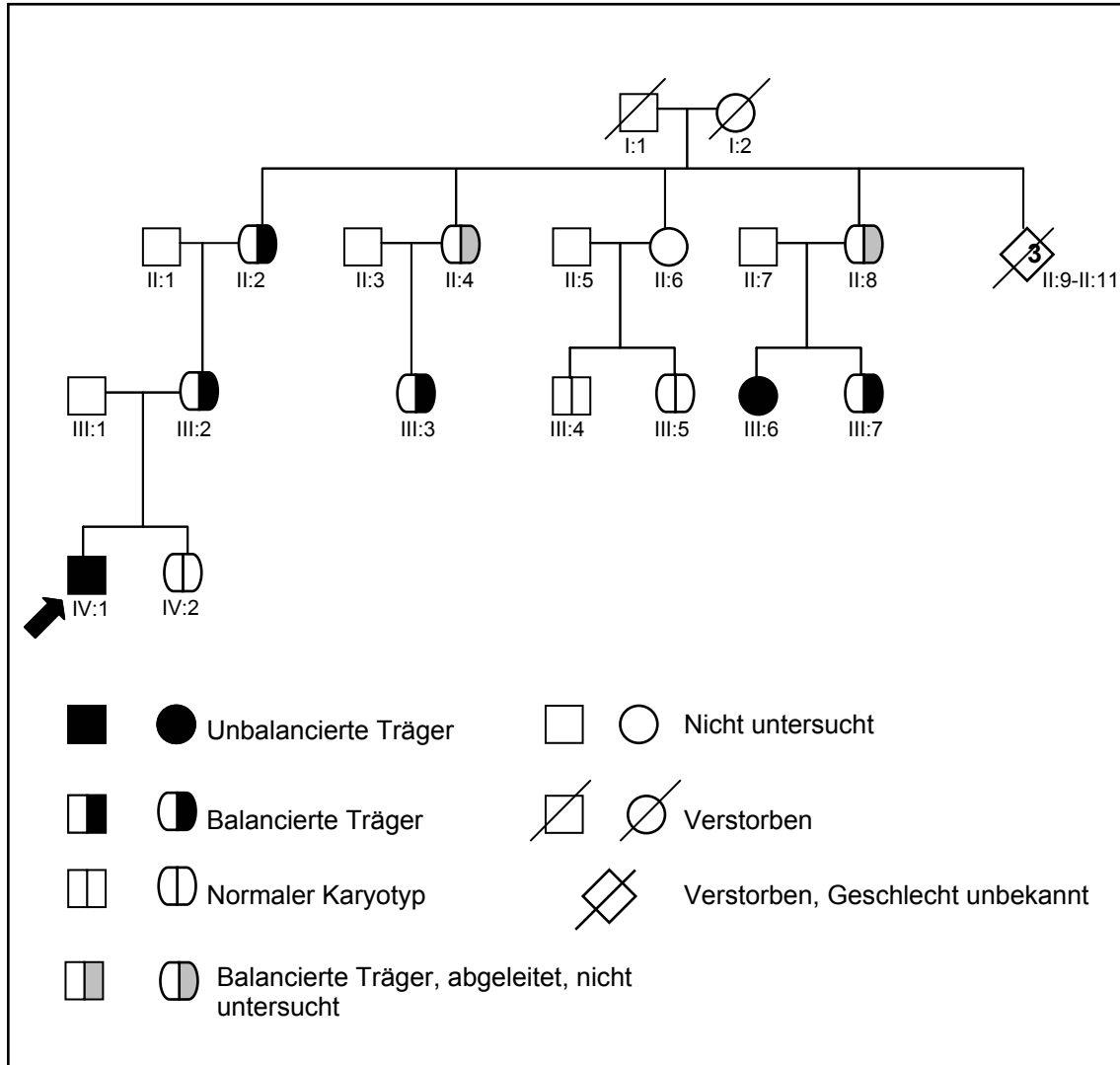


**Abbildung 4.16a:** Nachweis einer Deletion 11qter durch *ToTelVysion<sup>TM</sup>*-Hybridisierung mit #11. Ein regelrechtes Signal in 11qter (*rot*), der Pfeil zeigt auf die Deletion im derivativen Chromosom 11. Regelrechte Signale in 18pter (*gelb*), 18 Zentromer (*türkis*, Kontrollsonde) und 11pter (*grün*).



**Abbildung 4.16b:** Nachweis einer Duplikation 16qter durch *ToTelVysion<sup>TM</sup>*-Hybridisierung mit #13. Zusätzliches Signal für 16qter (*rot*) in 11qter (Pfeil). Regelrechte Signale in 16pter (*grün*) und 16qter (*rot*).

Die Untersuchung der Eltern des Patienten mit den gleichen Sonden ergab, dass die Mutter des Patienten Trägerin der balancierten Form der Translokation war. Abbildung 4.17 zeigt vier Generationen im Stammbaum der mütterlichen Familie von Patient 78 (Indexpatient).



**Abbildung 4.17:** Stammbaum der mütterlichen Familie von Patient 78.

Patient 78 ist der im Stammbaum mit dem Pfeil gekennzeichnete Indexpatient (Ziffer IV:1). Er war Träger der unbalancierten Translokation, symbolisiert durch das ausgefüllte Quadrat. Seine Mutter (III:2) und seine Großmutter mütterlicherseits (II:2) waren beide balancierte Translokationsträgerinnen, im Stammbaum durch halbausgefüllte Kreise gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurden auch die Probanden III:3-III:7 auf das Vorliegen der Translokation untersucht. Person III:3 war Trägerin der balancierten Translokation, daraus konnte geschlossen werden, dass ihre Mutter (II:4) ebenfalls Trägerin der balancierten Translokation war. Die Geschwister III:4 und III:5 wiesen einen unauffälligen Karyotyp auf, für ihre Mutter (II:6) konnte nicht abgeleitet werden, ob sie die balancierte Translokation trug oder nicht. Patientin III:7 war Trägerin der balancierten Form der Translokation, ihre mental retardierte Schwester (III:6) wies die gleiche unbalancierte Aberration auf wie der Indexpatient (IV:1). Phänotypisch fielen bei ihr neben fazialen Dysmorphien eine Fußfehlbildung, eine Urogenitalfehlbildung sowie ein Herzfehler auf. Ihre Mutter (II:8) war demnach ebenfalls Trägerin der balancierten Translokation. Von den Urgroßeltern des Indexpatienten



(I:1 und I:2) musste einer ebenfalls unbalancierter Translokationsträger gewesen sein. Die Probanden II:9-II:11 verstarben kurz nach der Geburt bzw. in ihrer frühen Kindheit. Angaben zum Phänotyp oder Untersuchungsmaterial für molekularzytogenetische Untersuchungen dieser Probanden lagen nicht vor.

#### 4.3.4.1 Phänotypische Charakterisierung von Patient 78

Patient 78 war männlich, zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung vier Jahre und 6 Monate alt und mental retardiert, ohne dass die motorische Entwicklung verzögert war. Verhaltensauffälligkeiten zeigte er keine.

Sowohl seine Geburtsmaße als auch seine aktuellen Körpermaße lagen im Normbereich.

Eine Cousine seiner Mutter war ebenfalls mental retardiert und Trägerin derselben Subtelomeraberration wie Patient 78. Die Eltern des Patienten waren nicht miteinander verwandt.

Die Geburt von Patient 78 erfolgte per Sectio aufgrund einer Hinterhauptlage. Das Fruchtwasser war grün, und das Neugeborene entwickelte eine Meningitis.

Patient 78 zeigte sowohl faziale als auch nicht-faziale Dysmorphien und einen Herzfehler als kongenitale Fehlbildung. Seine Schädelform war normal, er zeigte zwar einen hohen Gaumen, der jedoch nicht wie eine echte Gaumenspalte als Fehlbildung zu bewerten war. Ferner wurden Auffälligkeiten der Extremitäten beobachtet. Nach wiederholter Kernspintomographie fiel mehrfach eine periventrikuläre Leukodystrophie auf, also eine Verminderung der weißen Gehirnmasse, die sich nicht veränderte. Als Funktionsstörung bestand eine schwere kombinierte Schallleitungs- und Innenohrschwerhörigkeit, während das Sehvermögen normal war.

Nach dem Punktesystem von de Vries et al. (2001) (vgl. Tabelle 2.1) erhielt Patient 78 für seine mendelnde familiäre mentale Retardierung einen Punkt, für die fazialen Dysmorphien zwei Punkte und für den Herzfehler und die Handanomalien jeweils einen Punkt. Somit erzielte er **fünf Punkte**, gemeinsam mit Patient 29 die Höchstpunktzahl unter den Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen.

#### 4.4 Charakterisierung der Subtelomeraberrationen durch FISH

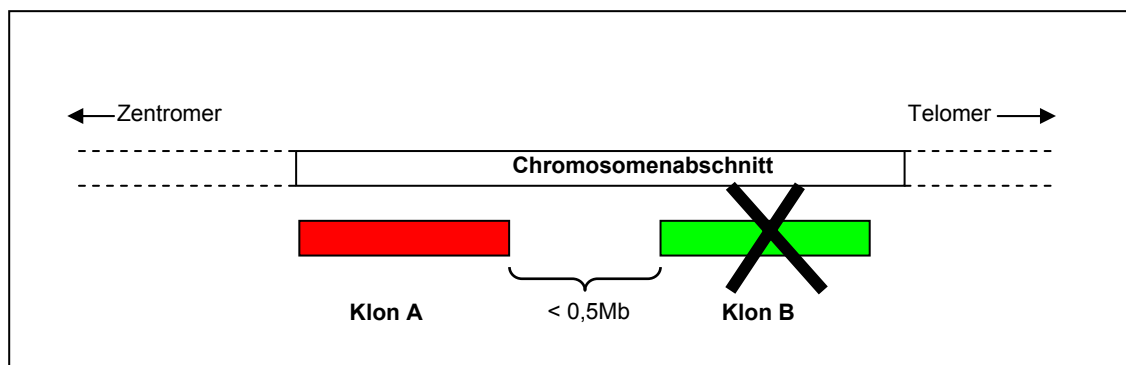
Zur weiteren Analyse der subtelomerischen Chromosomenstörungen wurden bei den sechs Patienten mit subtelomerischen Aberrationen Bruchpunktanalysen mittels FISH durchgeführt. Die Vorgehensweise der Bruchpunktbestimmungen ist in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben. Durch die gezielte Auswahl von Sonden, die zunächst in großen Abständen zueinander lagen, wurde die Lokalisation der Bruchpunkte grob bestimmt. Die Auswahl weiterer Sonden führte zu einer sukzessiven Einengung der Bruchpunkte.

Die in der vorliegenden Arbeit durch Subtelomer-Screening mittels FISH detektierten Chromosomenaberrationen waren entweder reine Deletionen (Patienten 29, 35 und 75) oder unbalancierte Translokationen (Patienten 34, 37 und 78).

#### 4.4.1 Prinzip der Charakterisierung von Deletionen durch FISH

Die Auswertung der Bruchpunktbestimmungen ist grundsätzlich abhängig von der Lage der Klone zueinander.

In den eigenen Untersuchungen zu Deletionsgrößen lagen zwei verschiedene Situationen vor, je nachdem ob die begrenzenden Klone überlappten oder nicht. Abbildung 4.18 veranschaulicht schematisch den Nachweis einer Deletion mit zwei nicht überlappenden begrenzenden Klonen, die einen Abstand von weniger als 500kb haben.



**Abbildung 4.18:** Schema der Bruchpunktbestimmung bei Deletionen mit nicht-überlappenden Klonen.

Für den distal gelegenen Klon B ist auf dem derivativen Chromosom kein Signal mehr sichtbar, während der proximale Klon A auf beiden Homologen regelrecht hybridisiert. Nun gibt es verschiedene mögliche Lokalisationen des Bruchpunktes:

Möglichkeit 1: Klon B ist vollständig deletiert und Klon A vollständig vorhanden. Der Bruchpunkt läge dann im Abschnitt zwischen den beiden Sonden, die Auflösung entspricht der Distanz vom Ende des Klons A zum Anfang des Klons B und beträgt 500kb.

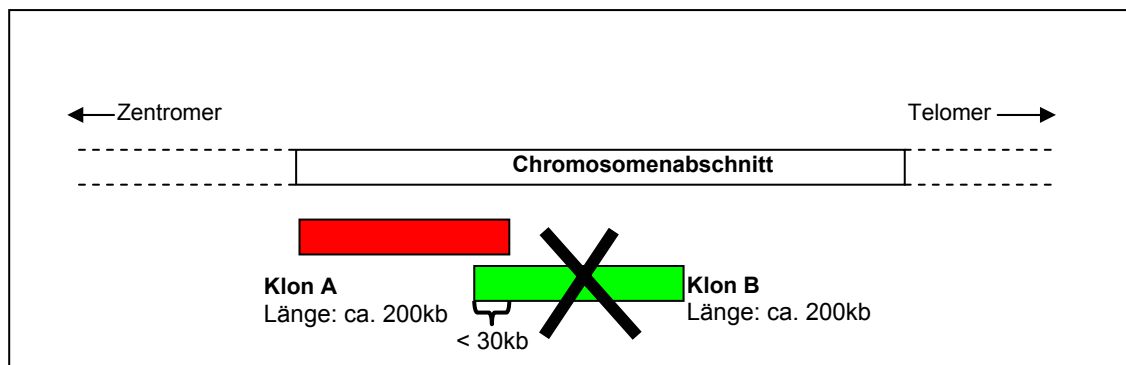
Möglichkeit 2: Klon B ist vollständig deletiert, das Signal für Klon A ist vorhanden, aber der Bruchpunkt liegt distal in der von diesem Klon detektierten Chromosomenregion. Dies ist nicht auszuschließen, da eine Signalschwächung erst dann detektierbar ist, wenn die Sonde mindestens zur Hälfte deletiert ist. Die Auflösung wäre dann schlechter.

Möglichkeit 3: Klon A ist vollständig vorhanden, der Bruchpunkt liegt sehr proximal in Klon B. Wenn weniger als 30kb von einer Sonde verbleiben, ist dieser Rest durch FISH nicht sicher nachweisbar.

Keine dieser Möglichkeiten kann durch die angewendete Methode ausgeschlossen oder bewiesen werden. Die Auflösung der Bruchpunktbestimmung wäre hier also gleich der Summe von:

1. der Distanz des distalen Endes von Klon A und des proximalen Endes von Klon B,
2. ca. der Hälfte der Länge von Klon A und
3. ca. 30kb (aus Klon B).

Abbildung 4.19 zeigt schematisch die Bruchpunktbestimmung bei Deletionen mit überlappenden Sonden.



**Abbildung 4.19:** Schema der Bruchpunktbestimmung bei Deletionen mit überlappenden Klonen.

Der distale Klon B überlappt den proximalen Klon A um weniger als 30kb. Klon B erscheint mikroskopisch deletiert, Klon A zeigt ein regelrechtes Hybridisierungsmuster. Auch für diesen Fall sind unterschiedliche Interpretationen möglich:

Möglichkeit 1: Der Bruchpunkt liegt distal in der durch Klon A detektierten Chromosomenregion. Bleibt nach teilweiser distaler Deletion der von Klon A nachgewiesenen Sequenz mehr als die Hälfte übrig, so wird kein zuverlässig erkennbarer Unterschied in der Signalstärke sichtbar.

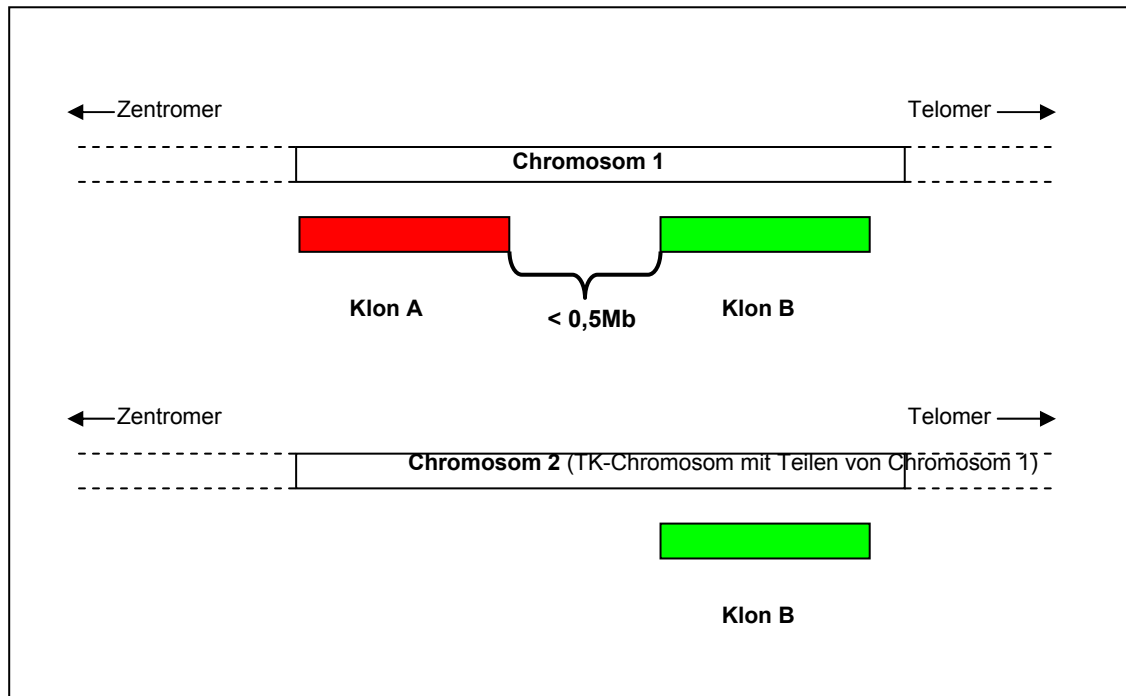
Möglichkeit 2: Der Bruchpunkt liegt im überlappenden Abschnitt der Klone A und B. Das Restsignal, das von dem durch Klon B detektierten Chromosomenabschnitt bleibt, ist nicht sicher nachweisbar, da die Sondenlänge dann unter 30kb beträgt. Der geringe Unterschied in der Signalstärke von Klon A ist nicht detektierbar.

Die Auflösung ist in beiden Fällen begrenzt durch die Größe von Klon A und entspricht ungefähr der Hälfte seiner Länge.

#### 4.4.2 Prinzip der Charakterisierung von unbalancierten Translokationen durch FISH

Im Fall von unbalancierten Translokationen erfolgte die Bruchpunktbestimmung der Deletion wie oben beschrieben. Die Eingrenzung der Größe des trisomen Fragments (Duplikation) ist abhängig von der Lage der Klone zueinander. Da in den eigenen Untersuchungen für keine der Duplikationen überlappende Klone verwendet wurden, wird diese Möglichkeit hier nicht betrachtet.

Abbildung 4.20 zeigt schematisch den Nachweis der Duplikationsgröße beim unbalancierten Träger. Diese erfolgt mit Sonden, die auf dem duplizierten Chromosomenabschnitt Chromosom lokalisiert sind.



**Abbildung 4.20:** Schema der Bruchpunktbestimmung bei Duplikationen mit nicht-überlappenden Klonen (unbalancierte Translokation der(2)t(1;2)).

Der proximale Klon A hybridisiert regelrecht, der distale Klon B hybridisiert zusätzlich auf dem nicht-homologen, zweiten an der Translokation beteiligten Chromosom. Der Abstand zwischen den Klonen beträgt weniger als 500kb. Auch hier ist eine eindeutige Interpretation nicht möglich.

Möglichkeit 1: Der Bruchpunkt liegt zwischen den durch die Sonden A und B detektierten Chromosomenregionen.

Möglichkeit 2: Der Bruchpunkt liegt distal in der durch Klon A nachgewiesenen Sequenz, so dass ein Abschnitt, der kleiner ist als sicher nachweisbare 30kb, zusätzlich auf dem derivativen Chromosom liegt.

Möglichkeit 3: Der Bruchpunkt liegt in dem durch Klon B detektierten Abschnitt, es ist aber ungefähr die Hälfte dieser Region transloziert, so dass kein Unterschied in den Signalintensitäten auf dem normalen Chromosom und dem derivativen Chromosom besteht. Auch in diesem Fall ist durch FISH keine der Möglichkeiten sicher auszuschließen. Die Auflösung der Bruchpunktbestimmungen entspricht hier der Summe aus:

1. der Distanz zwischen den Klonen A und B,
2. ca. 30kb und
3. der Hälfte der Länge von Klon B.

Bei einem balancierten Translokationsträger entfielen die Möglichkeiten 3, da das zweite Translokationschromosom vorhanden wäre und somit beide Signalteile von Klon B nachweisbar wären.

#### 4.4.3 Bruchpunktbestimmungen bei den Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen

Die Ergebnisse der Bruchpunktbestimmungen werden in den folgenden Abschnitten für die einzelnen Patienten dargestellt. Angegeben sind, jeweils in tabellarischer Form, die chromosomalen Positionen, die exakten genomischen Lokalisationen und Längen der zur Bruchpunktbestimmung verwendeten Klone. Alle Angaben zu genomischen und chromosomalen Positionen sowie zu Sondenlängen wurden dem UCSC Genome Browser ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu); Version Juli 2003) entnommen.

##### 4.4.3.1 Bruchpunktbestimmung bei Patient 29

Patient 29 war Träger einer terminalen Deletion im langen Arm von Chromosom 14. In Tabelle 4.20 sind die Klone aufgeführt, die zur Bruchpunktbestimmung verwendet wurden, sowie die Ergebnisse der Hybridisierungen.

Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP11-433J8	14q32.2	95.041.944	95.239.632	197.688	regelrecht
RP11-123M6	14q32.3/32.31	99.216.263	99.381.311	165.048	regelrecht
RP11-909M7	14q32.31	99.377.437	99.577.976	200.539	regelrecht
RP11-8L8	14q32.31	99.554.061	99.716.207	162.146	deletiert
RP11-1029J19	14q32.31	99.901.856	100.105.585	203.729	deletiert
RP11-661D19	14q32.32	101.087.148	101.255.771	168.623	deletiert
RP11-417P24	14q32.33	104.167.980	104.337.781	169.801	deletiert

**Tabelle 4.20:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis bei Patient 29 (Träger einer del(14qter)).

\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Von den sieben analysierten Sonden hybridisierten drei regelrecht und erbrachten Signale auf beiden Chromosomen 14. Demgegenüber waren Signale für vier weitere Sonden nur auf dem normalen Chromosom 14 sichtbar und fehlten auf dem derivativen Chromosom 14.

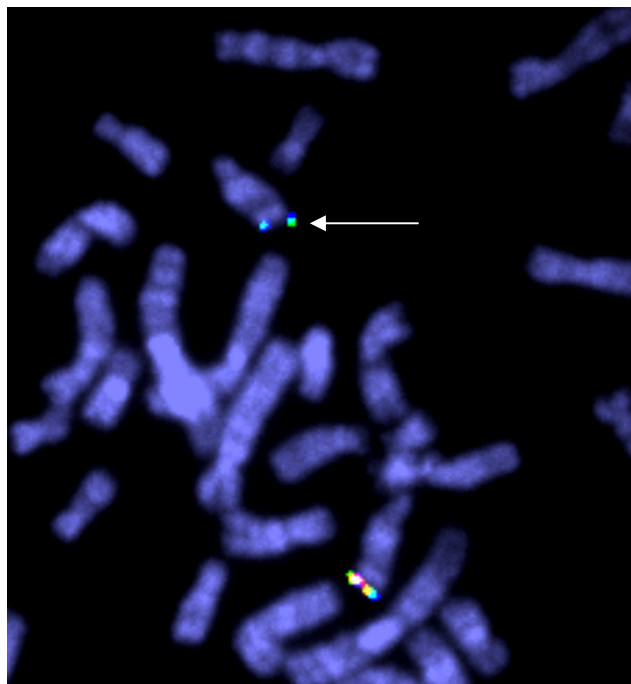
Die beiden Klone RP11-909M7 (regelrecht) und RP11-8L8 (deletiert), die die Deletion begrenzten, überlappten um 23kb. Da das Signal für den Klon RP11-909M7 regelrecht war und das Signal für RP11-8L8 fehlte (vgl. Abbildung 4.21), trifft hier die in Abbildung 4.19 dargestellte Situation zu (vgl. Kapitel 4.4.1).

