

**ETABLIERUNG UND VERGLEICH VON  
MULTI-COLOUR-FISH-TECHNIKEN UND MULTIPLEX AMPLIFIABLE PROBE  
HYBRIDISATION (MAPH) ZUR DETEKTION KRYPTISCHER ABERRATIONEN  
DER SUBTELOMERISCHEN CHROMOSOMENREGIONEN**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Susanne Zahn**

aus

Essen

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

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

Für meine Schwester

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Einführung: Subtelomerregionen und Sondenlokalisationen.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Techniken zur Untersuchung der Subtelomere.....	6
<b>2.2</b>	<b>Einführung in die angewandten Methoden.....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung/FISH.....	7
2.2.1.1	ToTelVysion-System, „niedrige Multiplizität“.....	9
2.2.1.2	Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, „mittlere Multiplizität“.....	9
2.2.1.3	Combined Binary Ratio Labelling-/COBRA-FISH, „hohe Multiplizität“.....	10
2.2.2	Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation/MAPH.....	12
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>15</b>
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	15
3.1.2	Geräte und Zubehör.....	17
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungskollektiv.....</b>	<b>18</b>
3.2.1	FISH-Kollektiv .....	18
3.2.1.1	Analysierte Fälle zur Erprobung der S-COBRA-FISH.....	19
3.2.2	MAPH-Kollektiv .....	20
3.2.3	Analysiertes Zellsystem.....	21
<b>3.3</b>	<b>FISH.....</b>	<b>21</b>
3.3.1	Subtelomer-FISH mit dem ToTelVysion Multi-Colour Probe Panel (Vysis) .....	23
3.3.1.1	Kommerzielles Sonden-Set (ToTelVysion).....	23
3.3.1.2	Durchführung .....	23
3.3.1.2.1	Enzymatische Vorbehandlung der Präparate .....	23
3.3.1.2.2	Denaturierung und Hybridisierung.....	24
3.3.1.2.3	Stringente Waschschrte .....	24
3.3.1.2.4	Gegenfärbung.....	25
3.3.1.3	Auswertung und Dokumentation .....	25
3.3.2	„Eigenes Sonden-set“: Sondauswahl und Charakterisierung.....	26
3.3.3	Subtelomer-Sechs-Farben-FISH.....	27
3.3.3.1	Prinzip der Zusammenstellung der Sonden.....	27
3.3.3.2	Durchführung .....	29
3.3.3.2.1	DNA-Isolierung aus BAC- und PAC-Klonen .....	29
3.3.3.2.2	Fragmentierung der DNA mittels DNaseI .....	31

3.3.3.2.3	Markierung der Sonden-DNA durch das Universal-Linkage-System/ULS.....	32
3.3.3.2.4	Fällung der markierten Sonden-DNA.....	33
3.3.3.2.5	Denaturierung, Preannealing und Hybridisierung .....	34
3.3.3.2.6	Stringente Waschschrte und Gegenfärbung .....	35
3.3.3.3	Auswertung und Dokumentation .....	35
3.3.4	Subtelomer-/S-COBRA-FISH .....	35
3.3.4.1	Prinzipien der Zusammenstellung der Farbdreiecke.....	35
3.3.4.2	Durchführung .....	39
3.3.4.2.1	Markierung der Sonden.....	39
3.3.4.2.2	Fällung der markierten Sonden-DNA.....	41
3.3.4.2.3	Denaturierung, Preannealing und Hybridisierung .....	41
3.3.4.2.4	Stringente Waschschrte und Detektion.....	41
3.3.4.3	Auswertung und Dokumentation .....	42
<b>3.4</b>	<b>MAPH .....</b>	<b>42</b>
3.4.1	Sondensets .....	42
3.4.1.1	Eigenschaften und Auswahl der Sonden.....	42
3.4.1.2	Zusammensetzung der Sondensets .....	44
3.4.2	Durchführung .....	44
3.4.2.1	Herstellung der Sonden.....	44
3.4.2.2	Isolierung genomischer DNA aus Blut.....	44
3.4.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	45
3.4.2.4	Vorbereitung der Filter und Auftragen der genomischen DNA .....	45
3.4.2.5	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	45
3.4.2.6	Posthybridisierungs-Waschschrte.....	46
3.4.2.7	Denaturierung der Heteroduplices.....	47
3.4.2.8	Polymerase-Kettenreaktion/PCR.....	47
3.4.2.9	Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese .....	48
3.4.2.10	Silberfärbung.....	49
3.4.2.11	Automatische Fluoreszenz-Detektion mit dem ABI Prism 377-System .....	49
3.4.3	Auswertung und statistische Analyse der MAPH-Daten .....	51
3.4.3.1	Auswertung der MAPH-Daten X-gekoppelter-Subtelomerregionen .....	52
3.4.4	Interpretation und Verifizierung der MAPH-Daten.....	53
3.4.4.1	Verifizierung der MAPH-Ergebnisse .....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>FISH.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Beurteilungskriterien .....	55
4.1.2	Subtelomeranalysen durch das ToTelVysion-System .....	56

4.1.2.1	Ergebnisse der Patientenanalysen.....	61
4.1.3	Subtelomeranalysen durch Sechs-Farben-FISH .....	61
4.1.3.1	Ergebnisse der Patientenanalysen.....	65
4.1.4	S-COBRA-FISH .....	65
4.1.4.1	Ergebnisse der Etablierung der S-COBRA-FISH.....	65
4.1.4.2	Subtelomeranalysen durch S-COBRA-FISH .....	66
4.1.4.2.1	Validierung der S-COBRA-FISH.....	69
4.1.5	Methodischer Vergleich der FISH-Techniken .....	73
<b>4.2</b>	<b>MAPH .....</b>	<b>74</b>
4.2.1	Eigenschaften der MAPH-Sonden.....	75
4.2.2	Beobachtete Resultate der MAPH, ihre Kombination und Wertung .....	78
4.2.2.1	Verwendete Schwellenwerte .....	79
4.2.2.2	Ergebnisse für eine Subtelomerregion in einem MAPH-Experiment.....	79
4.2.2.3	Ergebniskombinationen aus zwei MAPH-Experimenten und ihre Interpretation..	80
4.2.3	MAPH-Ergebnisse der Fälle ohne bekannte Aberrationen (Negativkontrollen)...	83
4.2.3.1	Bewertung der MAPH-Ergebnisse bei engen Schwellenwerten (2SD) .....	83
4.2.3.2	Bewertung der MAPH-Ergebnisse bei weiten Schwellenwerten (3SD) .....	85
4.2.3.3	Vergleich der nach verschiedenen Schwellenwerten ermittelten Ergebnisse.....	87
4.2.3.4	Ergebnisse der Verifizierungsexperimente .....	87
4.2.4	MAPH-Ergebnisse der Fälle mit bekannten Aberrationen (Positivkontrollen).....	89
4.2.4.1	Falldarstellungen.....	89
4.2.4.2	Falsch-Negativ-Rate der MAPH bei 2SD und 3SD .....	96
4.2.4.3	Spezifität der MAPH-Sonden.....	97
4.2.5	MAPH-Ergebnisse der prospektiv analysierten Fälle.....	98
4.2.6	Effizienz der MAPH .....	99
<b>4.3</b>	<b>Lokalisationen der Sonden: Ergebnisse der <i>in silico</i>-Analysen .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>102</b>
<b>5.1</b>	<b>Fluoreszenz in situ-Hybridisierung.....</b>	<b>105</b>
5.1.1	Vergleich der angewandten FISH-Techniken .....	105
5.1.2	Vergleich der angewandten FISH-Methoden mit Angaben aus der Literatur .....	115
<b>5.2</b>	<b>Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>140</b>

**Tabellenverzeichnis**

TABELLE 1: KOMBINATORISCHE SONDENMARKIERUNG BEI DER SECHS-FARBEN-FISH .....	10
TABELLE 2: KOLLEKTIVFÄLLE MIT SUBTELOMERABERRATIONEN.....	19
TABELLE 3: POSITIVKONTROLLEN ZUR ERPROBUNG DER S-COBRA-FISH .....	19
TABELLE 4: GLIEDERUNG DES MAPH-KOLLEKTIVS.....	20
TABELLE 5: POSITIVKONTROLLEN ZUR ERPROBUNG DER SUBTELOMER-MAPH .....	21
TABELLE 6: MARKIERUNGSSCHEMATA DER SECHS-FARBEN-FISH .....	28
TABELLE 7: MARKIERUNGSSCHEMATA DER S-COBRA-FISH .....	40
TABELLE 8: METHODISCHE GEGEBENHEITEN DES TOTELVYSION-SYSTEMS.....	60
TABELLE 9: METHODISCHE GEGEBENHEITEN DER SECHS-FARBEN-FISH.....	64
TABELLE 10: METHODISCHE GEGEBENHEITEN DER S-COBRA-FISH .....	69
TABELLE 11: VALIDIERUNG DER S-COBRA-FISH .....	70
TABELLE 12: GEGENÜBERSTELLUNG DER DREI ANGEWANDTEN FISH-TECHNIKEN.....	74
TABELLE 13: ANALYSIERBARKEIT DER PATIENTEN-DNAS DURCH MAPH .....	75
TABELLE 14: GLIEDERUNG DES ERFOLGREICH ANALYSIERTEN MAPH-KOLLEKTIVS .....	75
TABELLE 15: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DIE NEGATIVKONTROLLEN BEI 2SD.....	84
TABELLE 16: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DIE NEGATIVKONTROLLEN BEI 3SD.....	86
TABELLE 17: GEGENÜBERSTELLUNG DER MAPH-ERGEBNISSE BEI 2SD UND 3SD.....	87
TABELLE 18: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DIE POSITIVKONTROLLEN .....	90
TABELLE 19: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DIE REGIONEN MIT BEKANNTEN ABERRATIONEN .....	97
TABELLE 20: FALSCH-POSITIV- UND FALSCH-NEGATIV-RATEN (POSITIVKONTROLLEN). .....	97
TABELLE 21: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DAS PROSPEKTIV UNTERSUCHTE KOLLEKTIV .....	98
TABELLE 22: TOTELVYSION PROBE PANEL (VYSIS).....	141
TABELLE 23: „EIGENES“ SUBTELOMER-SONDENSET .....	142
TABELLE 24: FISH-SONDEN FÜR DIE AKROZENTRISCHEN CHROMOSOMEN .....	142
TABELLE 25. MAPH-SONDENSET A .....	143
TABELLE 26: MAPH-SONDENSET B .....	144
TABELLE 27: FISH-SONDEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER MAPH-ERGEBNISSE .....	145
TABELLE 28: ZUSAMMENSTELLUNG: TELOMERDISTANZEN DER MAPH- UND FISH-SONDEN .....	146

**Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STRUKTUR DER SUBTELOMERREGIONEN.....	4
ABBILDUNG 2: SCHEMA DER SUBTELOMER-SECHS-FARBEN-FISH (FARBDREIECK) .....	10
ABBILDUNG 3: PRINZIP DER COBRA .....	12
ABBILDUNG 4: PRINZIP DER MAPH .....	14
ABBILDUNG 5: SCATTER PLOTS IM ZWEIDIMENSIONALEN FARBDIAGRAMM .....	37
ABBILDUNG 6: MARKIERUNGSSCHEMA DER S-COBRA.....	38
ABBILDUNG 7: METAPHASE NACH HYBRIDISIERUNG MIT DEM VYSIS-SYSTEM (ANSATZ #1).....	58
ABBILDUNG 8: METAPHASE NACH HYBRIDISIERUNG MIT DEM VYSIS-SYSTEM (ANSATZ #11).....	58
ABBILDUNG 9: METAPHASE NACH HYBRIDISIERUNG MIT DEM VYSIS-SYSTEM (ANSATZ #7).....	59
ABBILDUNG 10: METAPHASE NACH SECHS-FARBEN-FISH (ANSATZ E).....	63
ABBILDUNG 11: SECHS-FARBEN-FISH MIT DEN SUBTELOMERSONDEN 17P UND 17Q.....	63
ABBILDUNG 12: COBRA-FISH, KARYOGRAMMDARSTELLUNG.....	71
ABBILDUNG 13: COBRA-FISH, TEILKARYOGRAMME .....	72
ABBILDUNG 14: GENESCAN-PEAKMUSTER DES MAPH-SONDENSETS B.....	77
ABBILDUNG 15: ERGEBNISKOMBINATIONEN DER MAPH-EXPERIMENTE .....	80
ABBILDUNG 16: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DEN FALL 1 .....	91
ABBILDUNG 17: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DEN FALL 3.....	92
ABBILDUNG 18: MAPH-ERGEBNISSE FÜR DEN FALL 2 .....	94
ABBILDUNG 19: LOKALISATION DER MAPH-SONDE 7Q .....	96



**Abkürzungen**

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	entionisiertes Wasser
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine/Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CCD	charge couple device
cen	Centomer
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
Cy	Cyanin
COBRA	Combined Binary Ratio Labelling
DAPI	4-6-diamidino-2-phenylindol
del	Deletion
der	derivativ
DG	Deckglas
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	Dinitrophenol
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DOP-PCR	degenerate oligonukleotide primed polymerase chain reaction
dup	Duplikation
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FAM	6-carboxy-fluorescein
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	Guanin
GTG	G-Banden-Trypsin-Giemsa
h	Stunde
inv	Inversion
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LINES	large interspersed repetitive sequences

---

MAPH	Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLPA	Multiplex Ligation Dependant Probe Amplification
MR	Mentale Retardierung
ng	Nanogramm
o.B.	ohne Befund
OT	Objektträger
p	kurzer Chromosomenarm
PAA	Polyacrylamid
PAC	P1 derived artificial chromosome
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
q	langer Chromosomenarm
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sek	Sekunde
SINEs	short interspersed repetitive elements
SSC	saline sodium citrat
STS	sequenced tagged site
t	Translokation
T	Thymin
TAMRA	N,N,N',N' Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
U	Units
ÜN	über Nacht
YAC	yeast artificial chromosome

## 1 Einleitung

Numerische und strukturelle Chromosomenstörungen stellen eine wichtige Ursache für mentale Retardierung, multiple Fehlbildungen und pathologische Schwangerschaften dar. Die bekanntesten Beispiele für numerische Chromosomenaberrationen sind die autosomalen Trisomien 21 (Down-Syndrom) und 18 (Edwards-Syndrom) sowie die verschiedenen gonosomalen Störungen wie die Monosomie X beim Ullrich-Turner-Syndrom oder die Gonosomenkonstellation XXY beim Klinefelter-Syndrom. Mit der Entwicklung der verschiedenen chromosomalen Bänderungstechniken seit Beginn der siebziger Jahre (Caspersson et al., 1968; Sumner et al., 1990) war erstmals die systematische Strukturanalyse aller menschlichen Chromosomen möglich und führte zur Erfassung zahlreicher struktureller Chromosomenstörungen wie Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen. Die Etablierung der *Fluoreszenz in situ-Hybridisierung/FISH* mit der Verfügbarkeit verschiedener Sondentypen hat die cytogenetische Diagnostik weiterhin verändert (Pinkel et al., 1986; Lüdecke et al., 1989; Cremer et al. 1988). Der Einsatz von single copy Sonden ermöglicht in zunehmendem Maße auch die Untersuchung von so genannten kryptischen Aberrationen, deren Größe unter der konventionell-cytogenetischen Nachweisgrenze von 3-10Megabasenpaaren liegt.

Lange Zeit war die durch konventionelle Bänderung 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 Chromosomenstörung. Durch die routinemäßige Anwendung der FISH zur Erkennung submikroskopischer Aberrationen nahm die Zahl diagnostizierter Mikrodeletionen und -duplikationen zu, so dass heutzutage allein für ein einziges dieser cytogenetisch nicht nachweisbaren Syndrome (DiGeorge-/Velokardiofaziales Syndrom, del 22q11.2) eine Häufigkeit von bis zu 1:4.000 Lebendgeburten angenommen wird (Burn und Goodship, 1996). Kryptische Aberrationen stellen somit eine häufige Form der Chromosomenmutation dar.

Als Regionen mit vermehrten kryptischen Aberrationen gewannen in den vergangenen Jahren die proximal an die Telomer-DNA angrenzenden subtelomerischen Chromosomenbereiche an Bedeutung (Biesecker et al., 1995). Das gehäufte Vorkommen von meiotischen Chiasmata und Rekombinationen (Hultén et al., 1989) sowie die repetitive Struktur der Subtelomere mit zahlreichen Homologien im Genom deuten auf eine hohe Aberrationsfrequenz dieser Regionen hin (Mefford und Trask, 2002). Zusätzlich ist wegen der überdurchschnittlich großen Gendichte der Subtelomere zu erwarten, dass Aberrationen in diesen Bereichen bei einer Vielzahl von genetisch bedingten Störungen bislang unklarer Genese ursächlich beteiligt sind (Saccone et al., 1992). Die wichtige ätiologische Rolle subtelomerischer Aberrationen wurde vor allem bei der mentalen Retardierung (MR), die

etwa 2-3% der Bevölkerung betrifft, aufgezeigt (Birch et al., 1970; Knight et al., 1999). Die Zusammenstellung mehrerer großer Studien ergab kryptische Imbalancen der Subtelomere bei durchschnittlich 4,6% der Patienten mit MR unklarer Genese (Xu et al., 2003). Es ist zu erwarten, dass eine systematische Untersuchung dieser Regionen bei einer Vielzahl von Betroffenen mit MR zur Diagnosestellung beitragen wird.

In der Diagnostik subtelomerischer Chromosomenaberration stellt die FISH derzeit den Goldstandard dar. Sie ist in vielen cytogenetischen Labors etabliert und erlaubt im Gegensatz zu molekulargenetischen Techniken Aussagen über die chromosomale Lokalisation der untersuchten Loci und damit auch die Detektion balancierter Störungen (Engels et al., 2003). Mit dem von Knight et al. (2000) publizierten „*optimized set of human telomere clones*“ stehen für alle relevanten Regionen des menschlichen Karyotyps Locus-spezifische FISH-Sonden zur Verfügung, deren Eignung für einen sensitiven Nachweis von Subtelomerstörungen vielfach belegt ist (Anderlid et al. 2002; Baker et al., 2002). FISH-Analysen aller 43 euchromatischen Subtelomere in Einzelmarkierungen sind jedoch aufwendig. Daher wurden Multi-Colour-FISH-Techniken entwickelt, die eine simultane Visualisierung vieler verschiedener Sonden ermöglichen und damit die Anzahl notwendiger Hybridisierungen verringern (Brown et al., 2000, 2001; Granzow et al., 2000).

Die Vorteile der molekulargenetischen Techniken, vor allem von Methoden zur direkten Bestimmung von Kopienzahlen genomischer Loci wie der *Vergleichenden Genomischen Hybridisierung/CGH* oder der *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation/MAPH*, liegen dagegen in einer höheren Effizienz durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Analyse mehrerer Regionen und Patienten (Hollox et al., 2002a; Veltmann et al., 2002). Die Kombination einer solchen DNA-basierten Technik zur Voruntersuchung der Subtelomere, mit der gut validierten FISH zur Verifizierung auffälliger Befunde könnte die aufwendigere FISH zumindest teilweise ersetzen und damit die Untersuchungseffizienz steigern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und vergleichende Anwendung effizienter molekular-cytogenetischer und molekulargenetischer Techniken zur Analyse der 43 euchromatischen Subtelomerregionen des menschlichen Karyotyps. Zunächst sollen die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und die Subtelomer-*Combined Binary Ratio Labelling/SCOBRA*-FISH für die Untersuchung der Chromosomenenden in Lymphocyten etabliert und in ihrer Anwendbarkeit und Effizienz sowohl untereinander als auch mit dem kommerziell erhältlichen „*ToTelVysion-Multi-Colour Probe Panel*“ der Firma Vysis verglichen werden. Es soll ermittelt werden, ob eine methodische Weiterentwicklung der Multi-Colour-FISH durch Erhöhung der Anzahl gleichzeitig dargestellter Sonden zu einer Steigerung der Untersuchungseffizienz führt. Darüber hinaus soll die MAPH als *high-throughput*-Methode für die Voruntersuchung der Subtelomerregionen etabliert und bezüglich ihrer Anwendbarkeit und Nachweisgenauigkeit bei der Detektion von Subtelomeraberrationen getestet werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Einführung: Subtelomerregionen und Sondenlokalisationen

Die subtelomerischen Chromosomenregionen bilden den Übergang zwischen der eigentlichen Telomer-DNA und den Chromosomen-spezifischen Sequenzen der menschlichen Chromosomen. Diese Regionen besitzen eine überaus komplexe, plastische und variable Struktur und gehören bis heute zu den am wenigsten entschlüsselten Sequenzen des menschlichen Genoms (Bailey et al., 2001; Riethman et al., 2004). Die Struktur der Subtelomerregionen ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Jedes Chromosom endet terminal mit einer Sequenzabfolge aus 2-20 Kilobasenpaaren (kb) des Tandemrepeats (TTAGGG)<sub>n</sub>. Diese Telomer-DNA dient als Schutzkappe gegen DNA-Verluste bei der Replikation und verhindert gemeinsam mit assoziierten Proteinen die Fusion von Chromosomenenden. Direkt im Anschluss an die Hexanukleotidsequenzen liegen die Subtelomere. Sie erstrecken sich über einen Bereich von 8kb (7qter) bis 300kb (8pter) und enthalten Sequenzblöcke repetitiver DNA, welche zum Teil starke Homologien zu heterologen Chromosomenenden aufweisen (Mefford und Trask, 2002). So zeigt beispielsweise die Subtelomerregion des langen Armes von Chromosom 3 Sequenzverwandtschaften mit mindestens 35 anderen Subtelomeren (Trask, unpublizierte Daten). Für einige Chromosomen (4p, 4q, 16p, 18p, 20p, 22q) ist eine Aufteilung der Sequenzblöcke in zwei Domänen beschrieben (Chute et al., 1997; Flint et al., 1997), die von interstitiellen degenerierten (TTAGGG)<sub>n</sub>-Sequenzen getrennt werden. Die distale Subdomäne (Abbildung 1 (A)) besteht dabei aus kurzen Sequenzen mit zahlreichen Homologien zu anderen Chromosomenregionen, die proximale Subdomäne (Abbildung 1 (B)) aus längeren Sequenzen mit nur wenigen Homologien. Neben den repetitiven Sequenzen beinhalten einige Subtelomere auch funktionelle Gene mit Homologien zu anderen Regionen, wie beispielsweise olfaktorische Rezeptorgene (OR-Gene) auf den Chromosomen 4p, 8p, 6p, 6q, 5q, 10q und 11q (Trask et al., 1998; Mombaerts, 1999). Die repetitiven Subtelomer-Sequenzen gehen proximal in nichtrepetitive, Regionen über, die spezifisch für die jeweiligen Chromosomenenden sind (Abbildung 1 (C)) (Flint et al., 1996). Wenn im Folgenden von subtelomerischen Aberrationen gesprochen wird, sind damit Veränderungen dieser telomernahen, spezifischen Sequenzen gemeint.