Möglichkeit 1: Der Bruchpunkt lag distal in der von RP11-909M7 detektierten Chromosomenregion, wobei maximal die Hälfte deletiert sein konnte, da in den Signalintensitäten auf dem normalen und dem deletierten Chromosom 14 kein sichtbarer Unterschied bestand.

Möglichkeit 2: Der Bruchpunkt lag im überlappenden Bereich der begrenzenden Klone RP11-909M7 und RP11-8L8, wobei der verbleibende Rest des von RP11-8L8 nachgewiesenen Chromosomenabschnittes kleiner sein musste als der überlappende Bereich von 23kb, da auf dem deletierten Chromosom kein Signal nachweisbar war.

Der Bruchpunkt der Deletion lag in der chromosomalen Subbande 14q32.31. Die **Auflösung** der Bruchpunktbestimmung war in diesem Fall bestimmt durch den Klon RP11-909M7 und entsprach der Hälfte seiner Länge, also ca. 100kb.

Das Ende des Chromosoms 14 liegt bei 105.311.216bp. Die **Deletionsgröße** betrug demnach maximal 5,8Mb, was der Distanz vom Chromosomenende zur Hälfte der durch den Klon RP11-909M7 nachgewiesenen chromosomalen Sequenz entspricht.



**Abbildung 4.21:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Deletion 14qter bei Patient 19 nach Hybridisierung der Sonden RP11-123M6 (*grün*, regelrecht), RP11-909M7 (*blau*, regelrecht) und RP11-8L8 (*rot*). Auf dem derivativen Chromosom 14 wurde für RP11-8L8 kein Signal detektiert.

#### 4.4.3.2 Bruchpunktbestimmungen bei Patient 34

Patient 34 war Träger einer unbalancierten Translokation zwischen den Enden des langen Armes von Chromosom 2 und des kurzen Armes von Chromosom 5. Die Folge war eine Deletion 2qter und eine Duplikation 5pter.

Eine Übersicht über die zur Eingrenzung der Deletion auf Chromosom 2 verwendeten Klone, deren Länge und Position ist in Tabelle 4.21 gegeben.

Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP11-263G22	2q37.1	235.215.066	235.323.776	108.710	regelrecht
RP11-84G18	2q37.2	236.609.121	236.799.505	190.384	regelrecht
RP11-15L18	2q37.3	239.544.749	239.713.080	168.331	regelrecht
RP11-622A18	2q37.3	241.401.436	241.554.904	153.468	deletiert
RP11-556H17	2q37.3	242.292.189	242.468.181	175.992	deletiert

**Tabelle 4.21:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 2 bei Patient 34 (Träger eines der(2)t(2qter;5pter)).

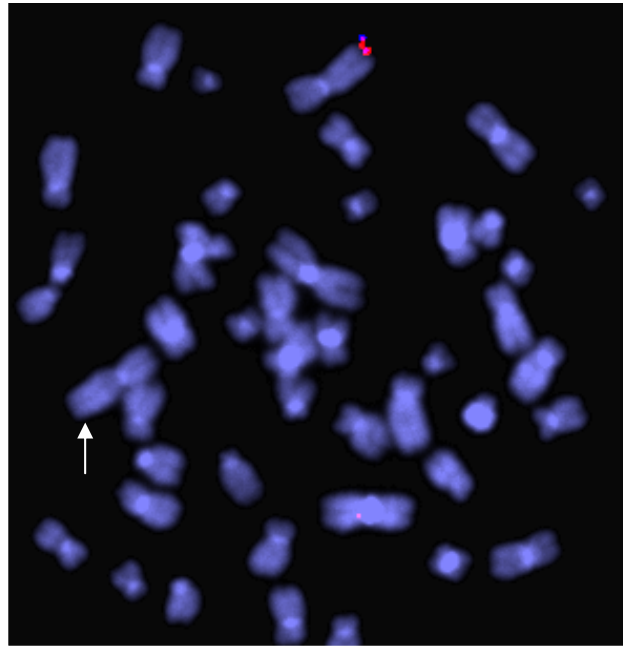
\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Zur Bruchpunktbestimmung der Deletion wurden fünf Sonden für das Ende des langen Armes von Chromosom 2 hybridisiert, davon erbrachten drei Sonden regelrechte Signale, zwei Sonden waren auf dem derivativen Chromosom 2 deletiert (vgl. Abbildung 4.22a). Die beiden Klone, die die Aberration begrenzten, waren RP11-15L18, der regelrecht hybridisierte und RP11-622A18, der auf dem aberranten Chromosom 2 deletiert war. Da diese Klone nicht überlappend waren, kann man hier die Mechanismen, die in Abbildung 4.18 schematisch dargestellt sind, anwenden. Die bereits dargestellten drei verschiedenen Möglichkeiten für die Position des Bruchpunktes (vgl. Kapitel 4.4.1) könnten vorliegen.

Der Bruchpunkt lag auf Chromosom 2 in 2q37.3. Die **Auflösung** der Bruchpunktbestimmung auf Chromosom 2 betrug 1,8Mb, entsprechend der Summe aus:

1. der Distanz des distalen Endes des Klons RP11-15L18 zum Anfang des distalen Klons RP11-622A18 (~1.690kb),
2. etwa der Hälfte der Länge des proximalen Klons 15L18 (~84kb) und
3. ca. 30kb, entsprechend dem potentiellen, durch FISH nicht nachweisbaren Rest von der durch den Klon RP11-622A18 abgedeckten Region.

Die maximale **Deletionsgröße** entsprach der Distanz vom Chromosomenende, welches bei 243.615.958bp liegt, zur Mitte der durch den proximalen Klon RP11-15L18 nachgewiesenen Sequenz und betrug 4Mb.



**Abbildung 4.22a:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Deletion in 2qter bei Patient 34 ( $\text{der}(2)\text{t}(2\text{qter};5\text{pter})$ ) nach Hybridisierung der Sonden RP11-622A18 (rot, deletiert) und RP11-556H17 (blau, deletiert). Der Pfeil weist auf das derivative Chromosom 2.

Tabelle 4.22 zeigt die Sonden, die zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation 5pter verwendet wurden.

Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP11-531A21	5p15.32	5.277.052	5.469.759	192.707	trisom
RP11-308B16	5p15.2	12.561.346	12.734.275	172.929	trisom
RP11-19O2	5p15.1	16.193.373	16.358.191	164.818	trisom
RP11-35A11	5p15.1/14.3	18.443.766	18.614.471	170.705	regelmäßig

**Tabelle 4.22:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 5 bei Patient 34 (Träger eines  $\text{der}(2)\text{t}(2\text{qter};5\text{pter})$ ).

\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation wurden vier Sonden verwendet, davon zeigte eine ein regelmäßiges Hybridisierungsmuster, drei Sonden hybridisierten zusätzlich auf dem derivativen Chromosom 2. Die regelmäßig hybridisierende Sonde war RP11-35A11, die erste trisom vorliegende Sonde war RP11-19O2 (vgl. Abbildung 4.22b). Damit lag hier eine Situation mit drei möglichen Interpretationen vor, die der in Abbildung 4.20 entsprach (vgl. Kapitel 4.4.2).

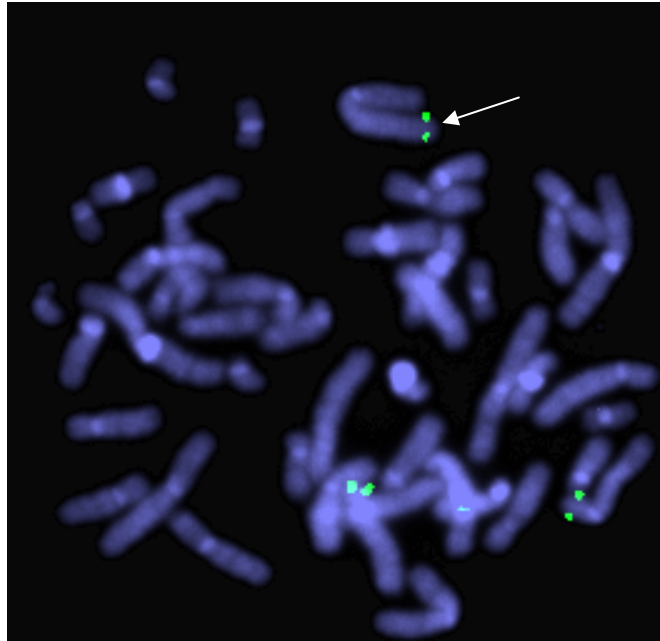
Die Auflösung der Bruchpunktbestimmung auf Chromosom 5 entsprach hier der Summe aus:

1. der Distanz zwischen den Klonen RP11-35A11 (disom) und RP11-19O2 (trisom), also etwa 2.085kb,
2. der Auflösungsgrenze der FISH (~30kb) und



3. der Hälfte der Länge des Klon RP11-19O2 (~82kb).

Damit betrug die **Auflösung** rund 2,2Mb. Der Bruchpunkt lag auf Chromosom 5 in der Subbande p15.1. Die maximale Größe des trisomen Fragments entsprach dem Abstand des regelrechten Klon vom Chromosomenende. Dazu kamen 30kb, die von der durch diesen Klon nachgewiesenen Chromosomenregion auf das derivative Chromosom 2 transloziert sein könnten, ohne dort detektiert werden zu können. Die **Duplikation** war demnach maximal 18Mb groß.



**Abbildung 4.22b:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation in 5pter bei Patient 34 (der(2)t(2qter;5pter)) nach Hybridisierung der Sonde RP11-19O2 (dupliziert). Der Pfeil weist auf das zusätzliche Signal auf dem derivativen Chromosom 2.

Die Bruchpunktbestimmungen bei Patient 34 konnten aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials noch nicht abgeschlossen werden.

#### 4.4.3.3 Bruchpunktbestimmung bei Patient 35

Patient 35 wies eine terminale Deletion des langen Armes von Chromosom 2 auf. Tabelle 4.23 zeigt die für die Bruchpunktbestimmung eingesetzten Sonden, deren Längen und Positionen.

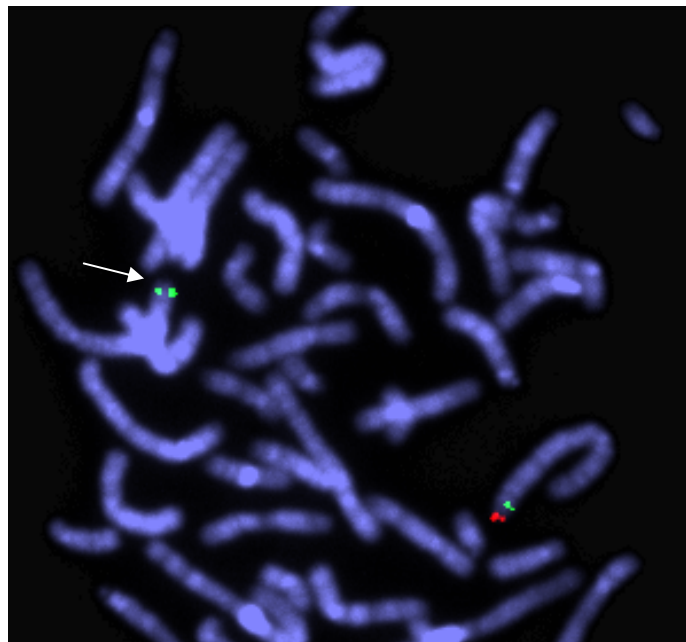
Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP11-457P23	2q36.3	230.881.251	231.082.426	201.175	regelrecht
RP11-263G22	2q37.1	235.215.066	235.323.776	108.710	regelrecht
RP11-84G18	2q37.2	236.609.121	236.799.505	190.384	regelrecht
RP11-4H21	2q37.3	237.939.595	238.108.457	168.862	regelrecht
RP11-15L18	2q37.3	239.544.749	239.713.080	168.331	regelrecht
RP11-622A18	2q37.3	241.401.436	241.554.904	153.468	deletiert

**Tabelle 4.23:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis bei Patient 35 (Träger einer del(2qter)).

\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Von insgesamt sechs verwendeten Sonden hybridisierten fünf regelrecht, eine Sonde war deletiert (vgl. Abbildung 4.23). Die Sonden, die die Aberration eingrenzten, waren RP11-15L18 und RP11-622A18, also dieselben Sonden, die auch bei Patient 34 die Deletion begrenzten. Dementsprechend lag auch in diesem Fall der Bruchpunkt der Deletion in der chromosomalen Subbande 2q37.3, die **Auflösung** betrug auch hier 1,8Mb, und die **Deletionsgröße** war maximal 4Mb.

Da im Rahmen der Bruchpunktbestimmungen die Lymphozytensuspension aufgebraucht wurde, konnten auch hier die Experimente zur weiteren Einengung der Bruchpunkte noch nicht fortgesetzt werden.



**Abbildung 4.23:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Deletion 2qter bei Patient 35 nach Hybridisierung der Sonden RP11-84G18 (*grün*, regelrecht) und RP11-622A18 (*rot*). Auf dem derivativen Chromosom 2 wurde für die Sonde RP11-622A18 kein Signal detektiert (Pfeil).

#### 4.4.3.4 Bruchpunktbestimmungen bei Patient 37

Patient 37 war Träger einer unbalancierten Translokation zwischen den Enden der langen Arme der Chromosomen 7 und 22. Dadurch lag der Abschnitt 7qter trisom und der Abschnitt 22qter monosom vor. Tabelle 4.24 zeigt die verwendeten Klone und Hybridisierungsergebnisse für die Bruchpunktbestimmung der Duplikation 7qter.

Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP5-1136G13	7q36.1	147.666.735	147.850.120	183.385	regelrecht
RP11-422E4	7q36.2	153.511.177	153.662.374	151.197	regelrecht
RP11-518I12	7q36.3	157.273.725	157.479.041	205.316	regelrecht
RP11-11B21	7q36.3	157.477.042	157.688.721	211.679	regelrecht
RP11-354O2	7q36.3	157.842.062	158.043.276	201.214	regelrecht
RP4-708P22	7q36.3	158.119.327	158.252.356	133.029	trisom

**Tabelle 4.24:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 7 bei Patient 37 (Träger eines der(22)t(7qter;22qter)).

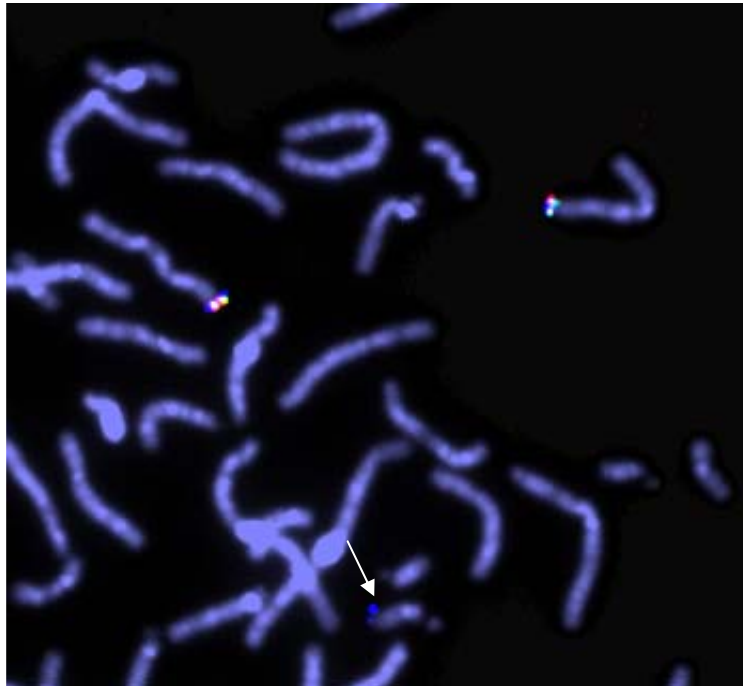
\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Von den sechs zur Bruchpunktbestimmung auf Chromosom 7 eingesetzten Sonden hybridisierten fünf regelrecht, die sechste Sonde, RP4-708P22, erzeugte zusätzliche Signale auf dem derivativen Chromosom 22 (vgl. Abbildung 4.24a). Damit ergab sich hier eine Situation, die der in Abbildung 4.20 dargestellten entspricht (vgl. Kapitel 4.4.2).

Die Auflösung der Bruchpunktbestimmung in diesem Fall errechnete sich aus der Summe von:

1. der Distanz zwischen den begrenzenden Klonen RP11-354O2 und RP4-708P22 (~76kb),
2. etwa 30kb durch die nicht nachweisbare mögliche Translokation von Teilen der durch die Sonde RP11-354O2 detektierten Chromosomenregion auf das derivative Chromosom 22 und
3. die Hälfte der Länge der Sonde RP4-708P22 (~66kb).

Die **Auflösung** betrug demnach 172kb. Das Ende von Chromosom 7 lag bei 158.545.518bp. Der Bruchpunkt lag in 7q36.6. Die maximale **Duplikationsgröße** entsprach dem Abstand des letzten regelrechten Klons vom Telomer zuzüglich 30kb (Nachweisgrenze) und betrug in diesem Fall 532kb.



**Abbildung 4.24a:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation 7qter bei Patient 37 ( $\text{der}(22)\text{t}(7\text{qter};22\text{qter})$ ) nach Hybridisierung der Sonden RP11-11B21 (*grün*, regelrecht), RP11-354O2 (*rot*, regelrecht) und RP11-708P22 (*blau*, dupliziert). Der Pfeil weist auf das zusätzliche Signal der Sonde RP11-708P22 auf dem derivativen Chromosom 22.

In Tabelle 4.25 sind die Klone zur Bruchpunktbestimmung auf Chromosom 22, deren Lokalisationen und Längen sowie die Hybridisierungsergebnisse dargestellt.

Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP3-388M5	22q13.2/13.31	42.400.492	42.578.059	177.567	regelrecht
RP3-439F8	22q13.31	45.136.165	45.256.370	120.205	regelrecht
RP11-191L9	22q13.31	46.230.403	46.376.840	146.437	regelrecht
RP11-262A13	22q13.32	47.239.443	47.367.597	128.154	regelrecht
RP5-925J7	22q13.32	47.573.681	47.672.127	98.446	regelrecht
RP1-34P24	22q13.33	47.783.632	47.888.988	105.356	regelrecht
RP1-170A21	22q13.33	47.888.889	48.065.835	176.946	regelrecht
RP5-983L19	22q13.33	48.294.958	48.371.979	77.021	regelrecht
RP3-522J7	22q13.33	48.371.880	48.456.243	84.363	regelrecht
RP3-355C18	22q13.33	48.607.749	48.709.018	101.269	deletiert

**Tabelle 4.25:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 22 bei Patient 37 (Träger eines  $\text{der}(22)\text{t}(7\text{qter};22\text{qter})$ ).

\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Von zehn verwendeten Sonden zur Bruchpunktbestimmung auf Chromosom 22 hybridisierten neun regelrecht, eine Sonde war deletiert. Die Sonden, die den Bruchpunkt eingrenzten, waren proximal RP3-522J7 (regelrecht) und distal RP3-355C18 (deletiert) (vgl.

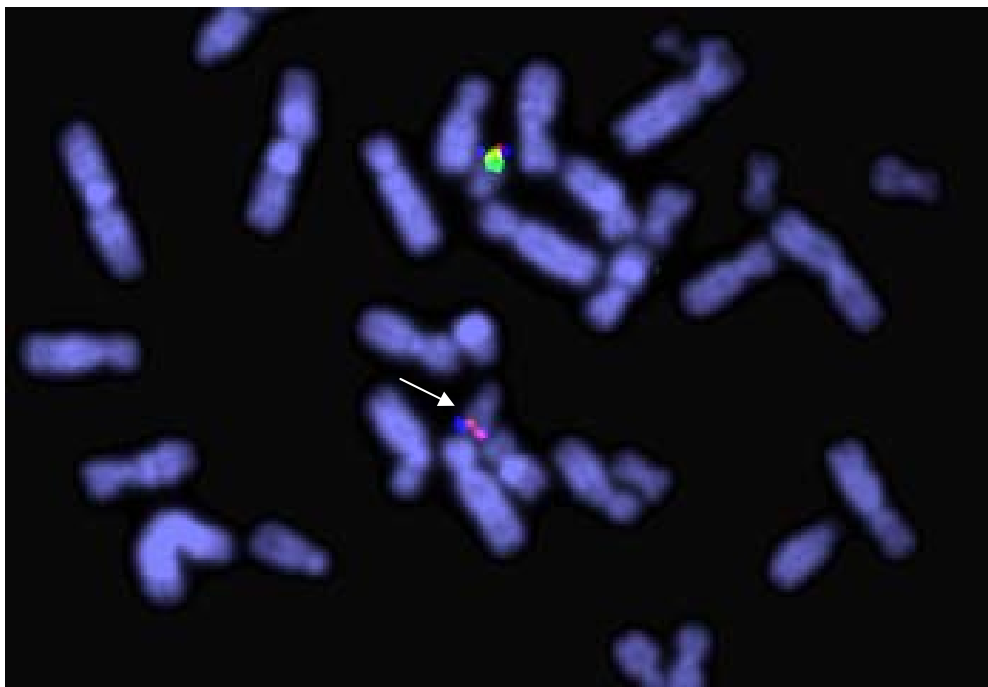
Abbildung 4.24b). Da diese Sonden nicht überlappten, lag hier eine Situation vor, die schematisch in Abbildung 4.18 dargestellt ist (vgl. Kapitel 4.4.1).

Der Bruchpunkt der Aberration lag auf Chromosom 22 in der Subbande q13.33. Die **Auflösung** entsprach der Summe aus:

1. der Distanz zwischen den Klonen RP3-522J7 und RP3-355C18 (~151kb),
2. der Hälfte der Größe der Sonde RP3-522J7 (~50kb) und
3. ca. 30kb.

Sie betrug in diesem Fall etwa 231kb. Das Ende von Chromosom 22 lag bei 49.396.972bp.

Es ergab sich eine **Deletionsgröße** von maximal 983kb.



**Abbildung 4.24b:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Deletion in 22qter bei Patient 37 ( $der(22)t(7qter;22qter)$ ) nach Hybridisierung der Sonden RP5-983L19 (*rot*, regelrecht), RP3-522J7 (*blau*, regelrecht) und RP3-355C18 (*grün*). Auf dem derivativen Chromosom 22 wurde für RP3-355C18 kein Signal detektiert (Pfeil).

#### 4.4.3.5 Bruchpunktbestimmung bei Patient 75

Die Bruchpunktbestimmung der Deletion 16p bei diesem Patienten wurde in Leiden (Niederlande) am LUMC (Leiden University Medical Centre) von Hans Dauwese durchgeführt. Die Positionen der verwendeten Klone wurden aus der Ensembl Datenbank des Sanger Centers ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) entnommen. Tabelle 4.26 zeigt die Klonbezeichnungen, die Distanz der Klone vom Telomer und das Hybridisierungsergebnis.

Klonbezeichnung	Distanz vom Telomer	Hybridisierungsergebnis
RP11-161M6	~1100kb	regelrecht
RP11-728H8	~850kb	regelrecht
Cos 40	~450-800kb	regelrecht
RP11-243K18	~400kb	deletiert

**Tabelle 4.26:** Verwendete Sonden mit Distanz zum Telomer und Hybridisierungsergebnis bei Patient 75 (Träger einer del(16pter)).

Im Rahmen der Bruchpunktbestimmung wurden vier Sonden verwendet, von denen drei regelrecht hybridisierten, die Sonde RP11-243K18 war deletiert. Damit lag hier eine vergleichbare Situation vor, wie sie in Abbildung 4.18 schematisch gezeigt ist (vgl. Kapitel 4.4.1).

Die Auflösung der Bruchpunktbestimmung war hier gleich der Summe von:

1. dem Abstand zwischen den begrenzenden Klonen Cos 40 und RP11-243K18 (50-350kb),
2. ca. 30kb (Nachweisgrenze der FISH).

Da die Länge von Cos 40 nicht bekannt ist, wurde für diese Sonde eine Länge von 40kb angenommen, da in Cosmide zwischen 30 und 46kb Fremd-DNA inkloniert werden können. Die Hälfte dieser Sonde (~20kb) wäre nicht sicher detektierbar gewesen, daher wird sie nicht mit in die Auflösung eingehen.

Die **Auflösung** der Bruchpunktbestimmung betrug demnach ca. 80-385kb. Die maximale **Deletionsgröße** entsprach dem Abstand von Cos 40 zum Telomer, also etwa 450-800kb.

#### 4.4.3.6 Bruchpunktbestimmungen bei Patient 78

Patient 78, der nicht-konsekutiv untersucht wurde, war Träger einer unbalancierten Translokation zwischen den Enden des langen Armes von Chromosom 11 (monosom) und des langen Armes von Chromosom 16 (trisom). In Tabelle 4.27 sind die verwendeten Klone und die Hybridisierungsergebnisse der Bruchpunktbestimmungen für Chromosom 11 aufgeführt.

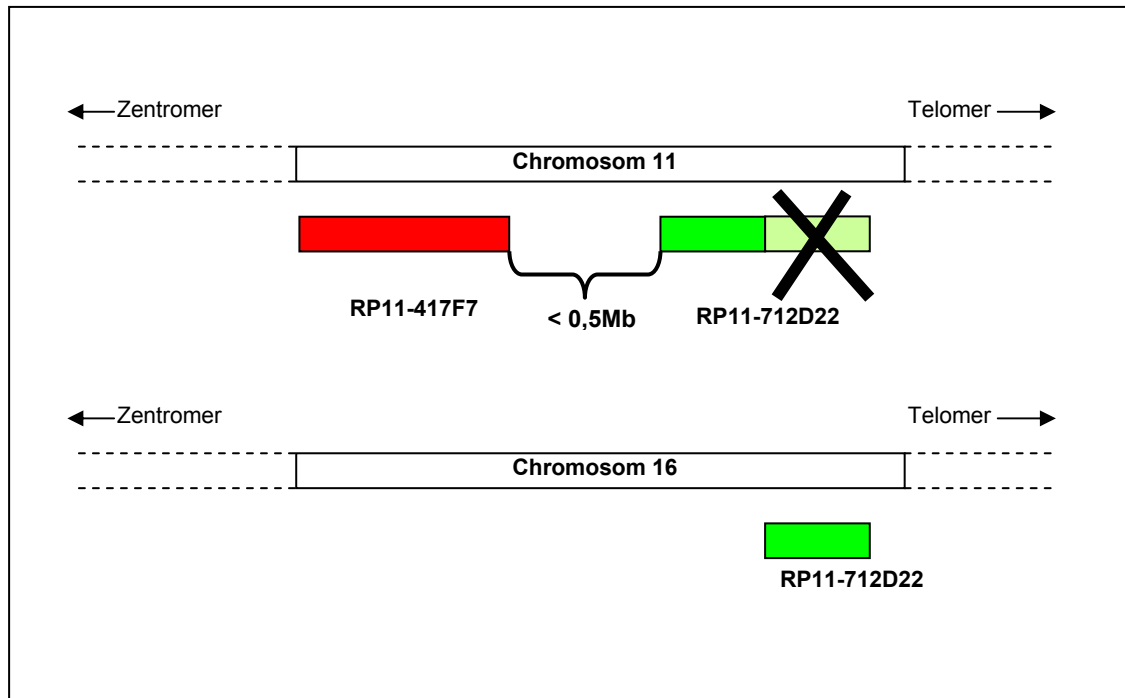
Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP11-334E6	11q23.3	118.741.830	118.933.407	191.577	regelrecht
RP11-811I7	11q24.1	122.056.447	122.246.439	189.992	regelrecht
RP11-417F7	11q24.2	124.717.647	124.889.728	172.081	regelrecht
RP11-712D22	11q24.2	125.014.216	125.184.586	170.370	regelrecht
RP11-673E11	11q24.2	125.379.574	125.560.394	180.820	deletiert
RP11-50B3	11q24.2	125.472.225	125.629.926	157.701	deletiert
RP11-71LI6	11q24.2	125.635.276	125.794.840	159.564	deletiert
RP11-713C6	11q24.2	125.791.882	125.912.361	120.479	deletiert
RP11-678L3	11q25	130.135.250	130.322.164	186.914	deletiert

**Tabelle 4.27:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 11 bei Patient 78 (Träger eines der(11)t(11qter;16qter)).

\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Zur Bruchpunktbestimmung der Deletion des Chromosoms 11 wurden neun Sonden verwendet, von denen vier regelrechte Signalmuster ergaben und fünf deletiert erschienen. Die beiden Sonden, die die Deletion eingrenzten, waren RP11-712D22 (regelrecht) und RP11-673E11 (deletiert).

Da es sich bei diesem Fall um eine familiäre Translokation handelte (vgl. Abbildung 4.17), wurden die Sonden, die beim Patienten die Deletion eingrenzten, auch auf Metaphasepräparate der Mutter, die balancierte Trägerin der Translokation war, hybridisiert. Die Sonde RP11-673E11 war bei der Mutter auf Chromosom 16 transloziert, die Hybridisierung mit der Sonde RP11-712D22 führte zu einem geteilten Signal: Eine Hälfte der Sonde wurde auf Chromosom 11, die andere Hälfte auf Chromosom 16 detektiert (vgl. Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26a).

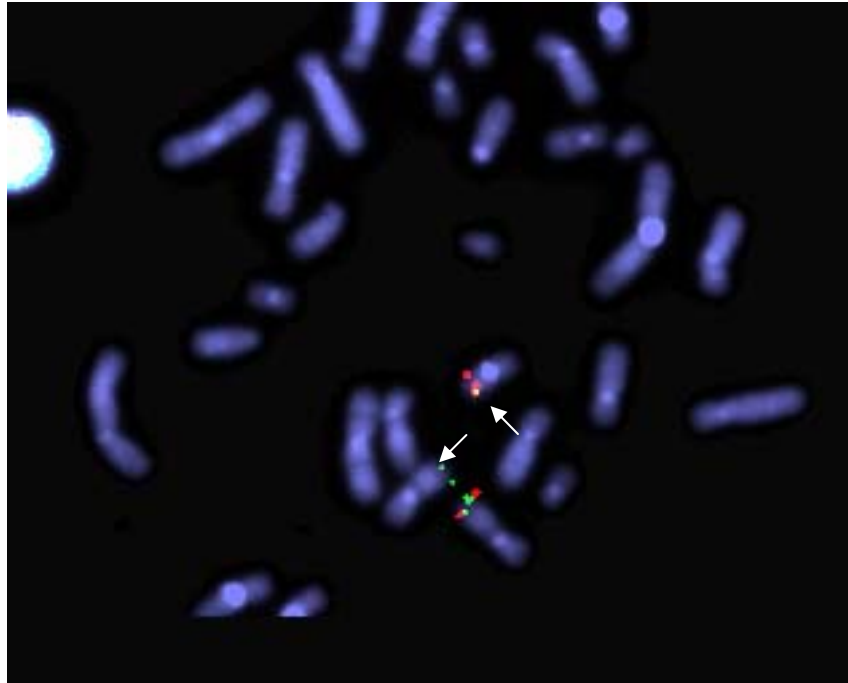


**Abbildung 4.25:** Prinzip der Bruchpunktbestimmung beim balancierten Translokationsträger, RP11-712D22 als Bruchpunkt-überspannender Klon.

Damit war RP11-712D22 ein so genannter „breakpoint-spanning“ (Bruchpunkt-überspannender) Klon, d. h. der Bruchpunkt lag innerhalb der durch diese Sonde nachgewiesenen Region in der Subbande 11q24.2. Da die Signale auf beiden Chromosomen etwa gleich stark waren, betrug die **Auflösung** der Bruchpunktbestimmung in diesem Fall etwa 85kb, was der Hälfte der Klonlänge von RP11-712D22 entspricht. Die **Deletionsgröße** konnte maximal der Entfernung des Chromosomenendes vom Anfang der Sonde RP11-712D22 entsprechen, abzüglich ~85kb, die von der Sonde vorhanden geblieben sein mussten. Das Ende von Chromosom 11 lag bei 134.482.954bp. Die Größe des beim balancierten Träger translozierten und beim unbalancierten Träger deletierten Abschnittes von Chromosom 11 war damit maximal 9,4Mb.

Die zweite unbalancierte Trägerin der Translokation, Probandin III:6 in Abbildung 4.17 (vgl. Kapitel 4.3.4), wies nach Hybridisierung der begrenzenden Sonden RP11-712D22 und RP11-673E11 dasselbe Hybridisierungsmuster wie Patient 78 auf.





**Abbildung 4.26a:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Deletion auf Chromosom 11 beim balancierten Translokationsträger (Mutter von Patient 78; t(11qter;16qter)) nach Hybridisierung der Sonden RP11-673E11 (*rot*) und RP11-712D22 (*grün*). Das Signal der Sonde RP11-712D22 (*grün*) erbrachte sowohl auf dem derivativen Chromosom 11 als auch auf dem derivativen Chromosom 16 Signale ähnlicher Intensität (Bruchpunkt-überspannender Klon). Die Hybridisierung der distaleren Sonde RP11-673E11 erbrachte ein Signal auf dem derivativen Chromosom 16, auf dem derivativen Chromosom 11 fehlte es.

Die Sonden, die zur Bruchpunktbestimmung der partiellen Trisomie auf Chromosom 16 eingesetzt wurden, sind in Tabelle 4.28 aufgelistet.

Klon-bezeichnung	Position	Klon-Start (in bp)*	Klon-Ende (in bp)*	Sondenlänge (in bp)	Hybridisierungsergebnis
RP11-556H2	16q23.1	78.821.535	79.003.836	182.301	regelrecht
RP11-483P21	16q23.3	83.583.792	83.765.182	181.390	regelrecht
RP11-505K9	16q23.3/24.1	83.756.771	83.969.366	212.595	regelrecht
RP11-517C16	16q24.1	84.169.202	84.382.665	213.463	regelrecht
RP11-254F19	16q24.1	84.579.211	84.753.924	174.713	regelrecht
RP11-477D3	16q24.1	84.441.305	84.613.774	172.469	regelrecht
RP11-680G10	16q24.1	85.093.065	85.300.371	207.306	trisom
RP11-410M9	16q24.1	unbekannt	unbekannt	unbekannt	trisom

**Tabelle 4.28:** Verwendete Sonden mit Lokalisation, Länge und Hybridisierungsergebnis für Chromosom 16 bei Patient 78 (Träger eines der(11)t(11qter;16qter)).

\* Abstand vom Telomer des p-Armes in Basenpaaren

Um den Bruchpunkt der Duplikation von 16qter zu charakterisieren, wurden acht Sonden hybridisiert. Sechs dieser Sonden hybridisierten regelrecht, zwei Sonden zeigten ein zusätzliches Signal auf dem derivativen Chromosom 11 (vgl. Abbildung 4.26b). Der Klon

RP11-477D3 war der letzte regelrechte, der Klon RP11-680G10 der erste trisome Klon, der zusätzlich auf Chromosom 11 hybridisierte.

Die beiden begrenzenden Sonden wurden auch auf Metaphasepräparate der Mutter des Patienten (balancierte Translokationsträgerin) hybridisiert. Die Sonde RP11-477D3 hybridisierte regelrecht auf beiden Chromosomen 16. Die Sonde RP11-680G10 wurde auf dem normalen Chromosom 16 und dem derivativen Chromosom 11 detektiert, auf dem derivativen Chromosom 16 fehlte sie. Der Bruchpunkt lag demzufolge zwischen diesen beiden Sonden. Dies entspricht der Situation, die in Abbildung 4.20 dargestellt ist (vgl. Kapitel 4.4.2).

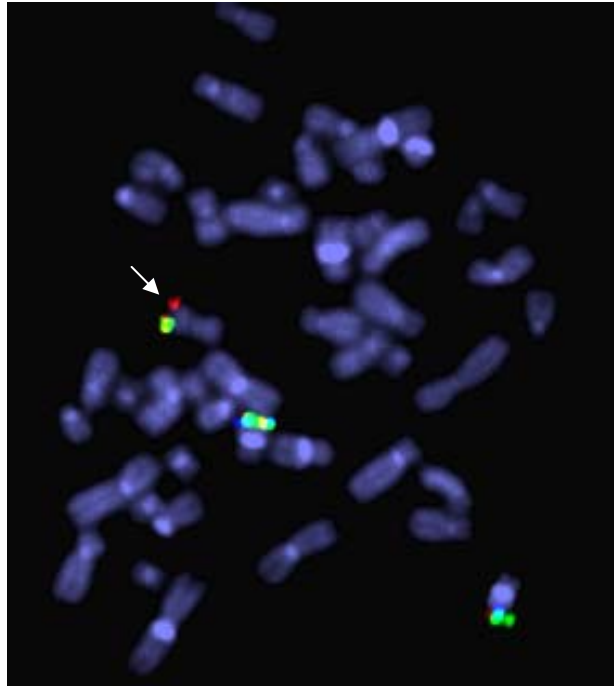
Die **Auflösung** der Bruchpunktbestimmungen entsprach wieder der Summe aus:

1. dem Abstand zwischen den Klonen RP11-477D3 und RP11-680G10 (~479kb),
2. ca. 30kb durch nicht auszuschließende Reste der von RP11-477D3 detektierten Region auf dem derivativen Chromosom 11 und
3. der Hälfte der Länge von Klon RP11-680G10 (~103kb).

Sie betrug demnach rund 612kb.

Das Ende von Chromosom 16 lag bei 90.041.932bp. Damit war das trisome Fragment maximal so groß wie die Distanz vom letzten regelrecht hybridisierenden Klon RP11-477D3 zum Chromosomenende zuzüglich 30kb, die von dieser Sonde auf dem derivativen Chromosom 11 nicht nachweisbar gewesen wären. Die **Duplikationsgröße** betrug also höchstens 5,5Mb, der Bruchpunkt lag in 16q24.1.

Als zweite unbalancierte Trägerin der Translokation zeigte Probandin III:6 (vgl. Abbildung 4.17, Kapitel 4.3.4) nach Hybridisierung mit den begrenzenden Sonden RP11-477D3 und RP11-680G10 dasselbe Hybridisierungsmuster wie Patient 78.



**Abbildung 4.26b:** Ergebnis der FISH zur Bruchpunktbestimmung der Duplikation auf Chromosom 16 bei Patient 78 ( $\text{der}(11)\text{t}(11\text{qter};16\text{qter})$ ) nach Hybridisierung der Sonden RP11-477D3 (*blau*, regelrecht), RP11-680G10 (*rot*, trisom) und RP11-410M9 (*grün*, trisom). Die Sonden RP11-680G10 und RP11-410M9 hybridisierten zusätzlich auf dem derivativen Chromosom 11 (Pfeil).

#### 4.5 Zusammenfassende Darstellung der Subtelomeraberrationen

Tabelle 4.29 zeigt eine Zusammenfassung aller nachgewiesenen Subtelomeraberrationen im konsekutiven und nicht-konsekutiven Untersuchungskollektiv. Angegeben sind die Karyotypformeln (nach ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature), 1995), die korrespondierenden terminalen Deletionen und Duplikationen mit ihren jeweiligen Größen.

P	Karyotyp	Terminale Deletion	(Größe in Mb)	Terminale Duplikation	(Größe in Mb)
29	46,XY,del(14)(q32.31)	14q	( $\leq 5,8$ )	---	---
34	46,XY,der(2)t(2;5)(q37.3;p15.1)	2q	( $\leq 4,0$ )	5p	( $\leq 18$ )
35	46,XX,del(2)(q37.3)	2q	( $\leq 4,0$ )	---	---
37	46,XY,der(22)t(7;22)(q36.3;q13.33)	22q	( $\leq 0,532$ )	7q	( $\leq 0,983$ )
75	46,XX,del(16)(p13.3)	16p	( $\leq 0,5-0,875$ )	---	---
78	46,XY,der(11)t(11;16)(q24.2;q24.1)mat	11q	( $\leq 9,5$ )	16q	( $\leq 5,5$ )

**Tabelle 4.29:** Zusammenfassung der subtelomerischen Chromosomenaberrationen der konsekutiv und nicht-konsekutiv untersuchten MR-Patienten.

In der vorliegenden Arbeit wurden unter den 76 konsekutiv untersuchten Patienten fünf Subtelomeraberrationen detektiert (6,6%). Von insgesamt 82 analysierten Patienten wiesen sechs (7,3%) eine subtelomerische Chromosomenstörung auf. Darunter wurden drei reine Deletionen und drei unbalancierte Translokationen nachgewiesen. Eine dieser Aberrationen,

die unbalancierte Translokation bei Patient 78, war familiär, alle anderen Störungen waren de novo entstanden.

Es wurden Deletionen der terminalen Abschnitte der Chromosomen 2q, 11q, 14q, 16q und 22q detektiert. Für die Patienten 34 und 35 wurden bislang übereinstimmende Bruchregionen auf Chromosom 2q bestimmt, allerdings sind die Bruchpunktbestimmungen bei beiden Patienten noch nicht abgeschlossen. Während Patient 35 Träger einer reinen Deletion war, wurde bei Patient 34 eine unbalancierte Translokation nachgewiesen, die zusätzlich in einer Duplikation terminal im p-Arm von Chromosom 5 resultierte.

Terminale Duplikationen konnten für die Enden der Chromosomen 5p, 7q und 16q nachgewiesen werden. Alle Duplikationen traten im Rahmen unbalancierter Translokationen auf, reine Duplikationen wurden nicht detektiert.

## 5. Diskussion

Eine mentale Retardierung liegt bei etwa 2-3% der Bevölkerung vor. In rund 50% der Fälle sind Chromosomenstörungen, Gendefekte oder exogene Faktoren als Ursache nachzuweisen. Für die übrigen 50% ist die Form der Bedingtheit zur Zeit noch unklar, jedoch erlaubt die Weiterentwicklung der Untersuchungsmethoden eine zunehmende Abklärung. So wiesen Knight et al. (1999) Aberrationen der subtelomerischen Chromosomenregionen als bedeutende Ursache für mentale Retardierung nach. Diese Störungen sind zumeist kryptisch, das heißt sie liegen unter dem Auflösungsvermögen konventionell zytogenetischer Untersuchungsverfahren (3-10Mb).

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 82 Patienten mit mentaler Retardierung auf das Vorliegen kryptischer subtelomerischer Chromosomenaberrationen, also Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen, untersucht. Eine konsekutive Vorgehensweise wurde dabei bei 76 Patienten verfolgt, sechs weitere Probanden wurden nicht-konsequativ untersucht. Alle Patienten wiesen nach konventionell zytogenetischer Analyse mit einer Auflösung von 400-550 Banden pro haploidem Genom einen unauffälligen Chromosomensatz auf. Weiterhin wurde ein Fragiles X-Syndrom, die zweithäufigste Ursache mentaler Retardierung, ausgeschlossen. Da autosomale Chromosomenaberrationen in der Regel durch mentale Retardierung und zusätzliche Dysmorphien und/oder Fehlbildungen charakterisiert sind, ist bei kleinen Störungen zwar eine Reduktion des Spektrums und des Schweregrades zu erwarten, aber es ist ebenfalls von ihrem Auftreten auszugehen. Dies wurde bei der Dokumentation berücksichtigt. Dysmorphien und Fehlbildungen kommen nicht nur bei Patienten mit genetisch bedingten Störungen vor. Sie zeigen in der Allgemeinbevölkerung eine Häufigkeit von bis zu 7% (Felberbaum et al., 2003).

Die Untersuchung kryptischer subtelomerischer Chromosomenaberrationen ist gleichbedeutend mit der Analyse von 43 genetisch relevanten Chromosomenabschnitten bei jedem Patienten. Zum Nachweis solcher Störungen wurden in den publizierten Studien unterschiedliche Methoden angewandt. So konnte mittels *Mikrosatelliten-Analysen* neben der Detektion subtelomerischer Chromosomenaberrationen auch deren parentale Herkunft sowie das Vorliegen einer uniparentalen Disomie bestimmt werden (Slavotinek et al., 1999; Colleaux et al., 2001; Rosenberg et al., 2001). Die Sensitivität dieser Methode ist jedoch durch die eingeschränkte Anzahl und Informativität validierter Mikrosatelliten in den Subtelomerregionen recht gering (de Vries et al., 2003). Darüber hinaus erfordert dieses Verfahren genomische DNA beider Eltern des Probanden. Die *komparative genomische Hybridisierung* (CGH) als molekularzytogenetische Methode ermöglicht die Erfassung unbalanciert vorliegenden Chromosomenmaterials des gesamten Genoms in nur einer Hybridisierung

(Kallioniemi et al., 1992). Problematisch ist dabei jedoch die Auflösung, denn selbst mittels hochauflösender CGH können nur Aberrationen mit einer Größe von 3-10Mb erfasst werden (Kirchhoff et al., 2001). Kleinere subtelomerische Aberrationen (bis zu 60kb) sind jedoch für andere Methoden beschrieben (Flint et al., 1995) und sollten daher immer auch detektierbar sein. Mit den DNA-basierten Techniken ist es weiterhin auch nicht möglich, balancierte Chromosomenstörungen nachzuweisen. Die *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)*, die von Armour et al. (2000) erstmals beschrieben wurde, ist eine molekulargenetische Methode zur Quantifizierung ausgewählter Abschnitte im Genom und wurde ebenfalls für Subtelomer-Analysen verwendet (Sismani et al., 2001; Hollox et al., 2002). Sie ist, ebenso wie die *Array-basierte CGH* oder *Matrix-CGH* (Veltman et al., 2002), jedoch bislang nicht vollständig validiert und erfordert FISH zur Verifizierung der Ergebnisse.

Spätestens mit der Veröffentlichung des so genannten „Second generation probe panel“ von Knight et al. (2000) wurde die Subtelomer-FISH die Methode, deren Anwendung zur Detektion kryptischer subtelomerischer Chromosomenaberrationen am häufigsten angewandt wird.

In den eigenen Untersuchungen wurde die Subtelomer-FISH als nachweislich geeignete, zuverlässige Methode mit hoher Spezifität und Effizienz zum Subtelomer-Screening gewählt. Dabei wurden zwei verschiedene SONDENSETS eingesetzt: Das kommerziell erhältliche „ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel“ und ein eigenes SONDENSET, welches überwiegend dem von Knight et al. (2000) beschriebenen, so genannten „Second generation probe panel“ entsprach.