Die exakte Funktion der repetitiven Subtelomersequenzen ist bisher weitgehend unklar. Es wird postuliert, dass die Häufung repetitiver und homologer Sequenzen evolutionär vorteilhaft ist, um Chromosomenenden, die ihr schützendes Ende durch Mutation verloren haben, durch heterologe Rekombination zu „reparieren“ (Dunham et al., 2000). Weiterhin tragen sie aufgrund ihrer Plastizität und Variabilität in Verbindung mit ihrem Gengehalt zur

genomischen und phänotypischen Diversität bei (Freitas-Junior et al., 2000; Linardopoulou et al., 2001).

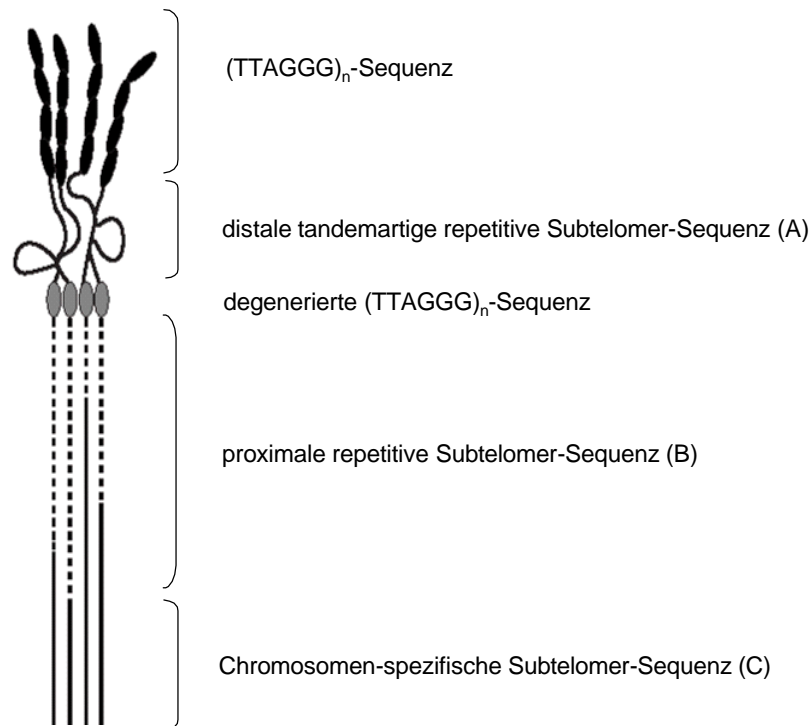


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur der Subtelomerregionen nach Flint et al. (1997).

Meiotische Rekombinationsereignisse in den Subtelomerregionen sind deutlich häufiger als in anderen Chromosomenbereichen und die Homologenpaarung in der Meiose wird in diesen Regionen induziert (Hultén et al., 1989; Scherthan et al., 1996; Barlow and Hultén, 1996). Die repetitive Struktur der Subtelomere mit zahlreichen Homologien im Genom begünstigt Fehlpaarungen und damit ungleiche Rekombinationen. Das Zusammenspiel aus erhöhter Rekombinationsrate und Prädisposition zu Fehlpaarungen lässt eine erhöhte Aberrationsfrequenz der Subtelomere erwarten. Die sämtlich GC-reichen subtelomerischen Regionen weisen zudem die höchste Genkonzentration im menschlichen Genom auf (Saccone et al., 1992). Demzufolge ist bei Aberrationen dieser Regionen mit deutlichen phänotypischen Konsequenzen zu rechnen. Die Kombination der Faktoren große Gendichte und hohe Aberrationsfrequenz legt die Vermutung nahe, dass subtelomerische Rearrangements bei einer Vielzahl genetisch bedingter Störungen bislang unklarer Genese ursächlich beteiligt sind. In zahlreichen Publikationen wurde die klinische Relevanz der Subtelomeraberrationen bestätigt. Beispielsweise wurde die wichtige ätiologische Rolle dieser Aberrationen für die mentale Retardierung (MR) in mehreren großen Studien bewiesen. In einer Metastudie geben Xu et al. (2003) für die Häufigkeit subtelomerischer Aberrationen bei Patienten mit MR unklarer Genese einen Durchschnittswert von 4,6% an. Auch in der Tumor-Cytogenetik sowie bei der Untersuchung von Paaren mit wiederholten

Spontanaborten konnte die Bedeutung der Subtelomeraberrationen aufgezeigt werden (Brown et al., 2002; Yakut et al., 2002).

Bei der Mehrzahl subtelomerischer Aberrationen handelt es sich um so genannte kryptische Aberrationen, deren Größe unter dem Auflösungsvermögen konventionell-cytogenetischer Techniken von 3-10 Megabasenpaaren (Mb) liegt. Die Detektion von Deletionen und Duplikationen sowie Inversionen, Insertionen und reziproken Translokationen ist zudem aufgrund der identischen, Giemsa- negativen Bänderungseigenschaften dieser GC-reichen Regionen erschwert. Durch die Ergänzung der konventionellen Techniken durch die inzwischen weit verbreitete FISH-Analyse mit Chromosomen-spezifischen *whole chromosome paint*-/wcp-Sonden sind zwar kleinere Aberrationen als zuvor nachweisbar, jedoch sind die subtelomerischen Regionen in der Mehrzahl solcher Sonden unterrepräsentiert. Ein sicherer Nachweis von Subtelomeraberrationen ist daher nur durch gezielte molekulargenetische bzw. molekular-cytogenetische Untersuchungen mit spezifischen Markern bzw. Sonden aus den subtelomerischen Regionen möglich. Die Größe und Komplexität der Subtelomere macht die Auswahl solcher Sonden jedoch außergewöhnlich schwierig: Die Forderung nach Einzigartigkeit einer Sonden-Sequenz im Genom („single copy“) wird nur von proximal gelegenen Subtelomer-Sequenzen erfüllt. Rearrangements, die distal zu diesen Sequenzen liegen, bleiben mit solchen Sonden unentdeckt. Die Verwendung weiter distal lokalisierter und damit eher repetitiver Sequenzen erhöht dagegen zwar die Sensitivität, erlaubt aber aufgrund zahlreicher Homologien, welche zu Kreuzhybridisierungen führen, keine eindeutige Identifikation der detektierten DNA. In der Praxis wird ein Kompromiss zwischen der Spezifität und der Sensitivität getroffen, indem die möglichst distalsten, spezifischen Sequenzen als Sonden eingesetzt werden. Auf dieser Grundlage wurden verschiedene Sets Locus-spezifischer Subtelomersonden entwickelt. Zum einen wurde ein Set aus *half-YACs* (YAC: Yeast artificial chromosome) zusammengestellt, in denen humane Telomerregionen subkloniert sind (Kingsley et al., 1997). Nachteil dieser *half-YACs* sind zahlreiche Kreuzhybridisierungen aufgrund repetitiver Sequenzen. Mit der Entwicklung und Optimierung eines Subtelomer-Sondensets bestehend aus Cosmiden, BACs (bacterial artificial chromosome), P1 und PACs (P1 derived artificial chromosomes) steht heute ein vollständiges Set gut lokalisierter und charakterisierter Klone zur Verfügung (National Institute of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration 1996; Knight et al., 2000).

Die Etablierung des Subtelomersets zur gezielten Analyse sämtlicher Subtelomere des menschlichen Karyotyps eröffnete ein breites Anwendungsspektrum in der klinischen Diagnostik und der cytogenetischen Forschung. Es wurde unter anderem zur Analyse der Subtelomere bei Patienten mit idiopathischer MR (Knight et al., 1999) sowie zur Charakterisierung bekannter Aberrationen (Horsley et al., 1998) und hämatologischer Krebserkrankungen (Tosi et al., 1999) eingesetzt.

### 2.1.1 Techniken zur Untersuchung der Subtelomere

Die vollständige Analyse aller relevanten menschlichen Subtelomere umfasst 43 Regionen: die kurzen (p)- und langen (q)-Arme der beiden Gonosomen und der 22 Autosomen abgesehen von den p-Armen der akrozentrischen Chromosomen, deren Aberrationen keine phänotypischen Konsequenzen haben. Diese große Zahl zu untersuchender Regionen machte die Entwicklung effizienter Analysetechniken notwendig. Einen molekulargenetischen Ansatz stellte die Analyse subtelomerisch lokalisierter polymorpher Marker dar. Dabei wurde z.B. das *VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)-Typing* und das *STRP (Short Tandem Repeat Polymorphism)-Typing* eingesetzt (Flint et al., 1995; Slavotinec et al., 1999). Vorteile solcher Mikrosatellitenanalysen sind die potentiell hohe Effizienz sowie die Möglichkeit der Automatisierung (Rio et al. 2002). Die Aussagekraft dieser Methoden hängt jedoch von der Verfügbarkeit informativer Marker für die 43 Subtelomerregionen sowie von der Verfügbarkeit elterlichen Untersuchungsmaterials ab. Allerdings kann auch bei Verwendung mehrerer Marker pro Region keine 100%ige Informativität erreicht werden. Zudem können keine Aussagen über die Lokalisation der detektierten Marker und damit zum möglichen Vorliegen von balancierten Translokationen getroffen werden. Die Nachteile der Mikrosatellitenanalysen werden von Methoden zur direkten Kopienzahlbestimmung wie der *Vergleichenden Genomischen Hybridisierung/CGH* und der *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation/MAPH* weitgehend umgangen. Eine modifizierte CGH zur Analyse der Subtelomerregionen wurde erstmals 1999 von Ghaffari et al. beschrieben. Die Eignung der *array-* oder *Matrix-CGH* zur Detektion subtelomerischer Imbalancen wurde von Veltmann et al. (2002) und Harada et al. (2004) demonstriert. Diese Methode wird jedoch unter anderem wegen ihres hohen apparativen Aufwands derzeit nur in wenigen spezialisierten Zentren verwendet. Die MAPH ist eine neue Methode zur direkten, parallelen Bestimmung der Kopienzahl von bis zu 60 genomischen Loci (Armour et al., 2000; Hollox et al., 2002a; Akrami et al., 2003) und stellt damit eine methodische Alternative zur Matrix-CGH mit geringerem apparativen Aufwand dar. Ihre Anwendbarkeit bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen wurde in ersten Studien bewiesen (Sismani et al., 2001; Hollox et al., 2002b; Kriek et al., 2004). Diese Methode kam auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Die am weitesten verbreitete Methode zur Analyse der Subtelomerregionen ist die FISH. Sie ermöglicht im Gegensatz zu den molekulargenetischen Techniken Aussagen über die chromosomale Lokalisation der untersuchten Loci und damit auch die Detektion von balancierten Chromosomenaberrationen. In den meisten publizierten Studien zur Untersuchung subtelomerischer Aberrationen wurden kommerziell erhältliche FISH-Kits eingesetzt. Da bei solchen Kits maximal drei Subtelomerregionen gleichzeitig detektiert werden können, erfordert eine vollständige Analyse aller 43 relevanten Subtelomere 15 bis



23 parallele Hybridisierungen. Nachteile wie die große Menge erforderlichen Untersuchungsmaterials sowie der hohe zeitliche und finanzielle Aufwand machten eine Weiterentwicklung der molekular-cytogenetischen Techniken notwendig. Eine Beschleunigung der Untersuchung wurde durch die Entwicklung verschiedener Multi-Colour-FISH-Techniken erzielt, die eine Visualisierung vieler verschiedener Sonden gleichzeitig ermöglichen. Effiziente und zuverlässige Analysetechniken sind beispielsweise die *Telomeric-Multiplex-FISH* und die *M-TEL*-Technik (Henegariu et al., 2001; Brown et al., 2002). Diese bewirken durch die Kombination verschiedener Fluorochrome (kombinatorische Markierungsstrategie) eine Erhöhung der Anzahl simultan darstellbarer Sonden; eine Unterscheidung der Langarm- und Kurzarm-Subtelomerregionen ist jedoch nicht gewährleistet. Eine solche Differenzierung und damit die Nachweismöglichkeit perizentrischer Inversionen mit subtelomerischen Bruchpunkten war erstmals durch ein von Fauth et al. (2001) beschriebenes zweistufiges Analyseverfahren gegeben: In einer ersten Hybridisierung werden 5-10Mb große Sonden zur Detektion interchromosomaler Aberrationen eingesetzt. Die Unterscheidung von p- und q-Armen erfolgt in einer zweiten Hybridisierung unter Verwendung Subtelomer-spezifischer BAC, PAC und P1-Klone. Da die Detektion interchromosomaler Aberrationen nur über die hochkomplexen Sonden erfolgt, bleiben kleine Translokationen zwischen jeweils p- oder q-terminalen Regionen mit dieser Methode jedoch unentdeckt. Die Etablierung einer weiteren Subtelomer-Multi-Colour-FISH-Methode ohne diesen Nachteil war Teil der vorliegenden Arbeit.