Ein großer Vorteil der FISH ist, dass auch balancierte Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden können. Käme es bei einer solchen balancierten Störung z. B. zur Disruption eines Gens, könnte dieses als krankheitsverursachend identifiziert werden. Als Beispiel für einen solchen Fall ist das Sotos-Syndrom zu nennen. Kurotaki et al. (2002) identifizierten das NSD1-Gen in 5q35 als krankheitsverursachend anhand des Trägers einer balancierten Translokation  $t(5;8)(q35;q24.1)$ , der das Vollbild des Sotos-Syndroms zeigte und bei dem der Bruchpunkt der Translokation auf Chromosom 5 das NSD1-Gen unterbrach. Darüber hinaus ist diese Methode am besten validiert und in vielen zytogenetischen Laboren gut etabliert. Ein Problem der FISH mit Subtelomer-Sonden waren und sind Deletions-Polymorphismen der subtelomerischen Sonden, die z. B. für den PAC-Klon GS1011O17 in 2qter und für den Cosmid-Klon CY29 in XYpter beschrieben wurden (Ballif et al., 2000; Knight et al., 1999; Riegel et al., 2001). Im eigenen SONDENSET wurden Sonden, die bekannte Polymorphismen aufwiesen, durch nicht-polymorphe ersetzt. Darüber hinaus wurden in den eigenen Untersuchungen bei allen auffälligen Befunden der Subtelomerregionen die elterlichen Chromosomen mit den entsprechenden Sonden untersucht. Außerdem wurden bei den Patienten mit Subtelomeraberrationen zur Verifizierung und Charakterisierung der

Störungen Bruchpunktbestimmungen mit proximal zur Sonde des Sets liegenden Klonen durchgeführt. Nachteilig ist und bleibt jedoch der große Aufwand, der mit der Untersuchung der 43 relevanten Subtelomerregionen einhergeht. So könnten methodische Weiterentwicklungen, z. B. der MAPH oder der Matrix-CGH, zukünftig zur Erhöhung der Effizienz führen, wenn eine ähnliche Spezifität wie bei der FISH zu erreichen ist.

### **5.1 Subtelomerische Chromosomenaberrationen im konsekutiven Untersuchungskollektiv**

Das gesamte Bonner MR-Kollektiv umfasste 205 Patienten mit mentaler Retardierung. Die Patienten wurden überwiegend aus humangenetischen Beratungen im Institut für Humangenetik in Bonn rekrutiert. Die Auswahl der Patienten erfolgte durch die betreuende Ärztin im MR-Projekt, wobei das wichtigste Einschlusskriterium eine mentale Retardierung, unabhängig vom Schweregrad, war. Darüber hinaus wurden Parameter wie prä- und postnatale Wachstumsauffälligkeiten, Dismorphien, Fehlbildungen, auffällige Familienbefunde, pathologische Schwangerschaften bei den Müttern der Patienten und Anfallsleiden erfasst. Die Kombination dieser Parameter ergab ein breites Spektrum phänotypischer Auffälligkeiten im Kollektiv. Durch dieses bewusst breit angelegte Kollektiv sollten Analysen zu einer klinischen Vorauswahl zum Subtelomer-Screening der MR-Patienten ohne Beeinflussung und Vorauswahl durch nicht validierte Einschlusskriterien durchgeführt werden. Eine solche Selektion und damit gezieltere Untersuchung wäre wünschenswert, da die Subtelomer-Analysen aufgrund der vielen zu analysierenden Regionen sowohl zeit- als auch kostenaufwendig sind.

Es wurden 76 Patienten konsekutiv, d. h. in der Reihenfolge, in der sie ins Kollektiv aufgenommen wurden, auf das Vorliegen subtelomerischer Chromosomenaberrationen untersucht. Darüber hinaus wurden sechs weitere Patienten nicht-konsekutiv analysiert, die in den folgenden Abschnitten jedoch nicht berücksichtigt werden. Das Alter der konsekutiv untersuchten Probanden reichte von zwei bis 37 Jahren, der Mittelwert lag bei neun Jahren. Erwartungsgemäß sollten in einem MR-Kollektiv vorwiegend Kinder enthalten sein, da sich mentale Retardierung per Definition vor dem 18. Lebensjahr manifestiert (Battaglia et al., 2003). So war ein Alter von 18 Jahren oder älter von van Karnebeek et al. (2002a) in ihrem Untersuchungskollektiv als Ausschlusskriterium gewertet worden. In der eigenen untersuchten Gruppe waren fünf Probanden 18 Jahre alt oder älter. Alle fünf Patienten wurden jedoch zuvor im Kindesalter zur genetischen Beratung im Institut für Humangenetik vorgestellt und mit Beginn der MR-Studie ins Kollektiv aufgenommen.

Das konsekutive Untersuchungskollektiv bestand zu 59,5% (45/76) aus männlichen und zu 40,5% (31/76) aus weiblichen Patienten mit mentaler Retardierung unklarer Genese. Auch

im gesamten Bonner Kollektiv waren mit 59,5% (122/205) mehr männliche als weibliche Probanden. Allgemein betrifft mentale Retardierung mehr Jungen als Mädchen (Turner et al., 1970; Lehrke et al., 1972). Eine Ursache dafür sind zahlreiche Gene auf dem X-Chromosom, die bei der Entwicklung und Funktion des Gehirns beteiligt sind (XLMR, **X**-linked **m**ental **r**etardation). Chiurazzi et al. fassten bereits 2001 30 verschiedene Formen der XLMR mit ihren unterliegenden Gendefekten zusammen, und Ropers et al. (2003) sagen eine Vielzahl weiterer, noch zu identifizierender Mutationen von Genen auf dem X-Chromosom voraus.

In den eigenen Untersuchungen wurden im konsekutiven Untersuchungskollektiv nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung sechs auffällige Befunde der subtelomerischen Chromosomenregionen erhoben. Durch Untersuchung der Chromosomen der Eltern mit den Sonden, die beim Indexpatienten auffällige Signalmuster zeigten, wurden fünf der Aberrationen als höchstwahrscheinlich verursachend für den Phänotyp des Patienten bestätigt, da die Hybridisierungen auf den elterlichen Chromosomen regelrechte Signalmuster ergaben. Dies entsprach einer Aberrationsfrequenz von 6,6% (5/76) in den subtelomerischen Chromosomenregionen. Eine Störung, eine Deletion der Sonde GS-225F6 in der Subtelomerregion des langen Arms des Y-Chromosoms von Patient 27, wurde auch beim gesunden Vater des Patienten nachgewiesen, so dass es sich in diesem Fall um eine familiäre Variante ohne klinische Relevanz handelte. Dawson et al. (2002) beschrieben ebenfalls einen Patienten ihres mit Subtelomer-FISH untersuchten MR-Kollektivs, der Träger einer subtelomerischen Deletion im langen Arm von Chromosom Y war. Die Analyse von Metaphasepräparationen des gesunden Bruders nach Hybridisierung mit der Sonde für Yqter detektierte dort dieselbe Deletion wie bei seinem mental retardierten Bruder. Deletionen der *Pseudoautosomalen Region 2 (PAR2)* wurden bereits von Kuhl et al. (2001) beschrieben und stehen nicht mit phänotypischen Auffälligkeiten in Verbindung.

Xu und Chen (2003) und de Vries et al. (2003) fassten etwa zeitgleich insgesamt 26 Studien zu subtelomerischen Chromosomenaberrationen bei Patienten mit mentaler Retardierung, die von 1995 bis 2002 publiziert wurden, zusammen (Flint et al., 1995; Viot et al., 1998; Vorsanova et al., 1998; Knight et al., 1999; Lamb et al., 1999; Slavotinek et al., 1999a; Uhrig et al., 1999; Ballif et al., 2000; Bonifacio et al., 2001; Borgione et al., 2001; Colleaux et al., 2001; Fan et al., 2001; Hersh et al., 2001; Joly et al., 2001; Joyce et al., 2001; Kirchhoff et al., 2001; Riegel et al., 2001; Rosenberg et al., 2001; Rossi et al., 2001; Sismani et al., 2001; Anderlid et al., 2002a; Baker et al., 2002; Clarkson et al., 2002; Hélias-Rodzewicz et al., 2002; van Karnebeek et al., 2002a; Rio et al., 2002). So wurden insgesamt 3.131 MR-Patienten beschrieben, die in erster Linie eine schwere mentale Retardierung und zusätzliche phänotypische Auffälligkeiten hatten. Die Untersuchungen erfolgten mittels Subtelomer-FISH, CGH, Primed in situ Labelling (PRINS), Genotyping-Analysen und MAPH. Von den insgesamt 3.131 analysierten MR-Patienten waren 143 Träger subtelomerischer Chromoso-



menaberrationen, entsprechend einer durchschnittlichen Frequenz von 4,6%. Informationen zur Art der Störung lagen für insgesamt 102 der detektierten Chromosomenstörungen vor. Bei 49% der Patienten waren es reine Deletionen, bei 45,1% unbalancierte Translokationen, bei 3,9% reine Duplikationen und bei 2% verschiedene intrachromosomale Umbauten (Xu und Chen, 2003).

In den eigenen Untersuchungen war die Aberrationsfrequenz der subtelomerischen Chromosomenregionen mit 6,6% (drei Deletionen und zwei unbalancierte Translokationen) im konsekutiven Untersuchungskollektiv im Vergleich zur durchschnittlichen Rate der publizierten Studien (4,6%) leicht erhöht. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Häufigkeiten subtelomerischer Chromosomenstörungen zwischen den einzelnen Studien stark variierten.

In der Studie von Joly et al. (2001), die mit CGH 17 Patienten analysierten, wurde mit fünf verschiedenen Aberrationen (29,4%), von denen zwei auch bei weiteren Familienmitgliedern detektiert wurden, die höchste Rate subtelomerischer Chromosomenaberrationen beschrieben. Alle Patienten ihres Kollektivs waren mental retardiert und zeigten Dysmorphien sowie andere klinische Auffälligkeiten wie Wachstumsanomalien, Verhaltensauffälligkeiten, Anfallsleiden oder Fehlbildungen. Die 17 untersuchten Patienten stammten aus 14 Familien, d. h. eine positive Familiengeschichte für mentale Retardierung war ein weiteres Einschlusskriterium.

Eine Studie, die durch ihre geringe Anzahl detektierter Subtelomeraberrationen im MR-Kollektiv auffiel, war die im Jahr 2001 von Joyce et al. publizierte. Sie untersuchten 200 MR-Patienten, die nach konventionell zytogenetischer Analyse bei einer Auflösung von mindestens 550 Banden pro haploidem Genom einen unauffälligen Karyotyp aufwiesen, mittels Subtelomer-FISH. Das untersuchte MR-Kollektiv bestand aus 150 Patienten mit Entwicklungsverzögerung, die unselektiert untersucht wurden, und 50 Patienten, die von einem klinischen Genetiker gezielt aufgrund des „chromosomalen Phänotyps“ ausgewählt wurden. Darüber hinaus untersuchten sie mit der gleichen Methode 150 Kontrollpersonen. Im MR-Kollektiv deckten sie keine kryptischen Subtelomeraberration durch FISH auf, während es im Kontrollkollektiv zwei waren. Sie folgerten aus ihren Befunden, dass kryptische subtelomerische Chromosomenaberrationen keine signifikante Ursache für idiopathische mentale Retardierung darstellen. Vielmehr seien die meisten Subtelomeraberrationen bei hohen Bandenzahlen detektierbar und damit nicht kryptisch. Demgegenüber fanden Phelan et al. (2001), dass solche Störungen trotz ihrer möglichen Größe selbst bei hohen Auflösungen wie 850 Banden/haploidem Genom häufig nicht sichtbar sind, da sie in GC-reichen Regionen liegen, die nach GTG-Bänderung gleichsam flau angefärbt erscheinen. Joyce et al. (2001) postulierten darüber hinaus, dass subtelomerische Chromosomenaberrationen in der Allgemeinbevölkerung häufig auftreten können. Ferner diskutierten sie, dass hochauflösende

konventionell zytogenetische Analysen der Subtelomer-FISH vorzuziehen seien, da diese auch interstitielle Chromosomenaberrationen aufdecken können.

Bei der Bewertung der publizierten Aberrationsfrequenzen bleibt zu beachten, dass die Rate artifiziell dadurch leicht erhöht wird, dass Studien mit höheren Aberrationsfrequenzen einfacher zu publizieren sind als solche, in denen keine Störungen beschrieben werden (de Vries et al., 2003). Darüber hinaus ist die zugrunde liegende Auflösung der konventionell zytogenetischen Untersuchungen bedeutsam, denn je geringer die Bandenzahl ist, umso höher ist die zu erwartende Häufigkeit detektierter Subtelomerstörungen (Joyce et al., 2001). Eine weitere mögliche Ursache für erhöhte Frequenzen durch FISH detektierter subtelomerischer Chromosomenaberrationen könnten Polymorphismen darstellen. Wie bereits einleitend erwähnt, sind für einige Sonden Deletions-Polymorphismen bekannt (Knight et al., 1999; Ballif et al., 2000; Riegel et al., 2001). Zur Verifizierung der detektierten Chromosomenstörungen sind daher, wie in den eigenen Untersuchungen durchgeführt, Elternuntersuchungen notwendig, die nicht in allen publizierten Studien durchgeführt wurden. Als relevante Ursache für die variierenden Raten detektierter Subtelomeraberrationen in den unterschiedlichen Studien spielt auch die Zusammensetzung der Kollektive vermutlich eine entscheidende Rolle.

Für die Kollektivzusammensetzung, die durch die klinische Vorauswahl entscheidend beeinflusst wird, kann z. B. der Schweregrad der mentalen Retardierung von Bedeutung sein. Im deutschen Sprachraum unterscheidet man die mittlere bis schwere mentale Retardierung (IQ<50) von der leichten Form (IQ 50-70). Das eigene, konsekutive Untersuchungskollektiv bestand zu 60,5% aus Patienten mit mittlerer bis schwerer mentaler Retardierung und zu 39,5% aus Probanden mit leichter mentaler Retardierung. Damit war der Anteil an Patienten mit mittlerer bis schwerer im Vergleich zu denen mit leichter mentaler Retardierung nur leicht erhöht. Unter den insgesamt 30 leicht retardierten Patienten waren zwei Träger subtelomerischer Chromosomenstörungen (6,7%), während unter den 46 Patienten mit mittlerer bis schwerer mentaler Retardierung bei drei Probanden (6,5%) eine Störung der subtelomerischen Chromosomenregionen nachgewiesen wurde. Damit bestand zwischen den beiden Gruppen kein nennenswerter Unterschied in der Häufigkeit der Subtelomeraberrationen.

In der ersten großen Studie zu Subtelomeraberrationen bei mentaler Retardierung wurde das Kollektiv in Fälle mit leichter und solche mit mittlerer bis schwerer mentaler Retardierung unterteilt (Knight et al., 1999). Unter 284 Patienten mit mittlerer bis schwerer mentaler Retardierung wurden bei 21 Patienten subtelomerische Chromosomenaberrationen detektiert (7,4%), wohingegen in der Untersuchungsgruppe der Patienten mit leichter mentaler Retardierung, die aus 182 Patienten bestand, nur bei einem Probanden eine Subtelomerstörung nachgewiesen wurde (0,5%). Eine Folge war, dass seit diesem Zeitpunkt

meist MR-Kollektive untersucht wurden, die vorwiegend Patienten mit mittlerer bis schwerer mentaler Retardierung umfassten. Im Gegensatz zur o. g. Studie konnte in den eigenen Untersuchungen zwischen den beiden Subgruppen kein Unterschied bezüglich der Inzidenz subtelomerischer Chromosomenstörungen gefunden werden.

Zusätzlich wurde die Patientenauswahl oftmals von dem Gedanken beeinflusst, dass die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem bestimmten Patienten eine subtelomerische Chromosomenaberration vorliegt, auch mit Zahl und Schweregrad weiterer Auffälligkeiten wie z. B. Fehlbildungen, Dysmorphien, Wachstumsanomalien oder einer auffällige Familiengeschichte im Sinne eines „chromosomalen Phänotyps“ korrelieren könnte (de Vries et al., 2001; Riegel et al., 2001; Hélias-Rodzewicz et al., 2002; Rio et al., 2002).

Einen Grundstein für eine solche Selektion legten de Vries et al. (2001) mit der Publikation ihrer „Checkliste“, die geeignete Einschlusskriterien für subtelomerische Chromosomenaberrationen bei mentaler Retardierung beinhalten sollte (vgl. 2.1.4). Diese Kriterien waren: Familiäre mentale Retardierung, pränatale Dystrophie, postnatale Wachstumsauffälligkeiten (Hoch-/Minderwuchs, Mikro-/Makrozephalie),  $\geq 2$  faziale Dysmorphien, nicht-faziale Dysmorphien und kongenitale Fehlbildungen (Hypospadie, Herzfehler, Handanomalien) (vgl. Tabelle 2.1). In einem Punktesystem wurden diese Merkmale beurteilt und ein Wert von drei Punkten als Grenze gesetzt. Für Patienten, die diesen Schwellenwert erreichten oder überschritten, wurde ein Subtelomer-Screening als sinnvoll erachtet.

Das eigene Untersuchungskollektiv wurde unabhängig von diesen Kriterien aufgestellt. Die retrospektive Analyse der „Checkliste“-Kriterien in der konsekutiv untersuchten Patientengruppe ergab: In 17,1% (13/76) der untersuchten Fälle waren weitere Familienmitglieder mental retardiert. Von 76 untersuchten Patienten waren 17 (22,4%) bei Geburt dystroph. Etwa 30% der Patienten (23/76) lagen mit ihrer Körpergröße und 31,6% (24/76) mit ihrem Kopfumfang zum letzten Untersuchungszeitpunkt außerhalb des Normbereichs. Faziale Dysmorphien wurden bei 80,3% der Patienten (61/76), kongenitale Fehlbildungen im Sinne von de Vries et al. (2001), also Handanomalien, Hypospadie und Herzfehler, bei 48,7% (37/76) beobachtet. Den Schwellenwert von drei Punkten nach de Vries et al. (2001) erreichten oder überschritten insgesamt 53 Patienten (69,7%) des konsekutiven Untersuchungskollektivs. Nach de Vries et al. (2001) hätte demnach bei rund 30% der Patienten auf die Untersuchung der subtelomerischen Chromosomenregionen verzichtet werden können. Allerdings wären dann auch 60% der Patienten (3/5) mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen nicht untersucht worden, denn Patient 37 hatte null Punkte, Patient 75 einen und Patient 35 zwei Punkte. Die Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen lagen mit durchschnittlich 2,4 Punkten unter dem von de Vries et al. (2001) postulierten Schwellenwert. Hier wird besonders deutlich, dass eine Vorselektion mit den gewählten Merkmalen der „Checkliste“ im eigenen Kollektiv nicht sinnvoll gewesen wäre. Ähnliche

Ergebnisse wurden von Baker et al. (2002) publiziert. Sie untersuchten 250 Patienten mit mentaler Retardierung mittels hochauflösender Bänderungstechniken und Subtelomer-FISH und detektierten neun subtelomerische Chromosomenaberrationen (9/250, 3,6%). Die retrospektive Analyse der „Checkliste“-Kriterien bei ihren Trägern subtelomerischer Störungen ergab, dass sieben der neun Patienten drei Punkte oder mehr hatten. Zwei Patienten hatten jedoch nur zwei Punkte und wären nach de Vries et al. (2001) nicht für ein Subtelomer-Screening ausgewählt worden.

Das eigene Untersuchungskollektiv war, unabhängig von den Parametern von de Vries et al. (2001), breit angelegt. Es umfasste Patienten mit mentaler Retardierung aller Schweregrade (s. o.). Nahezu alle Patienten zeigten neben ihrer mentalen auch eine motorische Retardierung (96%), darunter alle fünf Patienten mit Subtelomeraberrationen.

Das Merkmal „Anfallsleiden“ als zentralnervöse Störung wurde von de Vries et al. (2001) nicht diskutiert. Mehr als 20% der konsekutiv untersuchten Patienten hatten ein Anfallsleiden. Unter diesen Patienten machten diejenigen mit Subtelomeraberration nahezu 13% aus. Wären die Anfallsleiden als Parameter für die „Checkliste“ nach de Vries et al. (2001) ausgewählt worden, hätten die Patienten 34 und 35 zusätzliche Punkte erhalten. So wäre Patient 35, der mit zwei Punkten aus der Gruppe der zu untersuchenden Patienten ausgeschlossen war, mit einem weiteren Punkt ein Kandidat zur Subtelomer-Analyse geworden. Demnach wären noch 40% (2/5) der Patienten mit Subtelomeraberrationen nicht analysiert worden, im Gegensatz zu 60% (3/5) ohne den Parameter „Anfallsleiden“. Die Betrachtung dieses Merkmals im Rahmen einer klinischen Vorselektion sollte nach den vorliegenden Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

Prä- und postnatale Wachstumsanomalien, zumeist Retardierungen, werden bei Trägern von Chromosomenaberrationen gehäuft beobachtet (Schinzel, 2001). Im konsekutiven Untersuchungskollektiv war das Geburtsgewicht bei ca. 22% der Probanden erniedrigt. Unter diesen dystrophen Patienten war ein Patient mit einer Subtelomeraberration (5,9%). Die aktuelle Körperlänge war bei insgesamt 30% der konsekutiv untersuchten Patienten außerhalb des Normbereichs, wobei 26% minder- und 4% hochwüchsig waren. Ein Minderwuchs wurde bei keinem der Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen nachgewiesen, hochwüchsig war einer dieser fünf, der damit 33% der Gesamtgruppe der Hochwüchsigen ausmachte. Der Kopfumfang war bei 31% der Untersuchten pathologisch verändert, wobei 9% makro- und 22% mikrozephal waren. Eine Makrozephalie lag bei keinem der Patienten mit subtelomerischer Chromosomenstörung vor. Mikrozephal war einer der Probanden mit Subtelomeraberrationen und machte damit knapp 6% aller mikrozephalen Patienten aus. Abgesehen vom Hochwuchs trat keiner der Wachstumsparameter in der Gruppe der Patienten mit Störungen der subtelomerischen Chromosomenregionen auffällig gehäuft auf. Die scheinbar hohe Inzidenz für den Hochwuchs in der Gruppe der Träger subtelomerischer Chromoso-

menaberrationen ist aber aufgrund der insgesamt geringen Prävalenz dieses Parameters im untersuchten Kollektiv mit Vorsicht zu bewerten.

Ein relevantes Einschlusskriterium in zahlreichen publizierten Kollektiven war das Auftreten mehrerer mental retardierter Familienmitglieder als Hinweis auf das Vorliegen einer familiären Chromosomenaberration. In den eigenen Untersuchungen gab es mehr als einen MR-Patienten in den Familien von 17,1% (13/76) der analysierten Fälle. Unter diesen familiären Fällen war einer Träger einer Subtelomerstörung (7,7%). Der Bruder von Patientin 75 war ebenfalls mental retardiert. Die Analyse der Subtelomeraberrationen bei diesem Patienten erbrachte jedoch keine Auffälligkeiten. Wie bereits erwähnt, waren alle Subtelomeraberrationen, die im konsekutiven Untersuchungskollektiv aufgedeckt wurden, de novo entstanden. Bei der Familiarität der mentalen Retardierung handelte es sich also in diesem Fall höchstwahrscheinlich um einen Zufallsbefund.

Das Kriterium „pathologische Schwangerschaften der Mütter der Patienten“, ein Merkmal, welches von de Vries et al. (2001) zwar diskutiert, aufgrund einer niedrigen Prävalenz in der Patientengruppe mit Subtelomerstörungen jedoch nicht in der „Checkliste“ etabliert wurde, zeigte in der eigenen Untersuchungsgruppe eine Häufigkeit von 21/76 (27,6%). In der Gruppe der Patienten, deren Mütter pathologische Schwangerschaften hatten, waren drei (14,3%) Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen. Da jedoch alle nachgewiesenen Aberrationen de novo entstanden waren, wäre der einzig theoretisch denkbare Zusammenhang das Vorliegen eines Keimzellmosaiks bei einem der Elternteile. Da Keimzellmosaik für strukturelle Chromosomenaberrationen mit unter 1% extrem selten sind, handelte es sich bei der Häufigkeit des Kriteriums „pathologische Schwangerschaften bei den Müttern der Patienten“ in den eigenen Untersuchungen wahrscheinlich um Zufallsbefunde.

Das konsekutiv untersuchte Kollektiv umfasste sowohl Patienten mit einem so genannten „chromosomalen Phänotyp“, die zusätzlich zur mentalen Retardierung beispielsweise Fehlbildungen und/oder Dysmorphien aufwiesen (85,5%), als auch Patienten, die neben ihrer mentalen Retardierung keine weiteren Auffälligkeiten zeigten (14,5%). Unter den Patienten, die sowohl Dysmorphien als auch Fehlbildungen zeigten, machten die Patienten mit subtelomerischen Chromosomenstörungen 6,5% aus. In der Gruppe der Probanden ohne Fehlbildungen und ohne Dysmorphien wurden bei 18,2% Subtelomerstörungen nachgewiesen. Patienten mit Subtelomeraberrationen, die nur Dysmorphien oder nur Fehlbildungen hatten, wurden nicht beobachtet. Die Tatsache, dass die Patienten mit Subtelomeraberrationen gehäuft auch in der Gruppe der Patienten ohne Dysmorphien und ohne Fehlbildungen einzuordnen waren, spricht in diesem Fall stark gegen die Zusammensetzung von MR-Kollektiven anhand eines „chromosomalen Phänotypen“, wie sie gehäuft beschrieben wurde (de Vries et al., 2001; Riegel et al., 2001; Hélias-Rodzewicz

et al., 2002; Rio et al., 2002). Ein weiteres Argument aus den eigenen Untersuchungen, das gegen eine solche Selektion spricht, ist die Familiarität. Unter den fünf Patienten mit Subtelomeraberrationen spielte sie keine Rolle.

Zusammenfassend belegen die eigenen Untersuchungsergebnisse, dass eine klinische Vorselektion von Patienten mit mentaler Retardierung im Hinblick auf ein Subtelomer-Screening problematisch ist. Weder häufig verwendete Auswahlkriterien wie Dysmorphien und Fehlbildungen oder Familiarität der mentalen Retardierung, die für einen „chromosomalen Phänotyp“ als bezeichnend angesehen wurden, noch die Parameter der „Checkliste“ nach de Vries et al. (2001) hätten in den eigenen Untersuchungen ausgereicht, eine sinnvolle Vorselektion im eigenen konsekutiven Untersuchungskollektiv durchzuführen. Darüber hinaus bestätigt die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Aberrationsfrequenz von 6,6%, dass kryptische Aberrationen der Subtelomerregionen an der Entstehung von mentaler Retardierung ursächlich beteiligt sind und Subtelomer-Screenings in MR-Kollektiven sinnvoll sind.

## 5.2 Subtelomeraberrationen und korrespondierende Phänotypen im Detail

Der Versuch einer Karyotyp- oder Genotyp-Phänotyp Korrelation dient dazu, die Größe und Lokalisation von deletierten und duplizierten Chromosomenregionen (und letztlich die darin enthaltenen Gene) mit dem spezifischen Phänotyp, also dem Vorliegen oder Fehlen bestimmter Symptome, von Patienten in Verbindung zu bringen. Karyotyp-Phänotyp Korrelationen, z. B. bei Subtelomeraberrationen, stellen zwangsläufig eine Vereinfachung der in beiden Gruppen gegebenen Besonderheiten dar, da bestimmte Faktoren nur indirekt mit einbezogen werden können.

Zu diesen Faktoren zählt zunächst der *genetische Hintergrund*, der bei jedem Patienten unterschiedlich ist und beispielsweise Wechselwirkungen mit Genen beinhaltet, die nicht von der Imbalance betroffen sind. Weiterhin zählen hierzu eine herabgesetzte *Penetranz* und eine *variable Expressivität* bestimmter Merkmale. Ein zusätzlicher Aspekt, der stets zu berücksichtigen ist, ist die *genomische Prägung* (genomic imprinting). Prägung von Genen bedeutet, dass sie in Abhängigkeit von der parentalen Herkunft aktiv oder inaktiv sind. Eine Reihe der bekannten Gene sind geprägt (Morison et al., 2001; vgl. <http://cancer.otago.ac.nz/IGC/Web/home.html>). Im Falle einer Deletion kann dies bedeuten, dass zwei Patienten mit identischen Bruchpunkten einer definierten Deletion verschiedene Phänotypen aufweisen, wenn die derivativen Chromosomen unterschiedlicher parentaler Herkunft sind. Auch *Mosaik*, die bei der Analyse von nur einem Zellsystem unentdeckt bleiben können, würden den resultierenden Phänotyp beeinflussen. Das Vorliegen einer zusätzlichen kryptischen interstitiellen Chromosomenaberration kann ebenfalls durch ein

Subtelomer-Screening nicht ausgeschlossen werden. Zahlreiche Karyotyp-Phänotyp Korrelationen sind zudem schwierig zu erstellen, da die Untersuchungskriterien nicht immer einheitlich sind. Darüber hinaus werden häufig Patienten einander gegenübergestellt, die große Altersunterschiede aufweisen, was in einer eingeschränkten Vergleichbarkeit bestimmter klinischer Parameter resultiert.

Da jedoch die genannten Faktoren wie z. B. der genetische Hintergrund nicht oder noch nicht untersuchbar sind, stellen die Korrelationen möglichst exakt bestimmter Bruchpunkte mit genau erfassten klinischen Phänotypen einen wichtigen ersten Schritt zur Identifizierung verantwortlicher Gene dar.

Ein entscheidendes Problem, besonders im Rahmen von Karyotyp-Phänotyp Korrelationen bei Trägern terminaler Chromosomenaberrationen, sind uneinheitliche Untersuchungsmethoden mit z. T. sehr geringen Auflösungen. So kann z. B. bei scheinbar vorliegender Deletion eine assoziierte Trisomie durch Bänderungstechniken allein nicht ausgeschlossen werden (Ballif et al., 2000). Da in der vorliegenden Arbeit aber bei allen Patienten ein Subtelomer-Screening assoziierte terminale Trisomien detektiert hätte, ist dieser Aspekt für die eigenen Untersuchungen weitestgehend auszuschließen. Darüber hinaus wurden Bruchpunktbestimmungen mittels FISH durchgeführt, um die detektierten Aberrationen so genau wie möglich zu charakterisieren.

### 5.2.1 Einzelfalldarstellungen zur Karyotyp-Phänotyp Korrelation

#### **Patient 29:**

Der zum Zeitpunkt der Erfassung vierjährige Junge war Träger einer 5,8Mb großen Deletion im terminalen Bereich des langen Arms von Chromosom 14 (Karyotyp: 46,XY,del(14)(q32.31)de novo). Zum Untersuchungszeitpunkt war der Patient hochwüchsig und mittel bis schwer mental retardiert bei gleichzeitig verzögerter motorischer Entwicklung. Die kraniofazialen Dysmorphien, die bei ihm auffielen, waren: Hohe Stirn, Epikanthus beidseits, Blepharophimose, antimongoloide Lidachsenstellung, kleine Nase mit breitem Rücken und antevierten Nares, langes Philtrum, schmale Oberlippe und dysplastische, einfach geformte Ohren. Darüber hinaus hatte er an beiden Händen eine Vierfingerfurche. Als Fehlbildungen lagen bei ihm eine operationspflichtige Hypospadie und eine ausgeprägte Myelinisierungsstörung im Gehirn vor.

Deletionen im langen Arm von Chromosom 14 sind beschrieben, meist allerdings im Zusammenhang mit Ringchromosomenbildung (r) (Schmidt et al., 1981; Fryns et al., 1983; Gilgenkrantz et al., 1984; Schinzel, 2001). Die Abgrenzung des Phänotyps einer reinen terminalen Deletion von dem der r(14)-Patienten, bei denen zusätzliche Effekte durch die

mitotische Instabilität der Ringchromosomen vorliegen können, war lange umstritten. Meschede et al. (1998) stellten die Phänotypen von Patienten mit r(14) denen mit linearen Deletionen in 14qter gegenüber und stellten fest, dass bei Ringchromosomenträgern ein schwerwiegenderer Phänotyp vorliegt als bei Patienten mit linearen, terminalen Deletionen. Während Spruijt et al. (2000) behaupteten, für lineare terminale Deletionen 14q gäbe es kein eigenständiges Syndrom, postulierten van Karnebeek et al. (2002b) einen wieder erkennbaren Phänotyp im Sinne eines Syndroms bei diesen Deletionen. Sie verglichen einen eigenen Patienten mit terminaler Deletion und Bruchpunkt in 14q32.31 mit 18 weiteren Patienten mit linearen 14q-Deletionen und fassten außerdem 23 Patienten mit r(14) zusammen. Merkmale, die bei mehr als 50% der Patienten mit linearer Deletion 14q beobachtet wurden, waren: Hypotonie, mentale Retardierung, definierte faziale Dysmorphien (hohe Stirn, Blepharophimose, Epikanthus, breiter und flacher Nasenrücken, kurze Nase, breites Philtrum, schmale Oberlippe, kleiner Karpfenmund, hoher Gaumen, Zahnfehlstellungen, tief sitzende Ohren mit dysmorphen Helices, Mikrognathie), Vierfingerfurche und Mikrozephalie.

Der eigene Patient passte mit seinen phänotypischen Merkmalen sehr gut in dieses Spektrum, allerdings wurden Mikrozephalie, Mikrognathie, Zahnfehlstellungen sowie ein hoher Gaumen bei ihm nicht festgestellt. Dies könnte, neben den in 5.2 beschriebenen Faktoren, auf einen Bruchpunkt in distaleren Regionen, also eine kleinere Deletion beim eigenen Patienten hindeuten. Diese Hypothese ist aber nicht zu verifizieren, da bei den meisten publizierten Fällen die Deletionsgrößen lediglich durch Bänderungstechniken bestimmt wurden, und keine genaueren Bruchpunktbestimmungen mittels FISH oder Mikrosatelliten-Analysen vorliegen. Van Karnebeek et al. (2002b) bestimmten den Bruchpunkt bei ihrem Patienten durch die Analyse polymorpher Marker mit einer Genauigkeit von etwa 3,6Mb. Die Deletion in den vorliegenden Untersuchungen wurde mit einer Genauigkeit von 100kb bestimmt.

Darüber hinaus wies Patient 29 zusätzliche Merkmale auf, die für 14q-Deletionen nicht oder nur sehr selten beschrieben sind: Hypospadie, Hochwuchs und eine Myelinisierungsstörung. Myelinisierungsstörungen können nur nach Kernspinalanalysen des Kopfes der Patienten erfasst werden, die nur selten durchgeführt werden. Es gibt eine Reihe möglicher Ursachen für zusätzlich auftretende Merkmale, die bereits in 5.2 diskutiert wurden, z. B. der genetische Hintergrund oder mögliche phänotypische Auswirkungen durch genomische Prägung. Für Chromosom 14 sind zwar geprägte Gene bekannt (Ledbetter und Engel, 1995), aber van Karnebeek et al. (2002b) verglichen in ihrer Arbeit Aberrationen paternaler und maternaler Herkunft und fanden keine Hinweise auf Imprinting Effekte im terminalen Bereich des langen Arms von Chromosom 14.



**Patient 34:**

Dieser Patient war bei der Untersuchung sechs Jahre alt und war Träger einer unbalancierten Translokation zwischen den terminalen Bereichen des langen Arms von Chromosom 2 und des kurzen Arms von Chromosom 5 (Karyotyp: 46,XY,der(2)t(2;5)(q37.3;p15.1)de novo). Die Bruchpunktbestimmungen bei diesem Patienten konnten aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials in der vorliegenden Arbeit noch nicht abgeschlossen werden. Die Deletion in 2qter war mindestens 2,2 und höchstens 4Mb groß. Die Duplikation in 5pter war mindestens 15,8 und maximal 18Mb groß. Retrospektiv konnte die Aberration in Metaphasen mit langen Chromosomen (~550 Banden pro haploidem Genom) konventionell zytogenetisch erfasst werden. Allgemein gilt jedoch, dass unbalancierte Translokationen der terminalen Bereiche konventionell zytogenetisch deshalb schwierig zu erfassen sind, weil die Chromosomenenden nach GTG-Bänderung gleichermaßen flau gefärbt erscheinen (Flint et al., 1995) und darüber hinaus unterschiedliche Kondensationszustände der Metaphasechromosomen mögliche Größenunterschied weniger deutlich erscheinen lassen. Ebenso wie Aberrationen, die aufgrund ihrer Größe durch die Analyse gebänderter Chromosomen nicht erfassbar sind, bezeichnet man diese Störungen als kryptisch (Flint et al., 1995).

Patient 34 fiel durch eine leichte psychomotorische Retardierung auf und litt unter Anfällen. Seine Körpermaße lagen alle im Normbereich. Bei der körperlichen Untersuchung fanden sich folgende kraniofaziale Dysmorphien: Niedrige Stirn mit tiefem Haaransatz, Hypertelorismus, große, abstehende, dysplastische Ohren, vorspringende Nasenwurzel und flacher Gaumen. An seiner linken Hand wies er eine Vierfingerfurche auf. Er hatte eine Brachydaktylie und eine Klinodaktylie beidseits. Als Fehlbildungen wurden ein persistierender Ductus arteriosus (PDA) sowie Leistenhernien diagnostiziert. Eine Kernspinuntersuchung des Gehirns zeigte keine Auffälligkeiten.

In der Literatur ist ein Patient mit Duplikation 5p15.1-5p15.3 beschrieben worden (Baialardo et al., 2003). Dieser Patient war phänotypisch unauffällig und wurde zytogenetisch nur deshalb untersucht, weil zwei seiner Brüder ein „Cri du chat“-Syndrom hatten. Chia et al. (1987) beschrieben einen Patienten mit Duplikation 5p14-pter, der keine kraniofazialen Dysmorphien aufwies und leicht mental retardiert war. Ein weiterer Patient mit einer solchen Duplikation hatte einen Herzfehler, und seine psychomotorische Entwicklung war verzögert (Zenger-Hain et al., 1993). Die Duplikation bei Patient 34 war kleiner als die der letzten beiden beschriebenen Patienten, und die einzige Beschreibung eines Trägers einer vergleichbaren Duplikation war bei einem phänotypisch normalen Probanden. Somit ist trotz der Größe der Duplikation von einem geringen Einfluss auf den Phänotypen des Patienten auszugehen.

Deletionen in 2q37.3 wurden für zehn de novo-Fälle mitgeteilt und sind gehäuft mit Pseudohypoparathyreodismus, einem Krankheitsbild ähnlich dem der Knochenstoffwechselerkrankung „Albright hereditary osteodystrophy (AHO)“ in Verbindung gebracht worden (Phelan et al., 1995; Wilson et al., 1995; Bonaglia et al., 2000). Das klinische Bild ist charakterisiert durch: Minderwuchs, rundes Gesicht, dünne Haare, tiefsitzende Augen, Brachdaktylie, Anfallsleiden und Entwicklungsverzögerung. Batstone et al. (2003) untersuchten sieben Generationen einer Familie mit einer Translokation t(2;11)(q37.3;p15.5). Beim Indexpatienten ergab die Subtelomer-FISH mit der Sonde für 11pter ein normales Ergebnis und mit der Sonde für 2qter eine Deletion. Die Autoren schlossen daraus auf eine terminale Deletion, wobei der Bruchpunkt in 11pter distaler lag als die durch die verwendete Sonde abgedeckte Region. In dieser Familie traten sechs Patienten mit derselben Deletion, aber leicht variierenden Phänotypen auf. Sie verglichen ihre Patienten mit vier weiteren publizierten Patienten mit terminalen 2q-Deletionen (Phelan et al., 1995; Wilson et al., 1995; Reddy et al., 1999). Mentale Retardierung, die bei 9/10 Patienten diagnostiziert wurde, lag auch beim eigenen Patienten vor. Anfallsleiden wurden bei zwei publizierten Fällen und bei Patient 34 nachgewiesen. Übereinstimmend mit 2/10 beschriebenen Fällen zeigte der eigene Patient ebenfalls Leistenhernien. Auch seine fazialen Dysmorphien, abgesehen vom Hypeertelorismus, stimmen mit den veröffentlichten Patienten gut überein. Als eines der Leitsymptome des Pseudohypoparathyreodismus wies auch der Patient 34 Handauffälligkeiten im Sinne einer Brachydaktylie auf.

Phänotypische Merkmale, die bei Patient 34 vorlagen, für 2q-terminale Deletionen und Duplikationen 5p15.1-pter jedoch nicht beschrieben wurden, waren Herzfehler und Hypeertelorismus.

#### **Patient 35:**

Die sechsjährige Patientin war Trägerin einer Deletion im langen Arm von Chromosom 2 (Karyotyp: 46,XX,del(2)(q37.3)de novo). Die Bruchpunktbestimmungen erbrachten bislang dieselben Ergebnisse wie bei Patient 34. Auch hier konnten sie noch nicht abgeschlossen werden, da das Untersuchungsmaterial verbraucht war. Die Deletion war mindestens 2,2 und höchstens 4Mb groß bei einer Bestimmungsgenauigkeit von 1,8Mb. Die mittel bis schwer psychomotorisch retardierte Patientin wies ein breites Gesicht, tiefliegende Augen, schmale Lidachsen, große Ohren und ein prominentes Kinn als kraniofaziale Dysmorphien auf. Sie hatte eine Mikrozephalie, war stark übergewichtig und litt unter Anfällen. Die Hände wirkten unauffällig, Röntgenbefunde lagen jedoch nicht vor.

Die Einordnung dieser Patientin in das klinische Bild des Pseudohypoparathyreodismus (s. o.) war aufgrund der fehlenden Handsymptomatik nicht eindeutig möglich, passend waren jedoch die Entwicklungsverzögerung, die tiefliegenden Augen sowie das Anfallsleiden.

Giardino et al. (2003) postulierten, Pseudohypoparathyreodismus sei ein so genanntes „contiguous gene syndrome“, bei dem das klinische Bild abhängig ist von der Größe des deletierten Segments in 2qter. Möglicherweise ist die Deletion bei dieser Patientin kleiner als bei Patient 34 und somit der Phänotyp leicht abgeschwächt. Erst nach Abschluss der Bruchpunktbestimmungen bei den Patienten 34 und 35 kann diese Hypothese untersucht und eine genauere Genotyp-Phänotyp Korrelation versucht werden.

### **Patient 37:**

Dieser Patient war bei der Untersuchung fünf Jahre alt und hatte eine unbalancierte Translokation zwischen den terminalen Bereichen der langen Arme von Chromosom 7 und 22 (Karyotyp: 46,XY,der(22)t(7;22)(q36.6;q13.33)de novo). Die Duplikationsgröße in 7qter wurde mit einer Genauigkeit von 172kb auf etwa 500kb bestimmt. Die Deletion 22qter war maximal 983kb groß, die Auflösung der Bruchpunktbestimmung betrug hier 231kb. Die psychomotorische Entwicklung des Jungen war leicht verzögert, wobei der Schwerpunkt der mentalen Retardierung im sprachlichen Bereich lag. Die physische Untersuchung zeigte keine kraniofazialen Dysmorphien, seine Wachstumsparameter waren im Normbereich, und auch Fehlbildungen wurden nicht diagnostiziert. Es fielen lediglich eine Hypotonie sowie eine Überstreckbarkeit der Gelenke auf.

Es sind größere Duplikationen in 7q publiziert, die mit Hydrozephalie, Makrozephalie, hoher, vorspringender Stirn, abfallenden Lidachsen, Strabismus, Gaumenspalte, tiefliegenden Ohren und Muskelhypotonie einhergehen (Forabosco et al., 1988; Bartsch et al., 1990; Romain et al., 1990; Robinet et al., 2000). Beschreibungen von Patienten mit Duplikationen der Region 7q36 sind selten. Morava et al. (2003) publizierten einen mental retardierten, stark hypotonen Patienten mit unbalancierter Translokation der(13)t(7;13)(q35;q34) und typischen fazialen Auffälligkeiten von Patienten mit größeren 7q-Duplikationen wie: Prominente Stirn, tiefsitzende Ohren, Gaumenspalte und Strabismus. Sie postulierten, dass selbst kleine terminale Duplikationen mit dem Vollbild des distalen Trisomie 7q-Syndroms aus hoher Stirn, großer Fontanelle, hypoplastischem Mittelgesicht, tiefsitzenden Ohren, schwerer Entwicklungsverzögerung und Gaumenspalte einhergehen (Novales et al., 1982; Bartsch et al., 1990). Verma et al. (1992) beschrieben einen Patienten mit mentaler Retardierung, besonders ausgeprägter Sprachentwicklungsverzögerung, einer vorspringenden Stirn und einem großen Schädel mit einer Tandem-Duplikation 7q36→qter. Eine Gaumenspalte lag bei diesem Patienten nicht vor.

Patient 37 passte aufgrund der Hypotonie und der mentalen Retardierung in das klinische Bild der Duplikationen in 7qter. Beide Merkmale sind allerdings auch für Deletionen in 22qter charakteristisch (s. u.). Er zeigte jedoch nicht die für 7q-terminale Duplikationen typische Gaumenspalte, die aber auch bei dem Patienten von Verma et al. (1992) mit vergleichbar

kleiner Duplikation nicht vorlag. Gene, die an der Entstehung von Gaumenspalten beteiligt sind, können demnach proximal zu dem in der vorliegenden Arbeit bestimmten Bruchpunkt in 7q36.6 liegen. Darüber hinaus wies der eigene Patient, im Gegensatz zu dem von Verma et al. (1992) beschriebenen, keine fazialen Dysmorphien auf. Eine mögliche Erklärung dafür könnte, neben den in 5.2 diskutierten Faktoren, ein distalerer Bruchpunkt beim eigenen Patienten sein. Aufgrund fehlender Vergleichbarkeit der Bruchpunktbestimmungen, die bei den publizierten Fällen auf der Grundlage konventionell zytogenetischer Analysen erfolgten, ist diese Hypothese jedoch nicht überprüfbar.