## 2.2 Einführung in die angewandten Methoden

### 2.2.1 Fluoreszenz in situ-Hybridisierung/FISH

Durch die in situ-Hybridisierung (ISH) können genomische Zielsequenzen in morphologisch erhaltenen Geweben, Zellen und Chromosomenpräparaten „in situ“, also in ihrer natürlichen Lage nachgewiesen und gleichzeitig lokalisiert werden. Dabei werden markierte DNA-Sequenzen als Sonden eingesetzt, welche nach Denaturierung mit komplementären Zielsequenzen der genomischen DNA hybridisieren und dadurch Nukleinsäurehybride bilden. In der molekularen Cytogenetik wird diese Technik zur differentiellen Darstellung ganzer Chromosomen, definierter Chromosomenabschnitte oder einzelner Sequenzen in Meta- und Interphasen eingesetzt. Die ISH wurde erstmals 1969 von zwei Arbeitsgruppen (John et al., 1969; Pardue und Gall, 1969) beschrieben, als ausschließlich radioaktive Nachweisverfahren zur Markierung zur Verfügung standen.

Mit der Entwicklung von Fluorochromen als stabile, nichtradioaktive Markermoleküle (Langer et al., 1981) und ihrer Anwendung in der Fluoreszenz-ISH (FISH) (Pinkel et al., 1986) gewann die Methode an Bedeutung. Unter Verwendung verschiedener Fluorochrome zur

Markierung verbesserten sich die Nachweismethoden ständig und ermöglichten die gleichzeitige Darstellung mehrerer Sonden (Bauman et al., 1980; Wiegant et al., 1993).

Die Möglichkeit der molekularen Klonierung zur Herstellung einer Vielzahl verschiedener Sondentypen eröffnete der FISH schließlich ein breites Anwendungsspektrum in der cytogenetischen Forschung und Routinediagnostik. In Abhängigkeit von der Fragestellung kommen die folgenden Sonden zum Einsatz: Repetitive Sonden dienen zum Nachweis von Centromeren und heterochromatischen Bereichen und werden beispielsweise zur numerischen Analyse der Chromosomen in Meta- und Interphase eingesetzt. So genannte *paints* stellen ganze Chromosomen (*wcp/whole chromosome paint*) oder Chromosomenabschnitte (*pcp/partial chromosome paint*) dar. Sie dienen unter anderem der Identifizierung von Translokationschromosomen. *Single copy-* oder Locus-spezifische Sonden enthalten Sequenzen, die nur einmal im Genom vorkommen. Sie werden zum Nachweis einzelner Gene oder Genregionen verwendet, wie beispielsweise zur Analyse von Mikrodeletions-Syndromen wie dem Williams-Beuren-Syndrom oder dem DiGeorge-Velokardiofazialen Syndrom.

Der Nachweis der hybridisierten Sonden kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Markierung sind die Fluorochrome unmittelbar an die Nukleotide der Sonden-DNA gebunden. Im Fall der indirekten Markierung sind Reportermoleküle an die DNA gekoppelt, welche in einem zweiten Schritt durch Fluorochrom-gekoppelte Affinitätsgruppen (z.B. Antikörper) nachgewiesen werden.

Für die in der vorliegenden Arbeit angewandten FISH-Techniken wurden hauptsächlich *single copy*-Sonden, die spezifisch für die subtelomerischen Chromosomenregionen des menschlichen Genoms sind, verwendet. Zudem wurden in einigen Hybridisierungen repetitive Sonden als Kontrollsonden eingesetzt. Mit Ausnahme der binären Markierung bei der S-COBRA-FISH (vgl. 3.3.4.) wurde die direkte Markierungsform gewählt.

Es wurden drei verschiedene FISH-Techniken, das kommerzielle ToTelVysion-System der Firma Vysis, die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und die Subtelomer-COBRA-FISH, zur Analyse der Subtelomerregionen bei Patienten mit MR vergleichend eingesetzt. Diese Techniken unterscheiden sich in erster Linie durch die Anzahl der in einer Hybridisierung gleichzeitig darstellbaren Sonden und damit in der Anzahl der für alle 43 relevanten Subtelomerregionen notwendigen Hybridisierungen. Darüber hinaus differieren sie teilweise in der Zusammenstellung des jeweils verwendeten SONDENSETS. Während für die Sechsfarben-FISH und die S-COBRA-FISH mit Ausnahme der Sonde für 19q alle Sonden aus dem „second generation set“ (Knight et al., 2000) stammen, setzt sich das kommerzielle SONDENSET des „ToTelVysion Probe Panel“ (Vysis) aus Sonden unterschiedlicher Quellen zusammen (vgl. <http://www.vysis.com>).

### 2.2.1.1 ToTelVysion-System, „niedrige Multiplizität“

Das „ToTelVysion-Multi-Colour Probe Panel“ (Vysis) ist ein kommerziell erhältliches FISH-System welches die differentielle Darstellung aller 43 euchromatischen Subtelomerregionen mit 41 Sonden in insgesamt 15 Hybridisierungen ermöglicht. Elf der insgesamt 15 Hybridisierungsansätze enthalten je drei subtelomerisch lokalisierte Sonden (vgl. Tabelle 22 im Anhang). Zwei dieser Subtelomersonden sind mit den reinen Fluorochromen SpectrumGreen („grün“) und SpectrumOrange („rot“) markiert, die dritte wird durch Kombination beider Fluorochrome dargestellt („gelb“). Zusätzlich sind in zehn dieser elf Hybridisierungsansätze centromerspezifische oder centromernahe *single copy*-Sonden enthalten. Diese sind mit dem Fluorochrom SpectrumAqua (blau) markiert und dienen der einfacheren Identifizierung der Chromosomen. Die übrigen vier Hybridisierungsansätze umfassen jeweils eine SpectrumGreen- und eine SpectrumOrange-markierte Subtelomer-sonde, die spezifisch für den p- und den q-Arm desselben Chromosoms ist. Auf diese Weise werden mit dem ToTelVysion-System Multiplizitäten von maximal vier erreicht, von denen drei tatsächlich der Analyse subtelomerischer Chromosomenregionen dienen. Alle Sonden des ToTelVysion Probe Panels liegen in direkt markierter und gebrauchsfertiger Form vor.

### 2.2.1.2 Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, „mittlere Multiplizität“

Die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH ist eine Multi-Colour-FISH-Methode, die auf der kombinatorischen Markierungsstrategie basiert. Sie wurde am Institut für Humangenetik in Bonn für die Untersuchung von Abortmaterial nach Zellkultur entwickelt (Hoischen, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zunächst bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf die Untersuchung subtelomerischer Chromosomenregionen in Lymphocyten erprobt und schließlich zur Analyse angewandt.

Bei der Sechs-Farben-FISH werden drei spektral gut unterscheidbare Fluorochrome zum einen in reiner Form, zum andern in paarweiser Kombination eingesetzt. Auf diese Weise wird eine Multiplizität von sechs erreicht (Abbildung 2). Basierend auf der kombinatorischen Markierungsstrategie ist eine simultane, differentielle Darstellung aller 43 euchromatischen Subtelomerregionen durch 41 Sonden in sieben Hybridisierungen möglich. Pro Hybridisierung werden dabei sechs bzw. fünf Subtelomersonden eingesetzt. Drei Sonden werden mit reinen Fluorochromen markiert, drei weitere Sonden werden jeweils zu ungefähr 50% mit zwei der drei Fluorochrome markiert und miteinander gemischt. In Tabelle 1 sind die Fluorochromanteile für die spezifische Markierung von sechs Sonden einer Hybridisierung zusammengestellt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden in der vorliegenden Arbeit dGreen, Cyanin 3 (Cy3) und Cyanin 5 (Cy5) verwendet. Die Markierung erfolgte chemisch durch das *Universal-Linkage-System/ULS*. Den reinen Fluorochromen wurden im Rahmen der digitalen Bildverarbeitung die Falschfarben „grün“ (dGreen), „rot“ (Cy3) und „blau“ (Cy5) zugeordnet.

Den durch Kombination von zwei Fluorochromen erzeugten Mischfarben wurden entsprechende Falschfarben zugeordnet. Diese sind ebenfalls in Tabelle 1 aufgeführt.

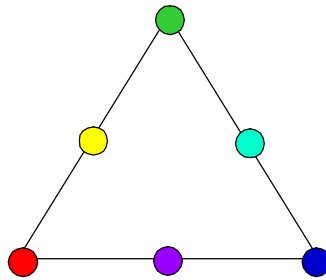


Abbildung 2: Schema der Subtelomer-Sechs-Farben-FISH (Farbdreieck).

Sonde	dGreen	Cy3	Cy5	Falschfarbe
1	100%			grün
2	50%		50%	türkis
3			100%	blau
4		50%	50%	violett
5		100%		rot
6	50%	50%		gelb

Tabelle 1: Theoretische Fluorochromanteile für die Sondenmarkierung nach der kombinatorischen Markierungsstrategie (Sechs-Farben-FISH).

Die Zusammenstellung der Subtelomersonden einer Hybridisierung erfolgte unter anderem nach Kriterien wie der Hybridisierungseffizienz oder der Signalstärke (vgl. 3.3.3.1). Zusätzlich wurden Sondenkombinationen gewählt, die eine möglichst eindeutige morphologische Identifizierung der gleichzeitig hybridisierten Chromosomen ermöglichten.