Phelan et al. (2001) fassten 61 Patienten mit Deletionen im terminalen Bereich von Chromosom 22 zusammen und postulierten ein so genanntes 22q13-Deletionssyndrom. Sie schlugen die Untersuchung terminaler Deletionen mittels geeigneter FISH-Sonden bei Patienten mit folgendem Phänotyp vor: Hypotonie, mentale Retardierung mit Sprachentwicklungsverzögerung und leichte oder fehlende faziale Dysmorphien. In den eigenen Untersuchungen wurde jedoch eine Hypotonie im konsekutiv untersuchten MR-Kollektiv bei mehr als 35% der untersuchten Patienten nachgewiesen. Die Kombination aus mentaler Retardierung und Hypotonie ist demnach nicht selten und für zahlreiche chromosomal bedingte Syndrome beschrieben, so dass diese Kriterien zur Charakterisierung eines Syndroms nicht spezifisch genug sind. Bei Patienten mit Deletionen in 22qter seltener beobachtet wurden folgende Merkmale: Dysplastische Ohren, betontes Kinn, Dolichocephalie, Ptosis und Epikanthus als faziale Dysmorphien sowie große, fleischige Hände, dysplastische Nägel an den Zehen und ein vermindertes Schmerzempfinden. Bonaglia et al. (2001) beschrieben den Träger einer balancierten terminalen Translokation zwischen den langen Armen von Chromosom 12 und Chromosom 22 mit dem Phänotyp der 22q13.3-Deletionen. Sie wiesen eine Disruption des Gens ProSAP2 bei balancierter Translokation nach und schlugen dies als Kandidaten-Gen für die Symptome vor. Die Untersuchung von weiteren Aberrationen in 22q13 bestätigte, dass Haploinsuffizienz des Gens ProSAP2 (syn. SHANK3) in 22q13, das innerhalb der letzten 200kb zum Telomer liegt, für die neurologischen Störungen (mentale Retardierung, Sprachentwicklungsstörung) verantwortlich ist (Anderlid et al., 2002b; Wilson et al., 2003). Wilson et al. (2003) bestimmten mittels Mikrosatelliten-Analysen die Deletionsgrößen bei 56 Patienten mit 22q13-Syndrom. Die Deletionen waren zwischen 130kb und 9Mb groß, assoziierte Trisomien wurden weitestgehend ausgeschlossen. Obwohl der Schweregrad der Entwicklungsverzögerung leicht mit der Deletionsgröße korrelierte, zeigten alle Patienten die Leitsymptome mentale Retardierung und Sprachentwicklungsverzögerung. Eine Korrelation im Sinne eines „contiguous gene syndrome“ wurde ausgeschlossen. Die mit einer Größe von 100kb kleinste Deletion wurde von Anderlid et al. (2002b) beschrieben. Die Trägerin der Deletion war 34

Jahre alt, mental retardiert, sprachentwicklungsverzögert und wies leichte kraniofaziale Dysmorphien (langes Gesicht, hoher Nasenrücken, breite Nase) auf.

Patient 37 konnte mit seiner mentalen Retardierung, der Sprachentwicklungsverzögerung und der Hypotonie sehr gut ins phänotypische Spektrum der 22q13-Deletionen eingeordnet werden. Seine rund 900kb umfassende Deletion beinhaltet das ProSAP2-Gen, welches für diese neurologischen Störungen verantwortlich sein soll (Wilson et al., 2000; Bonaglia et al., 2001; Anderlid et al., 2002b; Wilson et al., 2003).

Patient 37 zeigte eine Überstreckbarkeit der Gelenke, die meines Wissens nach weder für 22q13-Deletionen noch für terminale 7q-Duplikationen beschrieben ist.

#### **Patient 75:**

Diese Patientin war zum Untersuchungszeitpunkt acht Jahre alt. Sie war Trägerin einer de novo entstandenen Deletion 16pter, die mindestens 450kb und höchstens 800kb groß war (Karyotyp: 46,XX,del(16)(p13.3)de novo). Das Mädchen war mittel bis schwer psychomotorisch retardiert mit deutlicher Sprachentwicklungsverzögerung. Ihre Wachstumsparameter lagen stets im Normbereich. Faziale Dysmorphien oder kongenitale Fehlbildungen wurden nicht beobachtet. Nach Blutuntersuchungen wurde eine mikrozytäre Anämie festgestellt. Der Bruder dieser Patientin war der schwer mental retardierte Patient 74, bei dem das Subtelomer-Screening keinen auffälligen Befund ergab (vgl. 5.1).

Wilkie et al. (1990) untersuchten acht Patienten mit  $\alpha$ -Thalassämie und mentaler Retardierung (ATR) und fanden eine kryptische, terminale Deletion in 16p13.3, die bei allen Patienten vermutlich mehr als 1Mb groß war. Das so genannte ATR-Syndrom gilt als „contiguous gene syndrome“ mit milden, eher unspezifischen fazialen Dysmorphien wie Hypertelorismus, abfallenden Lidachsen, breitem Nasenrücken und Epikanthus (Wilkie et al., 1990; Lindor et al., 1997). Holinski-Feder et al. (2000) beschrieben 10 Patienten aus einer Familie mit mentaler Retardierung und milden fazialen Dysmorphien, die alle Träger einer unbalancierten Translokation der(16)t(3;16)(q29;p13.3) waren. Die Deletion 16p13.3 war  $\leq 2$ Mb groß, und bei allen Patienten stand die geistige Beeinträchtigung im Vordergrund. Das Vorliegen einer  $\alpha$ -Thalassämie wurde erst retrospektiv untersucht und nicht weiter erläutert. Ein weiterer Träger einer unbalancierten Translokation, resultierend in einer Deletion 16p13.3 und einer Duplikation 8q24.3, wurde von Eussen et al. (2000) beschrieben. Der Patient hatte, neben einer mentalen Retardierung, tuberöse Sklerose, Zystennieren und eine Hypermelanosis Typ Ito. Das SOX8-Gen, welches 700kb vom Telomer entfernt liegt, wurde als Kandidaten-Gen für die mentale Retardierung vorgeschlagen (Pfeifer et al., 2000). Horsley et al. (2001) beschrieben 21 Patienten mit Deletionen in 16p13.3, die neben einer  $\alpha$ -Thalassämie keine mentale Retardierung oder zusätzliche Auffälligkeiten zeigten. Die größte dieser 16p-terminalen Deletionen war 356kb groß.

Für Patientin 75 war bis zum Beratungszeitpunkt kein Hinweis auf das Vorliegen einer  $\alpha$ -Thalassämie gegeben. Ebenso wie bei den zehn familiären Trägern der unbalancierten Translokation (Holinski-Feder et al., 2000) stand die mentale Retardierung im Vordergrund. Befunde einer angeratenen Hämoglobin-Elektrophorese zur Diagnose einer Thalassämie lagen nicht vor. Die Patientin hatte aber eine mikrozytäre Anämie, die auf den Verlust der Globin-Gene in 16p13.3 zurückzuführen ist. Die 16p-terminale Deletion der Patientin war mindestens 450, maximal aber 800kb groß. Die von Horsley et al. (2001) beschriebenen Patienten, deren Deletionen 356kb oder kleiner waren, waren alle nicht mental retardiert. Damit liegen Gene, die für eine mentale Retardierung verantwortlich sein können, mehr als 356kb vom Telomer entfernt, jedoch distal zu Cos 40, dem letzten regelrechten Klon bei den eigenen Bruchpunktbestimmungen, welcher 450-800kb vom Telomer entfernt liegt. SOX8 als Kandidaten-Gen für mentale Retardierung (Pfeifer et al., 2000) liegt mit einem Abstand von 700kb vom Telomer in diesem Bereich, der bei der eigenen Patientin deletiert sein könnte und bei den Patienten von Holinski-Feder et al. (2000) noch vorhanden ist.

Patientin 75 zeigte keine Auffälligkeiten, die nicht durch die Deletion in 16p13.3 erklärbar wären.

#### **Patient 78:**

Dieser sechsjährige männliche Patient war Träger einer unbalancierten Translokation zwischen den Enden der langen Arme von Chromosom 11 und Chromosom 16 (Karyotyp: 46,XY,der(11)t(11;16)(qq24.2;q24.1)mat). Die Mutter des Patienten war Trägerin der balancierten Form der Translokation. In ihrer Familie gab es fünf weitere balancierte Translokationsträger, eine Probandin hatte die gleiche unbalancierte Translokation wie der Indexpatient (vgl. Abbildung 4.16). Die Deletion in 11qter war 9,4Mb groß, die Duplikation 16qter hatte eine Größe von 4,9-5,5Mb. Austausch derart großer Fragmente sollten bei einer Bandenzahl von 400-450 Banden pro haploidem Genom konventionell zytogenetisch detektierbar sein. Da es sich bei den ausgetauschten Abschnitten jedoch um Bereiche handelte, die nach GTG-Bänderung beide gleich flau angefärbt erscheinen, und ein Größenunterschied von ca. 5Mb an der Nachweisgrenze von 5-10Mb liegt und durch verschiedene Kondensationszustände der Chromosomen einer Metaphase nicht eindeutig auszumachen ist, konnte diese Störung selbst bei retrospektiver Betrachtung der GTG-gebänderten Chromosomen nicht nachgewiesen werden. Also handelte es sich hier, trotz der Größe der Störung, um eine kryptische Aberration (Flint et al., 1995).

Im Alter von 4 ½ Jahren wurde dieser Patient zuletzt einem klinischen Genetiker vorgestellt. Zu diesem Zeitpunkt waren seine Körpermaße im Normbereich. Er war leicht mental retardiert bei normaler motorischer Entwicklung. Verhaltensauffälligkeiten zeigte er keine. Er wies einige kraniofaziale Dysmorphien auf: Hohe Stirn, Hypertelorismus, abfallende

Lidachsen, breiter Nasenrücken, antevertierte Nares, dicke und evertierte Lippen, hoher Gaumen und dysplastische Ohren. An seiner rechten Hand hatte er eine Vierfingerfurche. Darüber hinaus zeigte er Pes equinovarus (Tintenlöscherfüße). Als kongenitale Fehlbildung wurde bei diesem Patienten ein Herzfehler (persistierender Ductus arteriosus/PDA) diagnostiziert. Wiederholte Kernspinuntersuchungen des Kopfes zeigten eine periventrikuläre Leukodystrophie, die sich im Laufe der Zeit nicht veränderte. Nach Angaben der behandelnden Ärztin (Dr. B. Albrecht, Institut für Humangenetik, Essen) steht diese Veränderung der weißen Gehirnmasse im Zusammenhang mit einer schweren Meningitis kurz nach der Geburt. Der Patient wies Leistenhernien und einen Kryptorchismus auf, der durch Orchidopexie operativ behandelt wurde. Blutanalysen ergaben eine leichte Thrombozytopenie ( $93.000/\text{mm}^3$ ). In seiner frühen Kindheit litt er unter zahlreichen Mittelohrinfekten. Als Funktionsstörung bestand eine schwere kombinierte Schallleitungs- und Innenohrschwerhörigkeit.

Terminale Deletionen des langen Arms von Chromosom 11 wurden erstmals 1973 beschrieben und das korrespondierende Syndrom nach seiner Entdeckerin als Jacobsen-Syndrom bezeichnet (Jacobsen et al., 1973). In den meisten publizierten Fällen lag die Deletion distal von 11q23 (Lalaye et al., 2002). Häufig beobachtete klinische Merkmale dieses Syndroms sind: Mentale Retardierung, postnatale Wachstumsretardierung, Trigonocephalie, kraniofaziale Dysmorphien, Herzfehler, Hand- und Fußfehlbildungen sowie Thrombo- oder Panzytopenie (Penny et al., 1995; Leegte et al., 1999). Gehirnehlbildungen, Leistenhernien, Taubheit und Ohranomalien sind ebenfalls beschrieben (Hustinx et al., 1993; Pivnick et al., 1996).

Patienten mit Duplikationen distal zu 16q23 weisen ein recht unspezifisches klinisches Bild mit unterschiedlichen Fehlbildungen auf (Schinzel, 2001). Brisset et al. (2002) veröffentlichten 28 Patienten mit kompletter oder partieller Duplikation 16q. Als phänotypische Auffälligkeiten stimmten nur unspezifische Merkmale wie mentale Retardierung und faziale Dysmorphien mit denen des eigenen Patienten überein. Dementsprechend wird in der folgenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation in erster Linie die Deletion 11qter berücksichtigt.

Die kraniofazialen Dysmorphien beim eigenen Patienten waren relativ unspezifisch und sind sowohl für 11q Deletionen (Penny et al., 1995) als auch für Duplikationen 16q (Brisset et al., 2002) beschrieben. Trigonocephalie als eines der Leitsymptome des Jacobsen-Syndroms wurde bei 95% der beschriebenen Patienten nachgewiesen (Penny et al., 1995) und fehlte bei Patient 78. Basierend auf in erster Linie konventionell zytogenetischen Untersuchungen von Patienten mit 11q-Deletionen wurden zahlreiche Vorschläge zur Lokalisation der kritischen Region für die Ausprägung einer Trigonocephalie publiziert: 11q24.1 oder proximal (Lalaye et al., 2002), proximal von 11q24.3 (Penny et al., 1995) oder 11q23.3 (Ounap et al., 2002). Die exakte Bruchpunktbestimmung beim eigenen Patienten erlaubt die Lokalisation

von Genen, die für die Entstehung von Trigonocephalie verantwortlich sind, distal des Klons RP11-712D22 in 11q24.2. Da die Trigonocephalie bei 95% der Patienten beschrieben wird, ist eine Abwesenheit der Trigonocephalie bei Deletion der verantwortlichen Gene unwahrscheinlich. Bei mehr als 50% der Patienten mit 11q-Deletionen sind Herzfehler beschrieben (Lewanda et al., 1995). Auch hier sind die kritischen Regionen nicht eindeutig definiert. Megarbané et al. (2002) beschrieben einen Patienten ohne Herzfehler mit Bruchpunkt in 11q24.2, Penny et al. (1995) postulierten eine kritische Region für das Auftreten von Herzfehlern distal zu 11q24.3. Patient 78 mit Bruchpunkt in 11q24.2 hatte einen Herzfehler. Mentale Retardierung als Leitsymptom des Jacobsen-Syndroms wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Während Penny et al. (1995) einen Zusammenhang zwischen der Deletionsgröße und dem MR-Schweregrad annahmen, postulierten Ono et al. (1996) das Vorliegen einer kritischen Region, basierend auf ihrem nicht retardierten Patienten mit Deletion 11q24.2-qtter. Demgegenüber beschrieben Neavel und Soukup (1994) einen Patienten mit einer konventionell zytogenetisch bestimmten gleichen Deletion, der mental retardiert war. Patient 78 mit Bruchpunkt in 11q24.2 war leicht mental retardiert. Untersuchungen des Blutes von Patienten mit Jacobsen-Syndrom wiesen gehäuft Thrombo- oder Panzytopenie nach, eine kritische Region wurde in 11q24.3 vermutet (Ounap et al., 2002). Auch eine Infektanfälligkeit wurde vermehrt beschrieben (Neavel and Soukup, 1994; Ono et al., 1996). Das Gen in 11q24.3, welches für NFRKB (*nuclear factor related to kappa B binding protein*) kodiert, wird vorwiegend in B- und T-Lymphozyten exprimiert und ist in der T-Zell-Aktivierung involviert (Adams et al., 1992). Der Transkriptionsfaktor Ets-1 in 11q24.2 wird ausschließlich in hämatopoietischen Geweben exprimiert (Ben-David et al., 1991; Selleri et al., 1994). Sowohl NFRKB als auch Ets-1 spielen bei der Bildung und Differenzierung der Blutzellen eine Rolle. Haploinsuffizienz für diese Gene wurde demnach sowohl mit der Thrombo- und Panzytopenie (Gangarossa et al., 1996) als auch mit der Infektanfälligkeit in Verbindung gebracht (Ounap et al., 2002). Patient 78 hatte eine leichte Thrombozytopenie und litt in seiner frühen Kindheit unter gehäuften Infekten.

Die Genotyp-Phänotyp Korrelation hinsichtlich der einzelnen Parameter ist nicht überzeugend. Die publizierten Deletionen wurden in erster Linie durch konventionell zytogenetische Analysen nachgewiesen. In wenigen Studien wurden Mikrosatelliten-Analysen durchgeführt (Penny et al., 1995). Andere Deletionen wurden zusätzlich zur Bandenanalyse mittels FISH mit wenigen Sonden (Ounap et al., 2002) verifiziert und etwas näher charakterisiert. Bruchpunktbestimmungen mit hohen Auflösungen wurden auch für 11q-Deletionen bislang nicht publiziert. Die eigenen Untersuchungen erbrachten für die Charakterisierung der Deletion, die in diesem Fall maßgeblich für die phänotypische Ausprägung verantwortlich war, eine Auflösung von 85kb. Die Duplikation wurde mit einer Genauigkeit von 612kb bestimmt.



Die ausschließliche Korrelation der phänotypischen Merkmale bei Patienten mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen zu deren Imbalancen ist problematisch. Neben den erwähnten, derzeit nicht untersuchbaren Faktoren wie z. B. dem genetischen Hintergrund oder unvollständiger Penetranz bestimmter Merkmale sowie Imprinting-Effekten wurde bei den eigenen Analysen zunehmend deutlich, dass uneinheitliche Untersuchungsmethoden mit verschiedenen Auflösungen der Bruchpunktbestimmungen einen Vergleich von Patienten mit scheinbar gleicher Aberration erschweren. Ein Beispiel dafür stellt die Trigonozephalie bei Patienten mit 11q-Deletionen dar, die bei 95% der Patienten mit Jacobsen-Syndrom als eines der Leitsymptome vorliegt. Die verantwortlichen Gene konnten jedoch aufgrund der publizierten Bruchpunkte nicht eindeutig lokalisiert werden.

In zahlreichen Veröffentlichungen wurden Bruchpunkte von terminalen Deletionen publiziert, die ausschließlich über konventionell zytogenetische Verfahren nachgewiesen wurden. In solchen Fällen ist, neben dem eingeschränkten Auflösungsvermögen, das Vorhandensein einer assoziierten Trisomie im Rahmen einer unbalancierten Translokation nicht auszuschließen (Ballif et al., 2000). Subtelomer-Screenings detektieren unbalancierte Translokationen der subtelomerischen Chromosomenregionen, dementsprechend bliebe eine assoziierte terminale Trisomie nicht undetektiert. Gezielte Analysen der Subtelomerregionen durch Screening-Verfahren wie Subtelomer-FISH oder Mikrosatelliten-Analysen sind demnach zum Nachweis kryptischer, also konventionell zytogenetisch nicht nachweisbarer terminaler Chromosomenstörungen geeignet. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass sich der Begriff kryptisch nicht ausschließlich auf die Größe der Aberrationen bezieht. Da die Subtelomere aufgrund ihres hohen GC-Gehaltes nach Bänderungsanalysen fast alle flau gefärbt erscheinen, ist besonders im Falle unbalancierter Translokationen ein Austausch sehr großer Fragmente möglich, ohne dass die konventionell zytogenetische Analyse Anhaltspunkte dafür erbringt (Flint et al., 1995). Wegen fehlender exakter Bruchpunktbestimmungen sind Karyotyp-Phänotyp Korrelationen der im Rahmen größerer Studien publizierten Fälle teilweise wenig aussagekräftig. Martin et al. (2002) entwickelten eine Strategie zur Lösung dieses Konfliktes. Sie schlugen die Anwendung so genannter „Molecular Rulers“ für jedes Chromosomenende vor. Gemeint ist damit eine Sammlung von FISH-Klonen, die die letzten 5Mb jedes Chromosomenendes im Abstand von 500kb abdecken. Damit wären Bruchpunktbestimmungen terminaler Chromosomenaberrationen mit guten Auflösungen ( $\leq 500\text{kb}$ ) und einem Hybridisierungsaufwand von maximal zehn FISH-Sonden pro Chromosomenende durchzuführen. In den eigenen Untersuchungen wurde dieser Ansatz berücksichtigt und die Bruchpunkte der Aberrationen, wenn möglich, mit Auflösungen unter 500kb charakterisiert. Für terminale Störungen der Subtelomerregionen, die unter 1Mb groß sind, schlugen die Autoren zusätzlich Hybridisierungen mit so genannten FISH-Contigs, also überlappenden Klonen vor. Die Verwendung dieses „Molecular Ruler“

würde eine aussagekräftigere Vergleichbarkeit von Patienten mit ähnlichen Aberrationen gewährleisten und dementsprechend zu besseren Karyotyp-Phänotyp Korrelationen beitragen.

Die vorliegende Arbeit zeigt zunächst, dass kryptische Subtelomeraberrationen bei Patienten mit idiopathischer mentaler Retardierung eine bedeutende Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung von MR-Kollektiven nach klinischen Kriterien in der bisher publizierten Form, z. B. nach einem „chromosomalen Phänotyp“, nicht sinnvoll ist. Eine Selektion von Patienten nach phänotypischen Merkmalen zum Subtelomer-Screening wäre jedoch aufgrund der hohen Kosten und des Zeitaufwands wünschenswert, und Ansätze zur Auswahl sinnvoller Einschlusskriterien bestehen mit der von de Vries et al. (2001) publizierten „Checkliste“. Nach den eigenen Untersuchungen sind diese Kriterien allein jedoch nicht ausreichend.

Im zweiten Abschnitt der Analysen stand die Einordnung der Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen in beschriebene Spektren klinischer Merkmale im Vordergrund. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zuordnung bestimmter klinischer Merkmale zu beschriebenen chromosomalen Regionen in vielen Fällen zwar möglich war, in anderen Fällen jedoch scheiterte. Neben derzeit nicht nachweisbaren Faktoren, zu denen z. B. der genetische Hintergrund zählt, spielt die zumeist geringe Auflösung der Bruchpunktbestimmungen der publizierten Fälle von Patienten mit terminalen Chromosomenaberrationen eine zentrale Rolle.

Bruchpunktbestimmungen nach dem „Molecular-Ruler“-Prinzip stellen einen guten Ansatz zur weiteren Charakterisierung detektierter subtelomerischer Chromosomenaberrationen dar und tragen zu einer Verbesserung bestehender Versuche von Karyotyp-Phänotyp Korrelationen bei.

Mit der fortschreitenden Weiterentwicklung von Techniken zur Genomuntersuchung, z. B. der Array-basierten CGH, wird es zukünftig möglich sein, für zahlreiche klinische Fragestellungen kryptische unbalancierte Chromosomenaberrationen schnell und mit hoher Auflösung nachzuweisen. Da aber derzeit die Validierungsphasen solcher Techniken nicht abgeschlossen sind, ist die Durchführung von Subtelomer-Screenings mit anschließenden Bruchpunktbestimmungen bei Patienten mit mentaler Retardierung als relevanteste Untersuchungsmethode anzusehen.

## 6. Zusammenfassung

Mentale Retardierung (MR) betrifft etwa 3% der Bevölkerung, in 40-60% ist ihre Ursache unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der subtelomerischen Chromosomenregionen bei insgesamt 82 Patienten mit MR unklarer Genese durch drei FISH-Techniken mit zwei verschiedenen SONDENSETS. Mit dem „ToTelVysion™ Multi-color FISH Probe Panel“ der Firma Vysis wurden 54 Patienten untersucht. Dabei wurden alle 43 relevanten subtelomerischen Chromosomenregionen in 15 Hybridisierungen dargestellt. Das eigene SONDENSET, welches überwiegend dem von Knight et al. (2000) publizierten „Second generation probe panel“ entsprach, wurde in zwei Multicolour-FISH-Techniken verwendet. Mittels Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und Subtelomer-COBRA-FISH, die die Untersuchung aller relevanten Subtelomerregionen in sieben bzw. zwei Hybridisierungen ermöglichen, wurden 19 bzw. neun Patienten analysiert.

### Charakterisierung der konsekutiv untersuchten Patienten:

Das gesamte Bonner MR-Kollektiv bestand aus 205 Patienten mit MR unklarer Genese, bei denen bekannte MR-Ursachen so weit wie möglich ausgeschlossen waren. Neben der geistigen Beeinträchtigung wurden weitere klinische Parameter wie z. B. Fehlbildungen, Dismorphien und Wachstumsanomalien sowie die Familiengeschichte erfasst, aus deren Kombination sich ein breites Spektrum phänotypischer Auffälligkeiten ergab. Die ersten 76 dieser Patienten wurden *konsekutiv*, d. h. weitestgehend in der Reihenfolge, in der sie ins Kollektiv rekrutiert wurden, untersucht. Bei fünf dieser Patienten (6,6%) wurde eine de novo entstandene Subtelomeraberration nachgewiesen. Die durchschnittliche publizierte Aberrationsfrequenz bei 3.131 MR-Patienten lag bei 4,6% mit extremen Schwankungen in den Einzelergebnissen (0%-29,4%), abhängig in erster Linie von der Kollektivzusammensetzung. Da die Untersuchung der Subtelomerregionen eine Analyse von 43 genomischen Loci bedeutet und damit sehr komplex ist, wäre eine Vorselektion der Patienten auf der Grundlage ihrer klinischen Merkmale wünschenswert. Ein häufig publizierter Ansatz zur Kollektivauswahl ist das Vorliegen weiterer Auffälligkeiten im Sinne eines „chromosomalen Phänotyps“, die im untersuchten Kollektiv umfassend dokumentiert vorlagen. In der konsekutiven Untersuchungsgruppe waren von insgesamt 30 Patienten mit *leichter MR* zwei (6,7%) Träger einer subtelomerischen Chromosomenaberration. *Mittel bis schwer retardiert* waren 46 Patienten, darunter wiesen drei (6,5%) eine Subtelomerstörung auf. Die eigenen Untersuchungen ergaben eine annähernd gleiche Störungsrate in diesen beiden Gruppen und widersprechen damit veröffentlichten Daten, die bisher für eine höhere Inzidenz subtelomerischer Chromosomenaberrationen bei Patienten mit mittlerer bis schwerer MR zu sprechen schienen. Ein Grund dafür ist in der unterschiedlichen Kollektivauswahl zu vermuten, wie z. B. dem im Vergleich zum hier beschriebenen Kollektiv erhöhten Anteil

mental mittel bis schwer retardierter Probanden in den publizierten Kollektiven. Die zusätzlichen Auffälligkeiten zeigten in der eigenen Untersuchungsgruppe sehr unterschiedliche Häufigkeiten. Aufgrund der geringen Größe der Stichprobe der Patienten mit Subtelomeraberration konnte eine statistische Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Subtelomerstörungen nicht durchgeführt werden. Unter *Anfällen* litten 16 Patienten des konsekutiven Untersuchungskollektivs, darunter waren zwei Probanden (12,5%) mit Aberrationen der subtelomerischen Chromosomenregionen. Eine *pränatale Dystrophie* lag bei 17 Patienten vor, davon wies einer (5,9%) eine Subtelomeraberration auf. Die *aktuelle Körperlänge* lag bei 20 Probanden unterhalb der 3. Perzentile und bei drei Patienten, von denen einer Träger einer subtelomerischen Chromosomenaberration war (33,3%), oberhalb der 97. Perzentile, ein Minderwuchs wurde bei keinem Probanden mit Subtelomerstörung festgestellt. Eine Mikrozephalie, die bei insgesamt 17 Patienten bestimmt wurde, wurde bei einem der Träger einer Subtelomeraberration nachgewiesen (5,9%), während keiner von sieben Patienten mit Makrozephalie Störungen der Subtelomerregionen zeigte. Der einzige Wachstumsparameter, der in der Gruppe der Patienten mit Subtelomeraberrationen gehäuft, jedoch ohne statistische Signifikanz, beobachtet wurde, war Hochwuchs.

*Weitere Fälle* mit MR traten in den Familien von 13 Patienten auf, von denen eine Probandin (Patientin 75) eine Subtelomerstörung aufwies (7,7%). Da deren schwer mental retardierter Bruder (Patient 74) nach Untersuchung der Subtelomerregionen keine Auffälligkeiten zeigte, handelte es sich hier höchstwahrscheinlich um einen Zufallsbefund. *Pathologische Schwangerschaften* traten bei 21 Müttern der konsekutiv untersuchten Patienten auf, darunter waren drei Mütter von Patienten mit Subtelomeraberrationen (14,3%). Da aber alle detektierten Subtelomerstörungen de novo entstanden waren, und Keimzellmosaik struktureller Chromosomenaberrationen mit unter 1% sehr selten sind, handelte es sich auch hier wahrscheinlich um Zufallsbefunde.

Die untersuchten Patienten wurden weiterhin in Kategorien aus den möglichen Kombinationen von *Fehlbildungen* und *Dysmorphien* eingeordnet, da diese Anomalien bei Chromosomenaberrationen als charakteristisch angesehen werden („chromosomaler Phänotyp“). Sowohl Fehlbildungen als auch Dysmorphien wurden bei 46 Patienten nachgewiesen, darunter waren drei mit subtelomerischen Chromosomenstörungen (6,5%). Weder Fehlbildungen noch Dysmorphien zeigten insgesamt 11 Patienten, zwei davon waren Träger einer Aberration der subtelomerischen Chromosomenregionen (18,2%). Die Rate der detektierten Störungen war, entgegen publizierter Annahmen, in der Gruppe der Patienten ohne Fehlbildungen oder Dysmorphien im Vergleich zu der Probandengruppe mit „chromosomalem Phänotyp“, also mit Fehlbildungen und Dysmorphien, deutlich erhöht statt erniedrigt. In den beiden Kategorien „Dysmorphien ohne Fehlbildungen“ (18 Patienten) und „Fehlbildungen ohne Dysmorphien“ (1 Patient) fand sich keiner der Probanden mit

Subtelomeraberration. Die Fehlbildungen und Dysmorphien im konsekutiven Untersuchungskollektiv wurden näher charakterisiert. Bei 61 Patienten wurden faziale Dysmorphien nachgewiesen, darunter waren drei Träger subtelomerischer Chromosomenstörungen (4,9%). Schädelformanomalien (5 Patienten), Gesichtsspalten (3 Patienten), Hals-/Thorax-/Abdomenanomalien (3 Patienten) und Extremitätenfehlbildungen (2 Patienten) traten bei Trägern subtelomerischer Chromosomenaberrationen nicht auf. Die Anteile der Probanden mit Subtelomeraberrationen unter den Patienten mit Gehirnfehlbildungen (5,9%; 1/17) und Herzfehlern (5,0%; 1/20) waren gegenüber denen im Gesamtkollektiv (6,6%; 5/76) nicht erhöht. Fehlbildungen des Urogenitalsystems wurden bei 17 Patienten diagnostiziert, zwei davon mit subtelomerischen Chromosomenaberrationen (13,3%).

De Vries et al. (2001) entwickelten ein Punktesystem zur Bewertung solcher phänotypischer und familiärer Kriterien mit dem Ziel, eine Vorauswahl von Patienten mit MR zu treffen, für die ein Subtelomer-Screening viel versprechend ist. Die in der so genannten „Checkliste“ bewerteten Merkmale waren: MR in der Familie, prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Dysmorphien und kongenitale Fehlbildungen. Es konnten pro Patient maximal zehn Punkte vergeben werden. Im eigenen Untersuchungskollektiv wurden maximal neun Punkte erzielt bei einem Durchschnitt von 3,5 und einem Median von drei Punkten. Die fünf Patienten mit Subtelomeraberrationen hatten durchschnittlich 2,4 Punkte, die höchste erreichte Punktzahl lag bei fünf. Anhand ihrer eigenen Untersuchungsgruppen setzten de Vries et al. (2001) einen Schwellenwert von drei Punkten zum Subtelomer-Screening fest. Nach Anwendung dieses Systems auf das eigene Untersuchungskollektiv wäre bei rund 30% der Patienten auf ein Screening verzichtet worden, wobei auch drei der fünf Probanden mit Subtelomerstörungen nicht untersucht worden wären. Eine klinische Vorselektion nach dem Prinzip von de Vries et al. (2001) wäre demnach im eigenen Kollektiv nicht sinnvoll gewesen.

#### Charakterisierung der nicht-konsekutiv untersuchten Patienten:

Sechs Patienten wurden außerhalb der konsekutiven Reihenfolge untersucht. Um eine Selektion innerhalb des Gesamtkollektivs auszuschließen, wurden sie gesondert betrachtet. Bei einem dieser Patienten (78) wurde eine unbalancierte Translokation nachgewiesen, die in balancierter Form auch bei der Mutter und weiteren Verwandten gezeigt werden konnte. Der Patient lag mit seinen Körpermaßen im Normbereich. Er wies faziale Dysmorphien sowie einen Herzfehler auf. Darüber hinaus bestand bei ihm eine ausgeprägte Schwerhörigkeit.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass in der untersuchten Patientengruppe, entgegen vorliegender Publikationen, hohe Raten detektierter Subtelomeraberrationen unter den leicht retardierten Probanden mit geringen oder keinen zusätzlichen Auffälligkeiten erzielt wurden. Publizierte Versuche einer klinischen Vorauswahl der Patienten waren nach Überprüfung im eigenen Untersuchungskollektiv nicht erfolgreich anzuwenden gewesen.

### Bruchpunktbestimmungen und Einordnung der Patienten in klinische Spektren:

Bei den sechs Patienten mit Subtelomeraberration erfolgten die Bruchpunktbestimmungen durch FISH mittels PAC- und BAC-Sonden, die sukzessive die Aberration eingrenzten. Diese genauen Charakterisierungen dienen dazu, bestimmten chromosomalen Regionen (und letztlich den darin enthaltenen Genen) bestimmte phänotypische Merkmale zuzuordnen.

**Patient 29** hatte den Karyotyp 46,XY,del(14)(q32.31). Die Deletion konnte auf 100kb genau aufgelöst werden und war 5,7-5,8Mb groß. Der Karyotyp von **Patient 34** lautete: 46,XY,der(2)t(2;5)(q37.3;p15.1). Die deletierte Region in 2q-terminal war zwischen 2,2 und 4Mb groß, die Auflösung der Bruchpunktbestimmung betrug 1,8Mb. Die Duplikation im terminalen Bereich des kurzen Arms von Chromosom 5 hatte eine Größe von 15,8 bis 18Mb bei einer Bestimmungsgenauigkeit von 2,2Mb. Das deletierte Fragment im terminalen q-Arm von Chromosom 2 bei **Patient 35** war 2,2 bis 4Mb groß. Die Auflösung der Bruchpunktbestimmung betrug 1,8Mb (Karyotyp 46,XX,del(2)(q37.3)). Die Bruchpunktbestimmungen der Patienten 34 und 35 konnten nicht abgeschlossen werden, so dass bislang in 2qter für beide die gleichen Ergebnisse determiniert wurden. **Patient 37** hatte den Karyotyp 46,XY,der(22)t(7;22)(q36.3;q13.33). Die Charakterisierung der Deletion in 22qter ergab eine Deletionsgröße von 752-983kb bei einer Auflösung von 231kb. Die duplizierte Region in 7qter war mindestens 351 und höchstens 532kb groß. **Patient 75** war Träger einer terminalen Deletion im kurzen Arm von Chromosom 16, die mit einer Genauigkeit von 80 bis 380kb auf eine Größe von 450 bis 800kb bestimmt wurde (Karyotyp 46,XX,del(16)(p13.3)). **Patient 78** war Träger einer unbalancierten Translokation. Der monosome Abschnitt in 11qter war 9,4Mb groß. Die Bestimmungsgenauigkeit betrug 85kb. Die Bruchpunktbestimmung der Duplikation 16qter erbrachte bei einer Auflösung von 612kb eine Größe von 4,9 bis 5,5Mb (Karyotyp 46,XY,der(11)t(11;16)(q24.2;q24.1)mat).

Bei vier der sechs Patienten (29, 37, 75 und 78) gelang eine Charakterisierung der Aberrationen mit hohen Auflösungen (85 bis 612kb) und deren phänotypische Einordnung in beschriebene Spektren phänotypischer Auffälligkeiten war zu großen Teilen erfolgreich. So konnten beispielsweise die neurologischen Störungen von Patient 37, die auf Haploinsuffizienz des ProSAP2-Gens in diesem Abschnitt zurückzuführen sind, mit dem beschriebenen Phänotyp des 22q13.3-Deletionssyndroms in Einklang gebracht werden. Ebenso korrelierten bei Patientin 74 die MR mit dem Verlust des MR-Kandidaten-Gens SOX8 und die mikrozytäre Anämie mit Haploinsuffizienz der Globin-Gene in 16p13.3.

Für zwei der sechs Träger subtelomerischer Chromosomenaberrationen (34, 35) konnten die Bruchpunktbestimmungen aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials noch nicht abgeschlossen werden und die Auflösungen waren mit 1,8 bzw. 2,2Mb weniger hoch. Bei beiden Patienten wurden bislang identische Hybridisierungsergebnisse zur Charakterisierung der Deletion in 2qter erzielt. Dennoch konnten diese Patienten dem so genannten *Pseudohypoparathyreodismus*, der für terminale Deletionen in 2q beschrieben wurde, zugeordnet

---

werden. Der abgeschwächte Phänotyp der Patientin 35 im Vergleich zu Patient 35 wäre im Sinne eines „contiguous gene syndrome“ durch eine kleinere Deletion erklärbar.

Insgesamt blieben aber bei allen Patienten für einzelne Symptome Diskrepanzen beim Vergleich mit publizierten Fällen vergleichbarer Aberrationen. Diese könnten zum einen durch nicht näher charakterisierbare Faktoren wie genetischer Hintergrund, herabgesetzte Penetranz und variable Expressivität begründet sein. Ferner können genomische Prägung der aberranten Regionen oder Mosaik der Störungen sowie mögliche zusätzliche, nicht detektierte interstitielle Chromosomenstörungen zu phänotypischen Abweichungen führen. Auch die uneinheitliche Bewertung bestimmter Untersuchungskriterien in der Literatur sowie der Vergleich von Patienten verschiedener Altersgruppen erschweren Karyotyp-Phänotyp Korrelationen. Die hier vorgestellten Arbeiten sind vielen publizierten Studien, in denen die Aberrationen nur grob durch konventionelle Zytogenetik charakterisiert wurden, wegen der Genauigkeit der Bruchpunktbestimmungen weit überlegen. So können nach konventionell zytogenetischer Analyse scheinbar reine Deletionen der subtelomerischen Regionen nur schwer von unbalancierten Translokationen unterschieden werden und assoziierte Trisomien bleiben womöglich unentdeckt. Auch Subtelomer-Screenings, wie sie häufig publiziert werden, weisen zwar assoziierte kryptische terminale Trisomien nach, häufig wird aber keine Charakterisierung der detektierten Aberrationen angeschlossen. Exakte Bruchpunktbestimmungen, z. B. wie sie in der vorliegenden Arbeit mittels FISH durchgeführt wurden, ermöglichen exakte Aussagen zu Lokalisation und Ausmaß subtelomerischer Chromosomenaberrationen und tragen somit zu einer Verbesserung bestehender Karyotyp-Phänotyp Korrelationen bei.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams BS, Leung K, Meltzer PS, Lewis KA, Wagner-McPherson C, Evans GA, Nabel GJ (1992) Localization of the gene encoding R kappa B (NFRKB), a tissue-specific DNA binding protein, to chromosome 11q24-q25. *Genomics* 14: 270-4
- Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M (2002a) Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 107: 275-84.
- Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Tapia-Paez I, Dumanski J, Blennow E, Nordenskjold M (2002b) FISH-mapping of a 100-kb terminal 22q13 deletion. *Hum Genet* 110: 439-43
- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28: 605-9
- 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: 1684-8.
- Baialardo EM, Torrado Mdel V, Barreiro CZ, Gallego MS (2003) Partial distal 5p trisomy resulting from paternal translocation (5;15)(p15.1;p13) in a boy with no mental retardation. *Clin Dysmorphol* 12: 257-9
- Baker E, Hinton L, Callen DF, Aitree 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: 285-93.
- 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: 764-70
- Barlow AL, Hulten MA (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4: 562-73
- Bartsch O, Kalbe U, Ngo TK, Lettau R, Schwinger E (1990) Clinical diagnosis of partial duplication 7q. *Am J Med Genet* 37: 254-7
- Batstone PJ, Simpson S, Bonthron DT, Keng WT, Hamilton D, Forsyth L, Sales M, Pratt N, Goudie D (2003) Effective monosomy or trisomy of chromosome band 2q37.3 due to the unbalanced segregation of a 2;11 translocation. *Am J Med Genet* 118A: 241-6
- Battaglia A, Carey JC (2003) Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet* 117C: 3-14



- Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, Bernstein A (1991) Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* 5: 908-18
- Blouin JL, Christie DH, Gos A, Lynn A, Morris MA, Ledbetter DH, Chakravarti A, Antonarakis SE (1995) A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. *Am J Hum Genet* 57: 388-94
- Bodensteiner JB, Schaefer GB (1995) Evaluation of the patient with idiopathic mental retardation. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7: 361-70
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O (2001) Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 69: 261-8
- Bonaglia MC, Giorda R, Poggi G, Raggi ME, Rossi E, Baroncini A, Giglio S, Borgatti R, Zuffardi O (2000) Inverted duplications are recurrent rearrangements always associated with a distal deletion: description of a new case involving 2q. *Eur J Hum Genet* 8: 597-603
- 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: 16-8
- Borgione E, Giudice ML, Galesi O, Castiglia L, Failla P, Romano C, Ragusa A, Fichera M (2001) How microsatellite analysis can be exploited for subtelomeric chromosomal rearrangement analysis in mental retardation. *J Med Genet* 38: E1
- Brisset S, Joly G, Ozilou C, Lapierre JM, Gosset P, LeLorc'h M, Raoul O, Turleau C, Vekemans M, Romana SP (2002) Molecular characterization of partial trisomy 16q24.1-qter: clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet* 113: 339-45
- Burn J, Goodship J (1996) Developmental genetics of the heart. *Curr Opin Genet Dev* 6: 322-5
- Butler MG, Singh DN (1993) Clinical and cytogenetic survey of institutionalized mentally retarded patients with emphasis on the fragile-X syndrome. *J Intellect Disabil Res* 37 ( Pt 2): 131-42
- Chia NL, Bousfield LR, Johnson BH (1987) A case report of a de novo tandem duplication (5p) (p14----pter). *Clin Genet* 31: 65-9
- Chiurazzi P, Hamel BC, Neri G (2001) XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet* 9: 71-81
- 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: 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: 319-27
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr., Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72: 468-77
- Dawson AJ, Putnam S, Schultz J, Riordan D, Prasad C, Greenberg CR, Chodirker BN, Mhanni AA, Chudley AE (2002) Cryptic chromosome rearrangements detected by subtelomere assay in patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 62: 488-94
- 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: 145-50
- De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C (2003) Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40: 385-98
- Engels H, Ehrbrecht A, Zahn S, Bosse K, Vrolijk H, White S, Kalscheuer V, Hoovers JMN, Schwanitz G, Propping P, Tanke HJ, Wiegand J, Raap AK (2003) Comprehensive analysis of human subtelomeres with combined binary ratio labelling fluorescence in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 11: 643-51
- 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: 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* 258: 818-21
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C (2001) High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38: 740-4
- Knight SJ, Flint J (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37: 401-9
- 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: 320-32.

- 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: 1676-81.
- Kuhl H, Rottger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W (2001) Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9: 215-22
- Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita HA, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura Ki K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N (2002) Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 30: 365-6
- Laley A, Delneste D, Pradier O, Hans C, Darboux R, Ogur G (2002) Giant platelets in a case of deletion 11q24-qter confirmed by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 110: 170-5
- Langer PR, Waldrop AA, Ward DA (1981) Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6633-6637
- Laurie DA, Hulten MA (1985) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49 ( Pt 3): 203-14
- Ledbetter DH, Engel E (1995) Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet* 4 Spec No: 1757-64
- Leegte B, Kerstjens-Frederikse WS, Deelstra K, Begeer JH, van Essen AJ (1999) 11q-syndrome: three cases and a review of the literature. *Genet Couns* 10: 305-13
- Lehrke R (1972) Theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 76: 611-9
- Lewanda AF, Morsey S, Reid CS, Jabs EW (1995) Two craniosynostotic patients with 11q deletions, and review of 48 cases. *Am J Med Genet* 59: 193-8
- Lindor NM, Valdes MG, Wick M, Thibodeau SN, Jalal S (1997) De novo 16p deletion: ATR-16 syndrome. *Am J Med Genet* 72: 451-4
- Martin CL, Waggoner DJ, Wong A, Uhrig S, Roseberry JA, Hedrick JF, Pack SD, Russell K, Zackai E, Dobyns WB, Ledbetter DH (2002) "Molecular rulers" for calibrating phenotypic effects of telomere imbalance. *J Med Genet* 39: 734-40
- Megarbane A, Bejjani BA, Shaffer LG, Jambart S, Souraty N, Kashork CD, Le Merrer M (2002) Craniofacial anomalies, deafness, brachydactyly, short stature, and moderate mental retardation due to a cryptic 6p;11q translocation. *Am J Med Genet* 108: 69-74
- Meschede D, Exeler R, Wittwer B, Horst J (1998) Submicroscopic deletion in 14q32.3 through a de novo tandem translocation between 14q and 21p. *Am J Med Genet* 80: 443-7

- Morava E, Bartsch O, Czako M, Frensel A, Kalscheuer V, Karteszi J, Kosztolanyi G (2003) Small inherited terminal duplication of 7q with hydrocephalus, cleft palate, joint contractures, and severe hypotonia. *Clin Dysmorphol* 12: 123-7
- Morison IM, Paton CJ, Cleverley SD (2001) The imprinted gene and parent-of-origin effect database. *Nucleic Acids Res* 29: 275-6
- Neavel CB, Soukup S (1994) Deletion of (11)(q24.2) in a mother and daughter with similar phenotypes. *Am J Med Genet* 53: 321-4
- Novales MA, Fernandez-Novoa C, Hevia A, San Martin V, Galera H (1982) Partial trisomy for the long arm of chromosome 7. Case report and review. *Hum Genet* 62: 378-81
- Ono J, Hasegawa T, Sugama S, Sagehashi N, Hase Y, Oku K, Endo Y, Ohdo S, Ishikiriyama S, Tsukamoto H, Okada S (1996) Partial deletion of the long arm of chromosome 11: ten Japanese children. *Clin Genet* 50: 474-8
- Ounap K, Bartsch O, Uibo O, Laidre P (2002) Girl with combined cellular immunodeficiency, pancytopenia, malformations, deletion 11q23.3 --> qter, and trisomy 8q24.3 --> qter. *Am J Med Genet* 108: 322-6
- Penny LA, Dell'Aquila M, Jones MC, Bergoffen J, Cunniff C, Fryns JP, Grace E, Graham JM, Jr., Kousseff B, Mattina T, et al. (1995) Clinical and molecular characterization of patients with distal 11q deletions. *Am J Hum Genet* 56: 676-83
- Pfeifer D, Poulat F, Holinski-Feder E, Kooy F, Scherer G (2000) The SOX8 gene is located within 700 kb of the tip of chromosome 16p and is deleted in a patient with ATR-16 syndrome. *Genomics* 63: 108-16
- Phelan MC, Rogers RC, Clarkson KB, Bowyer FP, Levine MA, Estabrooks LL, Severson MC, Dobyns WB (1995) Albright hereditary osteodystrophy and del(2) (q37.3) in four unrelated individuals. *Am J Med Genet* 58: 1-7
- Phelan MC, Rogers RC, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, McDermid H, Shaw SR, Claytor J, Willis J, Kelly DP (2001) 22q13 deletion syndrome. *Am J Med Genet* 101: 91-9
- Pinkel D, Segreaves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20: 207-11
- Pivnick EK, Velagaleti GV, Wilroy RS, Smith ME, Rose SR, Tipton RE, Tharapel AT (1996) Jacobsen syndrome: report of a patient with severe eye anomalies, growth hormone deficiency, and hypothyroidism associated with deletion 11 (q23q25) and review of 52 cases. *J Med Genet* 33: 772-8
- Propping P (1989) *Psychiatrische Genetik - Konzepte und Befunde*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Reddy KS, Flannery D, Farrer RJ (1999) Microdeletion of chromosome sub-band 2q37.3 in two patients with abnormal situs viscerum. *Am J Med Genet* 84: 460-8