### 2.2.1.3 Combined Binary Ratio Labelling-/COBRA-FISH, „hohe Multiplizität“

Bei der Subtelomer-*Combined Binary Ratio Labelling*-/S-COBRA-FISH handelt es sich, wie bei der Sechs-Farben-FISH, um eine Multi-Colour-FISH-Methode. Sie basiert auf der von Tanke et al. (1999) entwickelten COBRA-Strategie, bei der durch Verknüpfung von kombinatorischer (*combined*)- und Mischungsverhältnis (*ratio*)-Markierung Multiplizitäten von bis zu 48 Farben mit nur fünf verschiedenen Fluorochromen erreicht werden (Tanke et al., 1999; Wiegand et al., 2000). Die COBRA-Technik wurde zunächst mit vier Fluorochromen für die differentielle Darstellung sämtlicher Chromosomen des Menschen unter Verwendung von *wcp*-Proben etabliert. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips stellt die so genannte PQ-COBRA dar, bei der unter Einsatz von fünf Fluorochromen die p- und q-Arme sämtlicher Chromosomen des Menschen differentiiell markiert und dadurch sowohl inter- als auch intrachromosomale Aberrationen identifiziert werden können (Wiegand et al., 2000). Die COBRA-FISH fand bislang unter anderem in der Tumor-Cytogenetik, der klinischen Cytogenetik sowie bei der differentiellen Darstellung aller Chromosomen der Maus Anwendung (Bezrookove et al., 2000; Fodde et al., 2001; Jin et al., 2001). Im Rahmen des

Forschungsprojektes „Untersuchung von Patienten mit mentaler Retardierung auf kryptische subtelomerische Chromosomenaberrationen durch COBRA-Multi-Colour-FISH“ (DFG, PR131/19-1; Projektleiter: Engels) wurde das COBRA-Prinzip auf Locus-spezifische Sonden der Subtelomerregionen übertragen. Ein Teil der Etablierung wurde dabei vom Projektleiter am *Leiden University Medical Center* (LUMC, Leiden, Niederlande) durchgeführt. Die Methode wurde schließlich am Institut für Humangenetik in Bonn bis zur klinischen Anwendung auf ein Kollektiv von Patienten mit MR entwickelt (Engels et al., 2003).

Beim klassischen COBRA-Prinzip (Tanke et al., 1999) werden im Rahmen der *ratio*- oder Mischungsverhältnis-Markierung drei spektral gut voneinander unterscheidbare Fluorochrome als *ratio*-Fluorochrome eingesetzt, die paarweise in festgelegten Verhältnissen gemischt werden (Abbildung 3). Die Mischungsverhältnisse der *ratio*-Farben werden dabei so gewählt, dass aus jedem Fluorochrompaar fünf eindeutig unterscheidbare Mischfarben entstehen. Auf diese Weise können aus drei *ratio*-Fluorochromen bis zu zwölf Farben generiert werden. In Abbildung 3 sind die möglichen Mischungsverhältnisse der *ratio*-Farben in einem Farbdreieck dargestellt. Die Eckpunkte des Dreiecks symbolisieren die reinen, also ungemischten, *ratio*-Fluorochrome, auf den Kanten sind die durch paarweises Mischen in verschiedenen Verhältnissen generierten Farben dargestellt. Zur Erhöhung der Multiplizität wird dieses primäre Set von zwölf *ratio*-Farben mit und ohne Beimischung eines vierten, binären Fluorochroms eingesetzt (symbolisiert durch Rechteck im Zentrum der Farbdreiecke). Auf der Grundlage von vier Fluorochromen werden so insgesamt 24 eindeutig voneinander unterscheidbare Farben generiert. Durch Zugabe eines weiteren binär verwendeten Fluorochroms kann dieser Prozess zur Erhöhung der Multiplizität weiter fortgeführt werden.

Zur Erzeugung der *ratio*-Farben wird die Sonden-DNA meist über ein direktes Markierungsverfahren mit den Fluorochromen gekoppelt. Diese Markierung kann enzymatisch durch Nick-Translation, *degenerate oligonucleotide primed*-/DOP-PCR oder chemisch durch das *Universal-Linkage-System/ULS* erfolgen (Wiegand et al., 1991, Wiegand et al., 1993). Die einzelnen *ratio*-Farben ergeben sich durch Mischen entsprechender Anteile verschiedenfarbig markierter DNA. Die binäre Differenzierung wird in der Regel durch eine indirekte Markierung der betreffenden Sonden durch ein Hapten (z.B. Biotin oder Digoxigenin) oder Dinitrophenol (DNP) erzielt. Der Nachweis erfolgt über Fluorochrom-gekoppelte Affinitätsgruppen (Avidin, Antikörper).

Bei der Subtelomer-COBRA-FISH wird die COBRA-Markierungsstrategie auf Sonden angewandt, die spezifisch für die subtelomerischen Chromosomenregionen sind. Die hohe Multiplizität des COBRA-Prinzips erlaubt unter Verwendung von vier Fluorochromen die differentielle Darstellung aller 43 Subtelomerregionen durch 41 Sonden in zwei Hybridisierungen. Durch die differentielle Darstellung von Sonden, die spezifisch für den p- und q-Arm eines Chromosoms sind, können mit dieser Methode, wie auch mit der Sechs-

Farben-FISH, neben Deletionen und Translokationen auch Inversionen mit Bruchpunkten in den Subtelomerbereichen nachgewiesen werden.

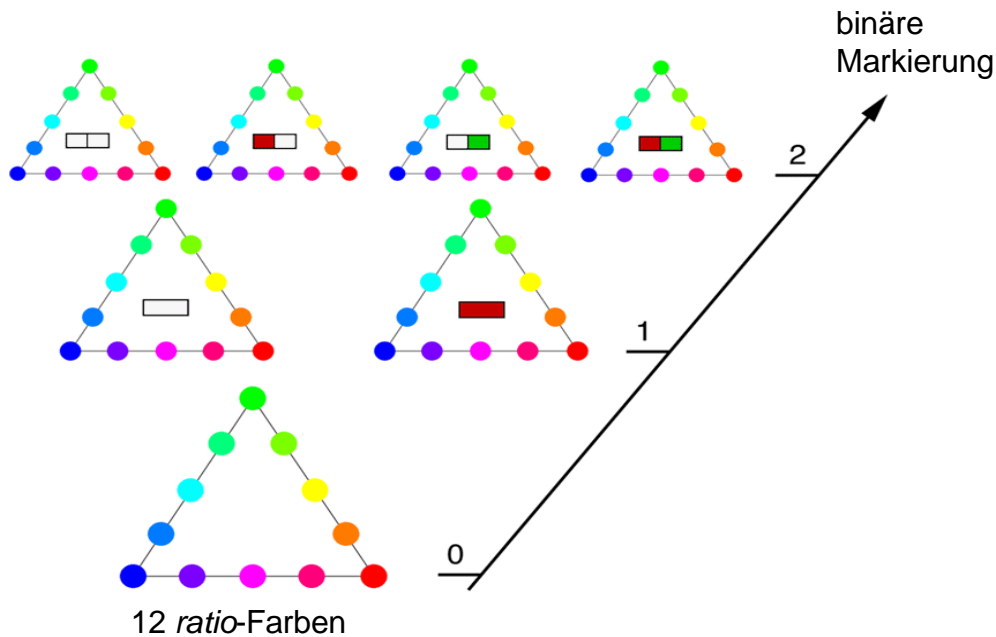


Abbildung 3: Prinzip der COBRA.

## 2.2.2 Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation/MAPH

Die *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation/MAPH* ist eine molekulargenetische Methode zur direkten Bestimmung von Kopienzahlen genomischer Loci. Sie wurde erstmals von Armour et al. (2000) beschrieben und ermöglicht die parallele Untersuchung von bis zu 60 genomischen Regionen auf Deletionen, Duplikationen bzw. Amplifikationen bei maximal 96 Patienten gleichzeitig (Hollox et al., 2002a; Kriek et al., 2004; Akrami et al., 2003). Die MAPH besitzt ein breites Anwendungsspektrum. Sie wird beispielsweise zur Detektion von Deletionen und Duplikationen im Dystrophin-Gen bei der Muskeldystrophie des Typs Duchenne (White et al. 2002), zur Detektion von Deletionen und Duplikationen im BRCA-1-Gen bei familiärem Brustkrebs und im PMP22-Gen beim Charot-Marie-Tooth-Syndrom sowie als Screening-Methode sämtlicher subtelomerischer Chromosomenregionen eingesetzt (Sismani et al., 2001; Hollox et al., 200b).

Die Methode basiert auf der Möglichkeit, mehrere kurze spezifische DNA-Sonden nach Hybridisierung auf genomische DNA wieder in Lösung zu bringen und mittels PCR unter Wahrung der Mengenverhältnisse gleichzeitig zu amplifizieren (Armour et al., 2000). Durch den anschließenden quantitativen Nachweis der PCR-Produkte wird die Kopienzahl der detektierten Loci bestimmt. Das Prinzip der MAPH ist in Abbildung 4 dargestellt. Denaturierte genomische Test-DNA wird auf 2x3mm große Nylonfilter aufgetragen und mittels ultravioletter Strahlung irreversibel gebunden. Ein Gemisch aus DNA-Sonden unterschiedlicher Länge (Sonden-Set), deren Sequenz komplementär ist zu den zu

analysierenden genomischen Loci, wird im Überschuss mit der immobilisierten Test-DNA hybridisiert. Der Überschuss an Sonde gewährleistet, dass jede komplementäre Sequenz der genomischen DNA durch Hybridisierung abgedeckt wird. Nach stringentem Waschen zur Entfernung überschüssiger und fehlgepaarter Sonden korreliert die Menge gebundener Sonde mit der Kopienzahl der Zielsequenzen in der genomischen DNA. Durch Erhitzen werden anschließend die spezifisch gebundenen Sonden von der immobilisierten genomischen DNA gelöst und durch PCR unter Wahrung der Mengenverhältnisse amplifiziert. Eine der wichtigsten Eigenschaften der MAPH ist, dass sämtliche Sonden eines Sets unter Verwendung eines einzigen Primerpaares simultan amplifiziert werden können. Die Sonden sind so konstruiert, dass die Locus-spezifischen Sequenzen jeweils von einem identischen Primerpaar flankiert werden. Die PCR wird unter Bedingungen durchgeführt, die eine direkte Proportionalität zwischen der Produktmenge der amplifizierten Sonden-DNA und der Menge ursprünglich hybridisierter Sonden-DNA gewährleisten. Diese korreliert wiederum mit der Kopienzahl der vorhandenen Loci in der genomischen Test-DNA.

Die unterschiedliche Länge der einzelnen Sonden ermöglicht eine gelelektrophoretische Auftrennung oder eine Differenzierung über kapillarbasierte Analysensysteme. Für die Anwendung in der MAPH steht ein Fragmentlängenbereich von 130-500bp zur Verfügung. Dieser wird durch das Verhalten der Sonden in der Hybridisierung und in der PCR bestimmt (vgl. 3.4.1.1). Für die Detektion und Quantifizierung der amplifizierten Sonden wird bei der PCR einer der beiden Primer in markierter Form eingesetzt. Als Markierung werden z.B. Fluorochrom-gekoppelte oder radioaktiv markierte Nukleotide verwendet, die in die Primersequenz inkorporiert sind. Die quantitative Analyse der amplifizierten Sonden erfolgt bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer über gel- oder kapillarbasierte automatisierte Fluoreszenz-Detektions-Systeme (z.B. ABI Prism 377, ABI Prism 3700) sowie eine spezielle Auswertungssoftware (vgl. 3.4.2.11 und 3.4.3).

Bisher ist es gelungen, bis zu 60 MAPH-Sonden parallel einzusetzen (Akrami et al., 2003). Bei der Verwendung von Gel-basierten Analyseverfahren ist die Zahl gleichzeitig analysierbarer Sonden vom Auflösungsvermögen des Gels abhängig. Bei einem hohen Vernetzungsgrad des Polymers können im Idealfall DNA-Fragmente mit einer Auflösung von einem Basenpaar (bp) aufgetrennt werden. Für eine exakte Identifizierung der Sonden empfehlen sich in der Praxis Längendifferenzen von etwa 3bp zwischen den einzelnen Sonden eines Sets. Bei einer vorgegebenen Sondenlänge zwischen 130 und 500 Basenpaaren und einer Differenz von 3bp zwischen den einzelnen Sonden ergibt sich rechnerisch eine Anzahl von etwa 123 parallel analysierbarer Loci. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei SONDENSETS eingesetzt, wobei das erste Set (Set A) Sonden für 36, das zweite Set (Set B) Sonden für 43 subtelomerische Regionen enthielt.

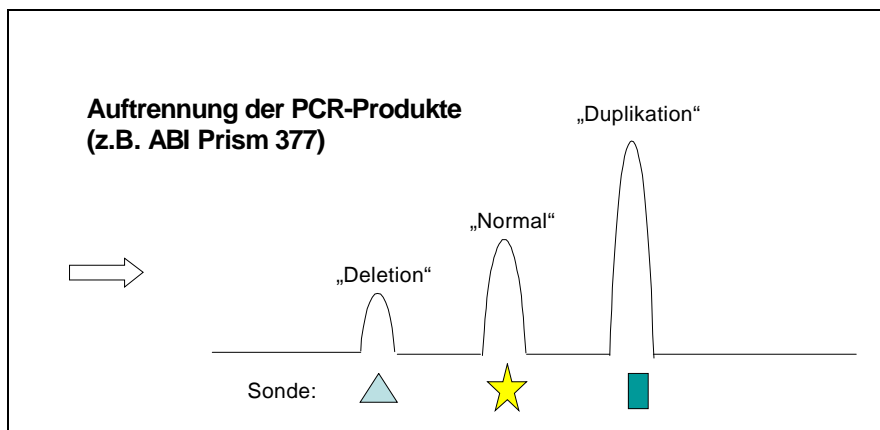
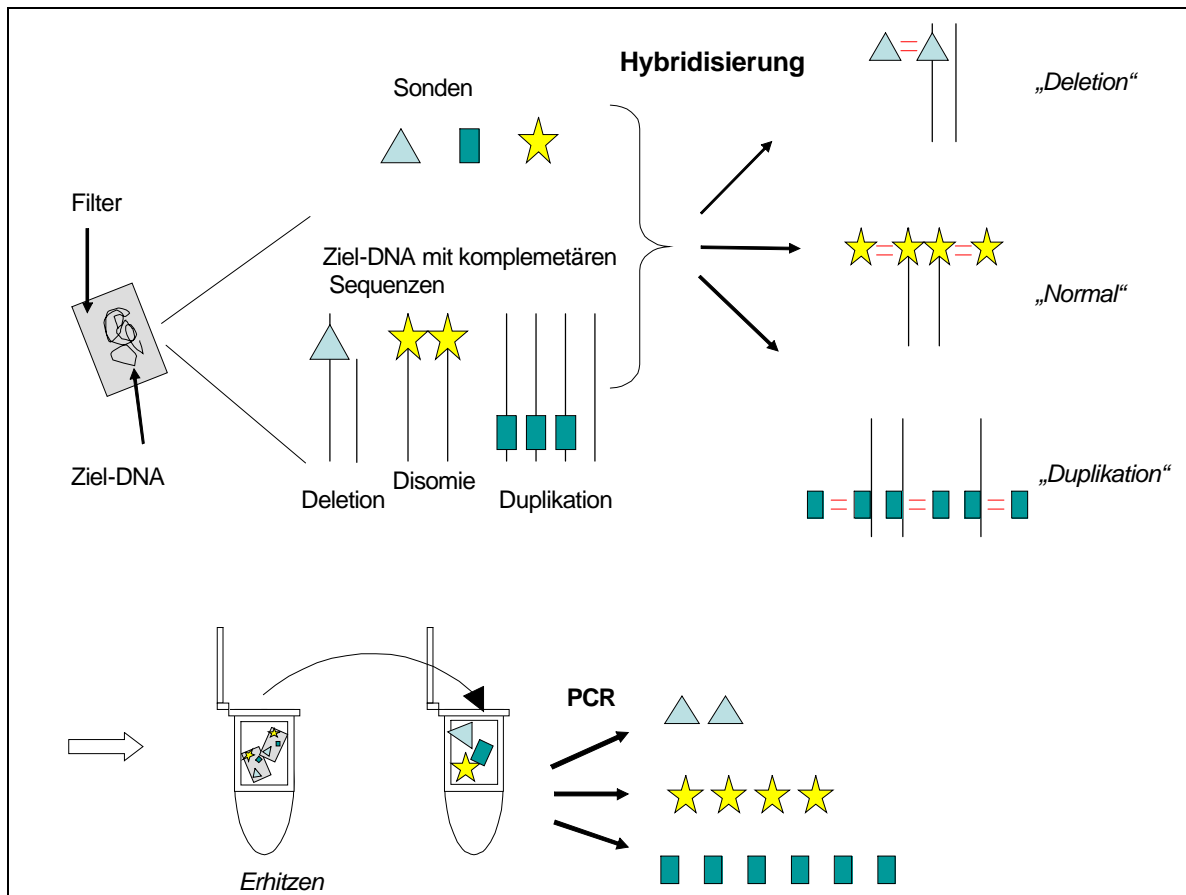


Abbildung 4: Prinzip der MAPH, Erläuterung im Text.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bis (37,5:1) (10% PAA-Gel)	Amresco, 0254
Acrylamid/Bis (29:1) (4,25% PAA-Gel für ABI 377)	BioRad, 161-0121
Agarose	Invitrogen, 15510-027
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat, Merck, 1.01512.0100
Ammoniumacetat	Merck, 1.01116.1000
Antikörperlösung 1	Rabbit $\alpha$ DNP 1:200 in 1xTBS/0,5% Blocking Reagent verdünnen
Antikörperlösung 2	Goat $\alpha$ Rabbit (LaserPro IR790-gekoppelt) bei 13.000 U/min für 3min zentrifugieren, 1:200 in 1xTBS/0,5% Blocking Reagent verdünnen
APS	Sigma, A3678
Bacto-Tryptone	Becton Dickinson, 211705
Bacto-Yeast	Becton Dickinson, 212750
Blockade-Mix (MAPH)	Vorwärts-Primer: 5`-GGC CGC GGG AAT TCG ATT-3` Rückwärts-Primer: 5`-GCC GCG ATT TCA CTA GTG-3`, Metabion, Martinsried, D, Stocklösung je 200pmol/ $\mu$ l; Blockade-Mix: 5 $\mu$ l Vorwärts-Primer + 5 $\mu$ l Rückwärts Primer + 40 $\mu$ l aqua dest. (Endkonzentration der Primer je 20 $\mu$ M)
Blocking Reagent	Roche, 1096176
Bromphenolblau	Merck, 1.59102.0001
BSA	Bovine Serum Albumine, Phamacia Biotech, 27-8915
Chloramphenicol	water-soluble, Sigma, C3175
Citifluor AF1	Plano GmbH, R1320
Cot1-DNA	Human, 1mg/ml, Roche, 1581074
Cy <sup>TM</sup> 3-ULS <sup>®</sup> -labeling kit	Kreatech, ULK102 oder Amersham Biosciences, RPN 3120
Cy <sup>TM</sup> 5-ULS <sup>®</sup> -labeling kit	Kreatech, ULK103 oder Amersham Biosciences, RPN 3121
DAPI-Färbelösung	4`-6`-Diamidino-2-phenylindol, Stocklösung: 10mg/ml, Sigma, D9542; Gebrauchslösung: 80ml TNT + 8 $\mu$ l DAPI
Denaturierungslösung 1	70% Formamid/2xSSC; pH 7,0
Denaturierungslösung 2	60% Formamid/2xSSCp
Dextransulfat	Amersham Biosciences, 17-0340-01
dGreen-Ulysis <sup>®</sup> -labeling kit	Kreatech Diagnostics, ULK301 oder Qbiogene, DLKG 04
DNaseI -Lösung	DNaseI: Roche, 104159, ~2000units/mg; Stammlösung 1mg/ml; Verdünnung zum Gebrauch 1:5000
DNP-Ulysis <sup>®</sup> -labeling kit	Kreatech Diagnostics, ULK003
dNTP	PCR Nucleotide Mix, 10mM, Amersham Biosciences, US77212
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
Fisch-Sperma-DNA	DNA, MB grade aus Fischsperma, 10mg/ml, Roche, 1467140

Fixogum	Marabuwerke GmbH, 290117000
Formaldehyd	37%, Merck, 1.04001.1000
Formamid	Merck, 1.09684.2500, ggf. Entionisierung: Amberlite Typ MB1 Korngröße 20-25, 5g/100ml Formamid, Serva AG, 40701
Glycerol	Sigma, G2025
Goat $\alpha$ rabbit- LaserPro IR790	LaserPro™ IR790 goat anti rabbit IgG, Molecular Probes, L-11044
Harnstoff	BioRad, 161-0731
HCl	Salzsäure, Merck, 1.09057.1000
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure, Merck, 100456.1000
Hybridisierungslösung (FISH)	60% Formamid/2xSSCp/10%Dextransulfat
Hybridisierungslösung (MAPH)	1 $\mu$ l Sonden-Mix + 1 $\mu$ l Cot1-DNA + 1 $\mu$ l Fisch-Sperma-DNA + 1 $\mu$ l Blockade-Mix + 3 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
KOAc	Kaliumacetat, Merck, 1.04820.1000
Kanamycin	GIBCO BRL, 11815-032
Kernlysispuffer	10mM Tris, 400mM NaCl, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,2
Längenstandard	100 bp DNA Ladder, Invitrogen, 15628-019
Ladepuffer	2,5xTBE + 20% Ficoll 400 + 0,1% Bromphenolblau
Large Construct Kit (10)	Qiagen, 12462
LB-Medium	10g Bacto-Tryptone + 5g Bacto-Yeast + 10g NaCl in 1l aqua dest., autoklavieren
Lysispuffer	155mM NH <sub>4</sub> Cl, 10mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1mM EDTA
Mengenstandard	Lambda DNA (0,46 $\mu$ g/ $\mu$ l), Invitrogen, 25250-010
MAPH Rückwärts-Primer	20 $\mu$ M, 5'-GCCGCGATTTCACTAGTG-3', Metabion
MAPH Vorwärts-Primer, FAM-markiert	20 $\mu$ M, 5'-GGCCGCGGGAATTCGATT-3', Metabion
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid, Merck, 8.14733.0500
MgCl <sub>2</sub> 25mM (PCR)	25mM MgCl <sub>2</sub> , Gene Amp®, Applied Biosystems, N808-0161
NaCl	Natriumchlorid, Merck, 1.06404.5000
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat, Merck, 106392.5000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Natriumhydrogenphosphat, Merck, 1.06586.0500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat, Merck, 6346.1000
NaOH	Natriumhydroxid, Merck, 1.06495.1000
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid, Merck, 1.01145.1000
NP-40 (syn. Igepal)	Vysis, 30-804820
NP-Puffer	500mM Tris pH7,5, 5mM MgI, 0,5mg/ml BSA
P1-Lösung	10mM EDTA, pH 8,0
P2-Lösung	0,2M NaOH, 1% SDS
P3-Lösung	50ml 7,5M Kaliumacetat + 23ml Eisessig + 427ml aqua dest.
10xPBS	10x Phosphate Buffered Saline, Roche, 166789
10xPCR-Puffer II	100mM Tris-HCl pH 8,3; 500mM KCl; Gene Amp®, Applied Biosystems, N808-0161
Pepsin	10%, Roche, 108 057
Phenol	gesättigte Lösung, ICN Biomedicals, 802518
Phytohämagglutinin	Phytohämagglutinin, H15, Murex, 30852701
Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen, 12163
Postfixierungslösung	2,7ml 37% Formaldehyd + 97,3ml 1xPBS/50mM MgCl <sub>2</sub>
Prähybridisierungslösung A (MAPH)	280 $\mu$ l 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 720 $\mu$ l 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 700 $\mu$ l 20%SDS + 276 $\mu$ l aqua dest. + 20 $\mu$ l Fisch-Sperma-DNA + 4 $\mu$ l 0,5M EDTA
Prähybridisierungslösung B (MAPH)	250 $\mu$ l Prähybridisierungslösung A + 2,5 $\mu$ l Cot1-DNA
2-Propanol	Isopropanol, Merck 1.09634.2511
Proteinase K	10mg/ml, Merck, 1.07393.0010