- Riegel M, Castellan C, Balmer D, Brecevic L, Schinzel A (1999) Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes. *Am J Med Genet* 82: 249-53
- 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: 266-70
- Robinet C, Douvier S, Khau Van Kien P, Favre B, Luquet I, Nadal N, Nivelon-Chevallier A, Mugneret F (2000) Prenatal diagnosis of a partial trisomy 7q in two fetuses with bilateral ventriculomegaly. *Prenat Diagn* 20: 936-8
- Romain DR, Cairney H, Stewart D, Columbano-Green LM, Garry M, Parslow MI, Parfitt R, Smythe RH, Chapman CJ (1990) Three cases of partial trisomy 7q owing to rare structural rearrangements of chromosome 7. *J Med Genet* 27: 109-13
- Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, Hamel B, Fryns JP, Chelly J, Partington M, Gecz J, Moraine C (2003) Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* 19: 316-20
- 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, Tiffit 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: 311-8
- Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carozzo 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: 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: 4913-7
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134: 1109-25
- Schinzel A (2001) *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*, 2nd edn. De Gruyter, Berlin

- Schmidt R, Eviatar L, Nitowsky HM, Wong M, Miranda S (1981) Ring chromosome 14: a distinct clinical entity. *J Med Genet* 18: 304-7
- Selleri L, Giovannini M, Romo A, Zucman J, Delattre O, Thomas G, Evans GA (1994) Cloning of the entire FLI1 gene, disrupted by the Ewing's sarcoma translocation breakpoint on 11q24, in a yeast artificial chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 67: 129-36
- 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: 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 (1999a) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* 36: 405-11.
- 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 (1999b) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* 36: 405-11
- Spruijt L, Van Der Blij-Philipsen M, Engelen JJ, Schrandt-Stumpel CT (2000) An adult patient with a distal interstitial 14q deletion: clinical report and literature review. *Genet Couns* 11: 335-40
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J (1999) New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. *Eur J Hum Genet* 7: 2-11
- Turner G, Turner B, Collins E (1970) Renpenning's syndrome--X-linked mental retardation. *Lancet* 2: 365-6
- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR (1999) Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 65: 448-62
- van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM (2002a) Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 39: 546-53
- van Karnebeek CD, Quik S, Sluijter S, Hulsbeek MM, Hoovers JM, Hennekam RC (2002b) Further delineation of the chromosome 14q terminal deletion syndrome. *Am J Med Genet* 110: 65-72

- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx 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: 1269-76.
- Verma RS, Conte RA, Pitter JH (1992) Tandem duplication of the terminal band of the long arm of chromosome 7 (dir dup (7)(q36----qter)). *J Med Genet* 29: 344-5
- Viot G, Gosset P, Fert S (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* 63 (Suppl): A154
- Wegener R-D (1999) *Diagnostic Cytogenetics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Wilkie AO, Buckle VJ, Harris PC, Lamb J, Barton NJ, Reeders ST, Lindenbaum RH, Nicholls RD, Barrow M, Bethlenfalvay NC, et al. (1990) Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. *Am J Hum Genet* 46: 1112-26
- Wilson H, Wong A, Tsi WY, McDermid HE (2000) PROSAP2: a possible candidate gene for neurological abnormalities in the 22q13 deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 67: 376
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE (2003) Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet* 40: 575-84
- Wilson LC, Leverton K, Oude Luttikhuis ME, Oley CA, Flint J, Wolstenholme J, Duckett DP, Barrow MA, Leonard JV, Read AP, et al. (1995) Brachydactyly and mental retardation: an Albright hereditary osteodystrophy-like syndrome localized to 2q37. *Am J Hum Genet* 56: 400-7
- Xu J, Chen Z (2003) Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet* 117C: 15-24
- Zenger-Hain JL, Van Dyke DL, Wiktor A, Walker H, Feldman GL (1993) Inverted duplication of chromosome 5p14p15.3 confirmed with in situ hybridization. *Am J Med Genet* 47: 1198-201

	Sonden	Fluoro- chrom	in der Sonde enthaltene Loci	Größe (kb)
<b>#1</b>	1p	SG	CEB108/T7	90
	1q	SO	VIJ yRM2123, 1QTEL10 (D1S3738), 1QTEL19 (D1S3739)	100
	XYp	SG&SO	DXYS129	175
	CEP X	SA	DXZ1 (Xp11.1-q11.1)	k. A.
<b>#2</b>	2p	SG	VIJ yRM1051 (GenBank G31389)	175
	2q	SO	VIJ yRM2112 (D2S447), 2QTEL47	60
	XYq	SG&SO	EST Cdy 16c07 (GenBank Z43206)	170
	CEP X	SA	DXZ1 (Xp11.1-q11.1)	k. A.
<b>#3</b>	3p	SG	3PTEL25 (D3S4559)	80
	3q	SO	3QTEL05 (D3S4560)	95
	22q	SG&SO	MS607 (GenBank X58044), ACR, 22QTEL31 (D22S1726)	80
	LSI BCR	SA	BCR (22q11.2)	k. A.
<b>#4</b>	4p	SG	GS10K2/T7	145
	4q	SO	AFM A224XH1 (D4S2930)	130
	21q	SG&SO	VIJ yRM2029, S100B3, 21QTEL08, D21S1575, (21QTEL07), D21S1146, HRMTIL	170
	LSI AML1	SA	AML1 (21q22)	k. A.
<b>#5</b>	5p	SG	C84C11/T3	191
	5q	SO	GS35o8/T7, 5QTEL70	105
<b>#6</b>	6p	SG	6PTEL48	80
	6q	SO	VIJ yRM2158, 6QTEL54	100
	13q	SG&SO	VIJ yRM2002 (D13S327)	75
	LSI 13	SA	RB1 (13q14)	220
<b>#7</b>	7p	SG	VIJ yRM1185 (GenBank G31341)	60
	7q	SO	VYJ yRM2000 (STS 200H), 7QTEL20	95
	14q	SG&SO	sts-X58399; SHGC-36156; sts-AA034492, telomeric IGHV segments	160
<b>#8</b>	8p	SG	AFM 197XG5 (D8S508)	135
	8q	SO	VIJ yRM2053	100
	17p	SG&SO	282M15/SP6	70
	CEP 17	SA	D17Z1 (17p11.1-q11.1)	k. A.
<b>#9</b>	9p	SG	305J7-T7	115
	9q	SO	VIJ yRM2241 (D9S325)	95
	17q	SG&SO	AFM217yD10 (D17S928, GenBank Z23646)	160
	CEP 17	SA	D17Z1 (17p11.1-q11.1)	k. A.
<b>#10</b>	10p	SG	10PTEL006 (GenBank Z96139)	80
	10q	SO	10QTEL24 (D10S2490)	75
	15q	SG&SO	WI-5214 (D15S963)	100
	LSI PML	SA	PML (15q22)	180
<b>#11</b>	11p	SG	D11S2071 (GenBank U12896), 11PTEL03, VIJ yRM2209	110
	11q	SO	VIJ yRM2072	160
	18p	SG&SO	VIJ yRM2102 (D18S552)	160
	CEP 18	SA	D18Z1 (18p11.1-q11.1)	k. A.
<b>#12</b>	12p	SG	8M16/SP6	100
	12q	SO	VIJ yRM2196 (GenBank 011838)	165
	18q	SG&SO	VIJ yRM2050, 18QTEL11 (D18S1390), STSG193, AFM254VD5, STS-F04195, TIGR-A008P37, stSG52963	170
	CEP 18	SA	D18Z1 (18p11.1-q11.1)	k. A.

**Tabelle A1:** „ToTelVysion™ Multi-color FISH“-Sondenliste, Lokalisation, Größe, Markierung und Kombination der Sonden in den Hybridisierungsmixen. Die Abkürzungen SG, SO und SA stehen für die Fluorochrome SpectrumGreen, SpectrumOrange und SpectrumAqua. In diesem Set enthaltene Sonden werden in aktualisierter Form unter <http://www.vysis.com> angegeben.



Sonden	Fluorochrom	in der Sonde enthaltene Loci	Größe (kb)
#13 16p	SG	SHGC-15336, 16PTEL03 (D16S3399), 16PTEL05 (D16S3400), alpha globin gene cluster (HBZ, HBA2, HBA1, HBQ)	110
16q	SO	16QTEL013 (GenBank Z96319)	110
#14 19p	SG	129F16/SP6	80
19q	SO	D19S238E	160
#15 20p	SG	20PTEL18 (D20S1157)	160
20q	SO	20QTEL14	140

**Tabelle A1, Fortsetzung:** „ToTelVysion™ Multi-color FISH“-Sondenliste, Lokalisation, Größe, Markierung und Kombination der Sonden in den Hybridisierungsmixen. Die Abkürzungen SG, SO und SA stehen für die Fluorochrome SpectrumGreen, SpectrumOrange und SpectrumAqua. In diesem Set enthaltene Sonden werden in aktualisierter Form unter <http://www.vysis.com> angegeben. k. A. = keine Angabe

Subtelomer-region	Klon-bezeichnung	Distanz vom Telomer (in kb)	Klon Typ
1p	GS-62L8	200	PAC
1q	GS-160H23	80	PAC
2p	GS-892G20	330	PAC
2q	RG-172I13	240	BAC
3p	GS-1186B18	450	PAC
3q	196F4	450	PAC
4p	GS-36P21	73	PAC
4q	GS-963K6	275-500	PAC
5p	GS-24H17	unbekannt	PAC
5q	GS-240G13	245	PAC
6p	GS-196I5	300	PAC
6q	GS-57H24	280	PAC
7p	GS-164D18	255	PAC
7q	GS-3K23	7	PAC
8p	GS-77L23	250-450	BAC
8q	GS-489D14	170	PAC
9p	GS-43N6	600	PAC
9q	GS-135I17	65	BAC
10p	GS-23B11	320	BAC
10q	GS-137E24	270	PAC

**Tabelle A2:** Sonden des eigenen Subtelomer-Sondensets, Angaben nach Knight et al. (2000).  
\* nach UCSC (<http://genome.ucsc.edu>)

Subtelomer-region	Klon-bezeichnung	Distanz vom Telomer (in kb)	Klon Typ
11p	GS-44H16	125	PAC
11q	GS-770G7	65	PAC
12p	GS-496A11	unbekannt	PAC
12q	GS-221K18	190	PAC
13q	GS-163C9	170	PAC
14q	GS-200D12	200	BAC
15q	GS-154P1	300	PAC
16p	GS-121I4	160	PAC
16q	GS-240G10	200	PAC
17p	GS-202L17	60	PAC
17q	GS-50C4	100-300	BAC
18p*	52M11	220	P1
18q	GS-964M9	290	PAC
19p	GS-546C11	250-500	PAC
19q*	RP11-420P11	160	BAC
20p	GS-1061L1	180	PAC
20q	GS-81F12	50	PAC
21q	GS-63H24	175	PAC
22q	GS-99K24	120	PAC
XpYp	GS-839D20	490	BAC
XqYq	GS-225F6	100	BAC

**Tabelle A2, Fortsetzung:** Sonden des eigenen Subtelomer-Sondensets, Angaben nach Knight et al. (2000). \* nach UCSC (<http://genome.ucsc.edu>)

Chromosom	Chromosomenregion	Klonbez.	Sondenlänge (bp)
2	2q36.3	RP11-457P23	201.175
2	2q37.1	RP11-263G22	108.710
2	2q37.2	RP11-84G18	190.384
2	2q37.3	RP11-4H21	168.862
2	2q37.3	RP11-15L18	168.331
2	2q37.3	RP11-622A18	153.468
2	2q37.3	RP11-556H17	175.992
5	5p15.32	RP11-531A21	192.707
5	5p15.2	RP11-308B16	172.929
5	5p15.1	RP11-19O2	164.818
5	5p15.1/14.3	RP11-35A11	170.705
7	q36.1	RP5-1136G13	183.385
7	q36.2	RP11-422E4	151.197
7	q36.3	RP11-518I12	205.316
7	q36.3	RP11-11B21	211.679
7	q36.3	RP11-354O2	201.214
7	q36.3	RP4-708P22	133.029
11	11q23.3	RP11-334E6	191.577
11	11q24.1	RP11-811I7	189.992
11	11q24.2	RP11-417F7	172.081
11	11q24.2	RP11-712D22	170.370
11	11q24.2	RP11-673E11	180.820
11	11q24.2	RP11-50B3	157.701
11	11q24.2	RP11-712L6	159.564
11	11q24.2	RP11-713C6	120.479
11	11q25	RP11-678L3	186.914

**Tabelle A3:** Sonden zur Bruchpunktbestimmung. Angegeben sind Lokalisation, exakte Bezeichnung und Größe der Sonden. Angaben nach UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), Version Juli 2003

Chromosom	Chromosomenregion	Klonbez.	Sondenlänge (bp)
14	14q32.2	RP11-433J8	197.688
14	14q32.3/32.31	RP11-123M6	165.048
14	14q32.31	RP11-909M7	200.539
14	14q32.31	RP11-8L8	162.146
14	14q32.31	RP11-1029J19	203.729
14	14q32.32	RP11-661D19	168.623
14	14q32.33	RP11-417P24	169.801
16	16q23.1	RP11-556H2	182.301
16	16q23.3	RP11-483P21	181.390
16	16q23.3/24.1	RP11-505K9	212.595
16	16q24.1	RP11-517C16	213.463
16	16q24.1	RP11-254F19	174.713
16	16q24.1	RP11-477D3	172.469
16	16q24.1	RP11-680G10	207.306
16	16q24.1	RP11-410M9	unbekannt
22	22q13.2/13.31	RP3-388M5	177.567
22	22q13.31	RP3-439F8	120.205
22	22q13.31	RP11-191L9	146.437
22	22q13.32	RP11-262A13	128.154
22	22q13.32	RP5-925J7	98.446
22	22q13.33	RP1-34P24	105.356
22	22q13.33	RP1-170A21	176.946
22	22q13.33	RP5-983L19	77.021
22	22q13.33	RP3-522J7	84.363
22	22q13.33	RP3-355C18	101.269

**Tabelle A3:** Sonden zur Bruchpunktbestimmung. Angegeben sind Lokalisation, exakte Bezeichnung und Größe der Sonden. Angaben nach UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), Version Juli 2003

Patient	Schädel	Hals/Thorax/ Abdomen	Extremi- täten	Organfehl- bildungen	Funktions- störungen
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	FD	HZ	0	G	S
5	FD	0	0	0	0
6	FD	0	0	H	0
7	FD	0	0	0	0
8	FD	0	0	G	0
9	FD	0	0	0	S
10	FD, Mik	0	0	G, H	0
11	FD	0	0	G, H	S
12	FD	0	0	0	0
13	0	0	0	0	Hö
14	0	0	0	0	0
15	FD, LKGS	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
17	FD	0	0	0	0
18	FD	0	0	0	0
19	FD, Mak	0	0	0	0
20	FD, Mik, GS	0	0	H	0
21	0	0	0	0	0
22	FD	0	0	UG	0
23	Mak	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0
25	FD, Mik	0	0	0	0
26	FD, Mik	0	0	UG	S, Hö
27	FD, Mik	0	0	H, UG	S
28	FD	0	0	H, UG	0
29	FD	0	0	G, UG	0
30	FD, Mik, BZ	0	0	0	0
31	FD, Mak	0	0	0	S
32	FD, AZ	0	0	H, UG	0
33	FD, Mik, DZ	0	0	G	0
34	FD	0	0	H, UG	0
35	FD, Mik	0	0	0	0
36	FD	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0
38	FD	0	0	G, H	0
39	FD, Mik	0	0	G, UG	0
40	0	0	0	0	0
41	FD	0	0	G	S
42	FD	0	0	0	0
43	FD	0	0	0	0

**Tabelle A4:** Fehlbildungen, faziale Dysmorphien und Funktionsstörungen der einzelnen Patienten im konsekutiven Untersuchungskollektiv

FD = faziale Dysmorphien, Mik = Mikrozephalie, Mak = Makrozephalie, LKGS = Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, GS = Gaumenspalte, BZ = Brachyzephalie, DZ = Dolichozephalie, AZ = Akrozephalie, HZ = Halszyste, HD = Hüftdysplasie, TB = Trichterbrust, PD = Polydaktylie, Fu = Fußfehlbildung, G = Gehirn, H = Herz, UG = Urogenitalsystem, Ös = Ösophagus, S = Sehen, Hö = Hören

Patient	Schädel	Hals/Thorax/ Abdomen	Extremi- täten	Organfehl- bildungen	Funktions- störungen
44	FD, Mik	HD	0	H	0
45	FD	0	0	H	S
46	FD, Mak	0	0	G, UG	
47	FD	0	0	G	S, Hö
48	FD	0	0	0	0
49	FD, BZ	TB	0	0	0
50	FD	0	0	H, UG	0
51	FD, BZ	0	0	0	0
52	FD	0	0	G	S
53	FD, Mik	0	0	0	0
54	FD	0	0	G, H, UG	0
55	FD, GS	0	0	0	0
56	FD, Mak	0	0	G	S, Hö
57	FD, Mik, LKGS	0	0	G, H, UG	S
58	FD, Mik	0	0	G	S
59	FD	0	0	0	S
60	FD, Mik	0	0	0	Hö
61	FD, Mik, BZ	0	0	0	0
62	FD, Mik	0	0	0	S
63	Mik, BZ	0	0	H, UG	0
64	FD, Mik	0	0	G, UG	S, Hö
65	FD	0	0	0	0
66	FD, Mak	0	PD	0	S
67	FD	0	0	0	0
68	FD	0	0	H	Hö
69	FD, Mik	0	0	Ös	0
70	FD	0	0	H	0
71	0	0	0	0	0
72	FD, Mik, GS	0	0	H, UG	S, Hö
73	FD	0	0	UG	0
74	0	0	Fu	H	0
75	0	0	0	0	0
76	FD	0	0	H	S

**Tabelle A4, Fortsetzung:** Fehlbildungen, faciale Dysmorphien und Funktionsstörungen der einzelnen Patienten im konsekutiven Untersuchungskollektiv

FD = faciale Dysmorphien, Mik = Mikrozephalie, Mak = Makrozephalie, LKGS = Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, GS = Gaumenspalte, BZ = Brachycephalie, DZ = Dolichocephalie, AZ = Akrozephalie, HZ = Halszyste, HD = Hüftdysplasie, TB = Trichterbrust, PD = Polydaktylie, Fu = Fußfehlbildung, G = Gehirn, H = Herz, UG = Urogenitalsystem, Ös = Ösophagus, S = Sehen, Hö = Hören

Patient	Familiarität# (1P°/2P°)	Dystrophie (2 P°)	Postnatale Wachstumsretardierung		Faziale Dym. (je 1 P°)	Fehlbildungen* (je 1 P°)	Summe
			Mik/Mak (1P°)	Min/Ho (1P°)			
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	2	1	3
5	0	0	0	0	2	0	2
6	0	0	0	0	2	1	3
7	0	0	0	0	2	1	3
8	1	2	0	0	2	1	6
9	0	0	0	0	2	1	3
10	0	0	1	0	2	2	5
11	0	2	0	0	2	2	6
12	0	0	0	0	2	1	3
13	1	0	0	0	0	0	1
14	1	0	0	1	0	0	2
15	0	0	0	1	2	1	4
16	0	0	0	0	0	0	0
17	0	2	0	0	2	0	4
18	0	0	0	0	2	0	2
19	0	0	1	0	2	0	3
20	0	0	1	1	2	1	5
21	0	0	0	1	0	0	1
22	0	0	0	0	2	1	3
23	1	0	1	0	0	0	2
24	1	0	1	0	0	0	2
25	1	0	1	0	2	1	5
26	0	2	1	1	2	0	6
27	2	2	1	0	2	2	9
28	0	0	0	0	2	1	3
29	0	0	0	1	2	2	5
30	0	2	1	1	2	0	6
31	0	0	1	1	2	0	4
32	0	0	0	1	2	1	4
33	0	0	1	1	2	0	4
34	0	0	0	0	2	2	4
35	0	0	0	0	2	0	2
36	0	0	0	0	2	0	2
37	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	1	2	1	4
39	0	2	1	1	2	1	7
40	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	2	1	3
42	0	0	0	0	2	0	2

**Tabelle A5:** Punktevergabe nach dem System von de Vries et al. (2001)

#Familiarität: mendelnd = 1 Punkt, nicht-mendelnd = 2 Punkte, \*Fehlbildungen: beinhalten Handanomalien, Herzfehler und Hypospadie; P° = Punkte, maximal 2 Punkte pro Kategorie; Mik = Mikrozephalie, Mak = Makrozephalie, Min = Minderwuchs, Ho = Hochwuchs

Patient	Familiarität# (1P°/2P°)	Dystrophie (2 P°)	Postnatale Wachstumsretardierung		Faziale Dym. (je 1 P°)	Fehlbildungen* (je 1 P°)	Summe
			Mik/Mak (1P°)	Min/Ho (1P°)			
43	0	0	0	0	2	0	2
44	0	0	1	0	2	2	5
45	0	0	0	0	2	1	3
46	0	0	1	1	2	1	5
47	0	0	0	0	2	0	2
48	0	0	0	0	2	1	3
49	0	2	0	0	2	0	4
50	0	0	0	1	2	1	4
51	1	0	0	0	2	0	3
52	0	0	0	0	2	1	3
53	1	2	0	0	2	0	5
54	0	0	0	0	2	1	3
55	0	0	0	0	2	0	2
56	0	2	1	0	2	1	6
57	2	2	1	0	2	1	8
58	0	0	0	0	2	0	2
59	0	2	0	0	2	0	4
60	0	0	1	1	2	0	4
61	0	0	1	1	2	0	4
62	0	2	1	1	2	1	7
63	0	2	1	0	0	1	4
64	0	0	1	1	2	0	4
65	0	0	0	1	2	0	3
66	0	0	1	0	2	1	4
67	0	0	0	0	2	0	2
68	0	0	0	0	2	1	3
69	0	0	0	1	2	0	3
70	1	0	0	1	2	1	5
71	0	0	0	1	0	0	1
72	0	2	1	1	2	2	8
73	0	2	0	0	2	0	4
74	1	2	1	0	0	2	6
75	1	0	0	0	0	0	1
76	0	0	0	0	2	1	3

**Tabelle A5, Fortsetzung:** Punktevergabe nach dem System von de Vries et al. (2001)

#Familiarität: mendelnd = 1 Punkt, nicht-mendelnd = 2 Punkte, \*Fehlbildungen: beinhalten Handanomalien, Herzfehler und Hypospadie; P° = Punkte, maximal 2 Punkte pro Kategorie; Mik = Mikrozephalie, Mak = Makrozephalie, Min = Minderwuchs, Ho = Hochwuchs



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. G. Schwanitz für die Überlassung des Themas sowie die freundliche und intensive Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. H. Scheidtmann danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Hartmut Engels für die Betreuung meiner Arbeit, die kompetente Einführung in die Subtelomer-COBRA-FISH, ein stets offenes Ohr und produktive Diskussionen. Ferner danke ich Frau Dr. Kristin Bosse, die das MR-Kollektiv aufgestellt und verwaltet hat und die mir bei klinischen Fragen jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Bei meiner Kollegin und guten Freundin Dipl.-Biol. Susanne Zahn bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft, Kollegialität, die humorvolle und gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Besonders ist hier die Abteilung „Zytogenetik“ zu erwähnen, in der ich mich stets wohl und aufgehoben fühlte.

Frau cand. Dr. med. Unda Todt, Herrn Dipl.-Biol. Alexander Hoischen und Herrn Felix Brockschmidt danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei der Richard-Winter-Stiftung bedanke ich mich herzlich für die finanzielle Unterstützung.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden und Bekannten für ihr Verständnis und ihre Hilfe in den schwierigeren Situationen der letzten drei Jahre.

Ich möchte mich abschließend ganz besonders bei meiner Mutter bedanken. Sie hat mich stets unterstützt und immer an mich geglaubt.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Bonn, im Februar 2004