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, 28106
Rabbit $\alpha$ DNP	Sigma, D9656
RNase A	20mg/ml, DNase-frei, Roche, 109169
SDS	Natrium-Dodecylsulfat, Serva, 20783
SigmaSpin™ Post Reaktion Purification Kit	Sigma, S5059
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
Taq-Polymerase	AmpliTaq® DNA Polymerase, 5U/ $\mu$ l, Applied Biosystems, N808-0161
TAMRA™-Längenstandard	Gene Scan™-500 TAMRA™-Size Standard, Applied Biosystems, 401733
Taurin	Merck, 8.08616.0005
10xTBE-Puffer	GIBCO BRL, 15581-036
10xTBE (für 4,25% PAA-Gel)	Invitrogen, 15581-044
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
TE <sup>-4</sup>	10mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA (autoklaviert)
TNT	1xTBS/0,05%Tween
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethylenediamine, Amresco, 12018-9
ToTelVysion™	Multi-Colour FISH Probe Panel, Vysis, 33-270000
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Serva, 37190
20xTTE	Tris-Taurin-EDTA, 1,78M Tris, 0,57M Taurin, 0,01M EDTA
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitan-Monolaureate, Sigma, 1379
yeast tRNA	Roche, 109223, 10mg/ml (lösen in 1xSSC)
Waschlösung 1 (FISH)	2xSSC, 0,1% NP-40
Waschlösung 2 (FISH)	0,4xSSC, 0,3%NP-40
Waschlösung 3(FISH)	2xSSC, 0,1%Tween
Waschlösung 4 (FISH)	50%Formamid/2xSSC pH 7,0
Waschlösung 5 (FISH)	0,1xSSC
Waschlösung A (MAPH)	1xSSC, 1% SDS
Waschlösung B (MAPH)	0,1xSSC, 0,1% SDS

### 3.1.2 Geräte und Zubehör

Brutschrank	B6060, Heraeus
Elektrophoresegeräte	Multigel-Long-Gelkammer, Biometra
	Max Submarine Agarose Gel Unit, Model HE, Hoefer Scientific
Elektrophoresezubehör	Gelträger , 22-Zahn-Kämme, Amersham Phamacia Biotech
Filter	AHF-Analysetechnik
Fluoreszenz-Detektions-System/ Sequenziergerät	ABI®Prism377, Applied Biosystems
Geldokumentation	Intas-UV-Systeme
Geltrockner	Model 583, Gel Dryer, Bio-Rad
Kamera	Sensys-CCD, Photometrics
Magnetrührer mit Heizvorrichtung	BibbyStuart, Bibby Sterlin
Mikroskop	Axioplan, Zeiss
Nylon-Filter	Hybond™, Amersham Biosciences
Photometer	RNA/DNA Calculator, Gene Quant Pro, Amersham

	Pharmacia Biotech
Reagenzglasschüttler	MELB 1719, Merck eurolab
Rotoren	GSA-Rotor, 6 x 250, Sorvall
	SS34-Rotor, 8 x 50, Sorvall
Spannungsgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 200, Amersham Pharmacia Biotech
Schüttelgerät	IKA®KS 260 basic
Schüttelinkubator	Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
Stratalinker	GS Gene linker™ UV chamber, Bio Rad
Thermocycler	GeneAmp®PCR-System 9700, Applied Biosystems
	PTC-200, Eppendorf
Thermomixer	Comfort, Eppendorf
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand
Waage	A120S, Satorius analytic
Wasserbad	WB22 mit Schüttelvorrichtung, Memmert
Zentrifugen	Megafuge, Heraeus
	Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf
	Ultrazentrifuge, RC 5B Plus, Sorvall
Zentrifugiergefäße	250ml, Polyethylen Oak Ridge Bottle, Sorvall
	50ml, Polyethylen Oak Ridge Bottle, Sorvall

### 3.2 Untersuchungskollektiv

Die in der vorliegenden Arbeit vergleichend angewandten Techniken zur Analyse der subtelomerischen Chromosomenregionen beziehen sich auf ein Gesamtkollektiv von 76 Patienten mit MR. Das Kollektiv wurde im Rahmen des Projektes „Untersuchung von Patienten mit mentaler Retardierung auf kryptische subtelomerische Chromosomenaberrationen durch COBRA-Multi-Colour-FISH“ (DFG, PR131/19-1) rekrutiert und charakterisiert. Bekannte Ursachen der MR wie konventionell diagnostizierbare Chromosomenaberrationen, FraX-Syndrom, Stoffwechselkrankheiten und andere Syndrome monogener Genese sowie exogene Noxen waren weitgehend ausgeschlossen. Von allen Patienten lagen normale Chromosomenbefunde mit einer Auflösung von mindestens 400 Banden pro haploidem Genom vor. Es standen aus peripherem Blut präparierte Metaphasen sowie extrahierte DNA-Proben der Patienten zur Verfügung.

#### 3.2.1 FISH-Kollektiv

Für den methodischen Vergleich der FISH-Techniken wurden 66 Patienten des Bonner MR-Kollektivs untersucht. Dabei kamen das ToTelVysion-System bei 39, die Sechs-Farben-FISH bei 19 und die S-COBRA-FISH bei 17 Probanden zum Einsatz. Neun Fälle wurden sowohl durch das ToTelVysion-System als auch durch S-COBRA-FISH analysiert.

Unter Verwendung der FISH-Techniken wurden bei insgesamt sechs Fällen Aberrationen der Subtelomere detektiert, bei einem Fall konnte eine Heterochromatin-Variante des langen Arms des Y-Chromosoms nachgewiesen werden (Tabelle 2). Fünf dieser Aberrationen wurden unter Verwendung des ToTelVysion Probe Panels (Vysis) detektiert, zwei dieser

Fälle wurden als Positivkontrollen zur Etablierung der S-COBRA-FISH eingesetzt (vgl. Tabelle 3). Eine subtelomerische Aberration sowie der oben genannte Polymorphismus am langen Arm des Y-Chromosoms wurden mit dem eigenen Sondenset durch Sechs-Farben-FISH detektiert. Sämtliche nachgewiesenen Subtelomerstörungen (n=7) wurden durch jeweils eine weitere FISH-Technik verifiziert.

Fall	Subtelomer-Aberration
1 (TCI) <sup>1**</sup>	del(14)(q32.31)
2 (MM) <sup>2**</sup>	der(2)t(2;5)(q37.3;p15)
3 (JG) <sup>1*;**</sup>	del(2)(q37.3)
4 (JH) <sup>1**</sup>	der(22)t(7q;22q)(q36.3; q13.33)
5 (KA) <sup>1**</sup>	del(16)(p13.3)
6 (DL) <sup>1*</sup>	der(11)t(11;16)(q24.2;q24.1)
7 (GW) <sup>2**</sup>	del(Y)(q12)

Tabelle 2: Subtelomeraberrationen: <sup>1</sup>Detektion durch ToTelVysion-System; <sup>2</sup>Detektion durch Sechs-Farben-FISH; *kursiv*: Polymorphismus; Positivkontrolle für S-COBRA-FISH<sup>†</sup> bzw. Subtelomer-MAPH<sup>\*\*</sup> (s.u.).

### 3.2.1.1 Analyisierte Fälle zur Erprobung der S-COBRA-FISH

Im Rahmen der Erprobung der S-COBRA-FISH zur Detektion von Subtelomeraberrationen wurden insgesamt 17 Fälle untersucht. Bei sieben Fällen handelte es sich um Negativkontrollen, bei denen eine Aberration der Subtelomere zuvor durch herkömmliche FISH ausgeschlossen worden war.

Zehn Fälle mit nachgewiesenen subtelomerischen Rearrangements wurden als Positivkontrollen herangezogen (Tabelle 3).

Fall	Information vor Analyse durch S-COBRA-FISH
1 <sup>1</sup>	kryptische subtelomerische Chr.-Aberration
2a <sup>2</sup>	bekannte unbalancierte Translokation: der(11)t(11;16)(q25;q24)
2b <sup>1</sup>	bekannte balancierte Translokation: t(11;16)(q25;q24); (Mutter von 2a)
3 <sup>1</sup>	unbekanntes Material in 4q35: der(4)add(4)(q35)
4 <sup>1</sup>	kryptische subtelomerische Chr.-Aberration
5 <sup>1</sup>	bekannte balancierte Translokation: t(1;16)(p36;p13.3)
6 <sup>1</sup>	kryptische subtelomerische Chr.-Aberration
7 <sup>2</sup>	bekannte Deletion: del(2)(q37.3)
8 <sup>1</sup>	kryptische subtelomerische Chr.-Aberration
9 <sup>1</sup>	unbekanntes Material in 1p terminal: der(1)add(1)(p36)

Tabelle 3: Positivkontrollen zur Erprobung der S-COBRA-FISH; <sup>1</sup>aus externem Institut; <sup>2</sup>aus Bonner MR-Kollektiv. Chr.-Aberration: Chromosomenaberration.

Acht dieser Fälle wurden zur Erprobung der Methode von externen Instituten zur Verfügung gestellt. Sechs Positivkontrollen dienten als komplette Blinduntersuchungen: in vier Fällen waren weder der Typ der Aberration noch die beteiligten Chromosomen bekannt, in zwei Fällen sollte zuvor nachgewiesenes zusätzliches Chromosomenmaterial durch S-COBRA-FISH identifiziert werden. Bei den übrigen vier Fällen war die vorliegende Subtelomeraberration bekannt.

### 3.2.2 MAPH-Kollektiv

Zur Etablierung der Subtelomer-MAPH wurden insgesamt 76 Patienten (48 männliche und 28 weibliche Patienten) des Bonner MR-Kollektivs herangezogen. Die Fälle konnten drei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Tabelle 4).

Gruppe des MAPH-Kollektivs	Anzahl der Fälle
Retrospektiv analysierte Fälle ohne bekannte Aberrationen (Negativkontrollen)	n=59
Retrospektiv analysierte Fälle mit bekannten Aberrationen (Positivkontrollen)	n=7
Prospektiv analysierte Fälle, Ergebnis unabhängiger Subtelomeranalysen unbekannt	n=10
Summe	n=76

Tabelle 4: Gliederung des MAPH-Kollektivs.

Die erste Gruppe umfasste 59 Patienten, bei denen durch FISH (n=56) bzw. durch Subtelomer-MAPH (LUMC, Leiden) (n=13) das Vorliegen von Subtelomeraberrationen bereits ausgeschlossen worden war. Zehn Fälle waren durch beide Techniken analysiert worden. Diese retrospektiv analysierten Patienten dienten als Negativkontrollen, anhand derer der Anteil falsch-positiver MAPH-Ergebnisse bestimmt werden sollte.

Die zweite Gruppe setzte sich aus sieben Positivkontrollen zusammen (Tabelle 5). Bei fünf Positivkontrollen wurde im Vorfeld eine Aberration der Subtelomere durch FISH nachgewiesen. Bei zwei Kontrollfällen lagen Polymorphismen vor, von denen einer durch FISH (Fall 6), der andere der durch Subtelomer-MAPH (Fall 7) (LUMC, Leiden) detektiert wurde. Die Analyse dieser Fälle mit bekannten Subtelomeraberrationen diente der Bestimmung der Falsch-Negativ-Rate der MAPH.

Die dritte Gruppe des MAPH-Kollektivs umfasste zehn Patienten, die prospektiv durch Subtelomer-MAPH analysiert wurden. Für diese Patienten lagen zum Untersuchungszeitpunkt keine Ergebnisse unabhängiger Subtelomeranalysen durch FISH oder MAPH vor.

Fall	bekannte Subtelomeraberration
1 (TCI) <sup>1</sup>	del(14)(q32.31)
2 (MM) <sup>2</sup>	der(2)t(2;5)(q37.3;p15)
3 (JG) <sup>1</sup>	del(2)(q37.3)
4 (JH) <sup>1</sup>	der(22)t(7;22)(q36.3; q13.33)
5 (KA) <sup>1</sup>	del(16)(p13.3)
6 (GW) <sup>2;4</sup>	<i>del(Y)(q12)</i>
7 (SL) <sup>3;4</sup>	<i>dup(8)(q24.3)</i>

Tabelle 5: Positivkontrollen zur Erprobung der Subtelomer-MAPH; <sup>1</sup>Detektion durch ToTelVysion-System; <sup>2</sup>Detektion durch Sechs-Farben-FISH; <sup>3</sup>Detektion durch Subtelomer-MAPH (LUMC); <sup>4</sup>Polymorphismus (kursiv).

### 3.2.3 Analysiertes Zellsystem

Als Untersuchungsmaterial dienten in der vorliegenden Arbeit Zellen des peripheren venösen Blutes. Für die konventionell-cytogenetischen Analysen sowie die FISH-Analysen wurden Meta- und Interphasestadien kultivierter Lymphocyten präpariert. Die Anzucht der Lymphocyten erfolgte in Gewebekulturflaschen bei 37°C über 72 Stunden unter Einfluss des Mitogens Phytohämagglutinin, welches selektiv die klonale Proliferation von T-Lymphocyten induziert. Die Aufarbeitung und Präparation der Zellen wurde nach Standardverfahren durchgeführt (Ed. R.-D. Wegner, 1999). Für die molekulargenetischen MAPH-Analysen wurde DNA aus Leukocyten nach der nicht-toxischen Aussalzmethode isoliert (vgl. 3.4.2.2).

### 3.3 FISH

Die in situ-Hybridisierung basiert auf der Eigenschaft einzelsträngiger Nukleinsäuren, sich über die Basenpaarungen Guanin-Cytosin (G-C) und Adenin-Thymin (A-T) mit komplementären Sequenzen zusammenzulagern (zu „hybridisieren“). Dabei werden markierte Nukleinsäuresonden und genomische Ziel-DNA zunächst durch Denaturierung in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend werden die Sonden- und Ziel-DNA zusammengebracht, so dass die Hybridisierung komplementärer Sequenzen erfolgen kann. Die Reaktionsbedingungen, d.h. die Hybridisierungstemperatur sowie Zusammensetzung des Milieus müssen dabei so gewählt werden, dass sich möglichst viele Heteroduplices aus Sonde- und Ziel-DNA bilden und der Anteil von Sonde-Sonde- bzw. Ziel-Ziel-Homoduplices möglichst gering ist.

Die Temperatur, bei der eine Hybridisierung optimal erfolgt, wird über die Schmelztemperatur  $T_m$  von DNA-Doppelsträngen bestimmt. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der die Hälfte einer doppelsträngigen DNA unter festgelegten Bedingungen in Einzelstränge dissoziiert oder „schmilzt“. Sie ist ein Maß für die Stabilität von DNA-Doppelsträngen: Je stabiler eine Doppelhelix ist, desto mehr Energie wird zur Denaturierung benötigt und desto

höher liegt  $T_m$ . Folgende Faktoren bestimmen diese entscheidende Eigenschaft von Nukleinsäurehybriden:

#### Stranglänge

Je länger ein DNA-Fragment ist, desto mehr Wasserstoffbrückenbindungen werden ausgebildet und desto stabiler ist der DNA-Strang.  $T_m$  steigt demnach mit zunehmender Stranglänge.

#### Basenzusammensetzung

Da GC-Basenpaarungen drei, AT-Basenpaarungen dagegen nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, steigt  $T_m$  mit wachsendem GC-Gehalt.

#### Reaktionsmilieu

In Hybridisierungs- und Waschlösungen sind in der Regel monovalente Kationen und Formamid enthalten. Monovalente Kationen stabilisieren DNA-Doppelstränge durch Ladungsausgleich der negativen Phosphatgruppen. Damit erhöhen sie die Schmelztemperatur. Formamid hingegen setzt die Schmelztemperatur herab. Es hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, indem es als unspezifischer Donor und Akzeptor dieser Bindungen wirkt.

Als Faustregel für die FISH gilt, dass die optimale Hybridisierungstemperatur bis zu 25°C unter der Schmelztemperatur liegt. Für menschliche DNA beträgt die Schmelztemperatur im annähernd physiologischen Milieu etwa 87°C. Die daraus resultierende Hybridisierungstemperatur liegt in Bereichen, welche die Aufrechterhaltung der Zell- und Chromosomenmorphologie nicht gewährleisten würden. Ein Formamidgehalt von 50% kann die Schmelztemperatur und damit die Hybridisierungstemperatur absenken und dadurch eine Hybridisierung bei 30-45°C ermöglichen. Zur Erhöhung der Geschwindigkeit einer Hybridisierung wird dem Reaktionsansatz meist Dextransulfat zugegeben. Dieses hochmolekulare Polyanion bildet eine Matrix in der Hybridisierungslösung und führt dadurch zu einer lokalen Erhöhung der Sondenkonzentration.

Die Stringenz, bei der eine Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt über die Paarungsgenauigkeit, d.h. den Anteil korrekt gepaarter Nukleotide in den entstehenden Heteroduplices. Um das Ziel einer Hybridisierung, die Bildung eines hohen Anteils an Sonden-Ziel-Heteroduplices bei gleichzeitiger Verhinderung von Sondenfehlpaarungen, zu erreichen, muss ein optimaler Stringenzbereich gewählt werden. Dieser kann über die Faktoren Temperatur sowie Salz- und Formamidkonzentration eingestellt werden. Da eine perfekte Paarung von Sonden- und Ziel-DNA in der Praxis nicht erreicht wird, werden im Anschluss an die Hybridisierung stringente Waschschriffe zur Entfernung fehlgepaarter und überschüssiger Sondenanteile durchgeführt. Auf diese Weise werden unspezifische Signale verhindert.



### 3.3.1 Subtelomer-FISH mit dem ToTelVysion Multi-Colour Probe Panel (Vysis)

Das ToTelVysion Multi-Colour Probe Panel (Vysis) wurde bei 39 Fällen zur Analyse der subtelomerischen Chromosomenregionen eingesetzt.

#### 3.3.1.1 Kommerzielles Sonden-Set (ToTelVysion)

Das kommerzielle Sondenset (ToTelVysion Multi-Colour Probe Panel) der Firma Vysis umfasste insgesamt 51 DNA-Sonden. 41 dieser Sonden waren spezifisch für die eukaryotischen Subtelomerregionen der menschlichen Chromosomen, wobei die Subtelomerregionen der Chromosomen X und Y aufgrund der Sequenzhomologien der pseudoautosomalen Regionen in Xpter und Ypter bzw. Xqter und Yqter jeweils durch eine Sonde abgedeckt wurden. Die übrigen zehn Sonden waren nicht subtelomerisch lokalisiert und dienten der einfacheren Identifizierung der Chromosomen.

Die Subtelomersonden umfassten 60 bis 191kb und enthielten laut Herstellerangaben Loci, die höchstens 300kb vom Chromosomenende entfernt lagen. In Tabelle 22 (Anhang) sind die verwendeten Sonden unter Angabe ihrer Markierung und Größe sowie ihrer Kombination in den einzelnen Hybridisierungsansätzen aufgeführt. Zudem sind die jeweils in der Sondensequenz enthaltenen Marker angegeben.

Im Rahmen der eigenen Arbeiten wurden die exakten Sondenlokalisationen durch *in silico*-Analysen mithilfe der UCSC- und NCBI-Genome Browser bestimmt (<http://www.genome.ucsc.edu>, freeze Juli 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>) (vgl. 4.3). Die ermittelten Daten sind ebenfalls in Tabelle 22 zusammengestellt.

#### 3.3.1.2 Durchführung

Für die Analyse aller 43 Subtelomerregionen mit dem ToTelVysion-System waren 15 Hybridisierungen erforderlich. Voraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens waren demnach Lymphocytenpräparate, die insgesamt 15 Hybridisierungsareale von je 12mm Durchmesser und mindestens 12-15 gut gespreiteten Metaphasen aufwiesen. Die Herstellung der Metaphasepräparate erfolgte nach Standardprotokollen (vgl. 3.2.3). Die Hybridisierungsareale wurden auf der Unterseite der Objektträger mit einem Glasschneider markiert.

##### 3.3.1.2.1 Enzymatische Vorbehandlung der Präparate

Die Qualität einer Hybridisierung kann durch eine enzymatische Vorbehandlung der Präparate verbessert werden. Durch eine Behandlung mit RNase A wird einzelsträngige RNA abgebaut, so dass unspezifische Hybridisierungen der Sonden-DNA verhindert werden. Ein Verdau mit proteolytischen Enzymen entfernt Membran- und Proteinreste und bewirkt so

ein leichteres Vordringen der Sonden-DNA zu den Zielsequenzen. Zum Erhalt der Chromosomenmorphologie wird im Anschluss an eine Vorbehandlung eine Fixierung mit vernetzenden Molekülen wie Formaldehyd durchgeführt.

In den eigenen Versuchen wurden zur Erhöhung der Hybridisierungseffizienz alle Präparate enzymatisch vorbehandelt.

- Präparate nach Inkubation in 70% Ethanol lufttrocknen
- Je 100µl RNase A (1:200 in 2xSSC verdünnt) auf Objektträger (OT) pipettieren, 24x60mm-Deckglas (DG) auflegen
- Inkubation bei 37°C für 10min
- DG entfernen, 2x5min waschen mit 2xSSC bei Raumtemperatur (RT)
- Inkubation bei 37°C für 10min in vorgewärmter Pepsinlösung (50µg Pepsin/0,01M HCl)
- 2x5min waschen mit 1xPBS (RT)
- Postfixierung für 10min in Postfixierungslösung
- 2x5min waschen mit 1xPBS (RT)
- Aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, Ethanol absolut), je 3min (RT)
- OT lufttrocknen

### 3.3.1.2.2 Denaturierung und Hybridisierung

Die Denaturierung und Hybridisierung erfolgten mit leichten Abweichungen vom Protokoll des Herstellers.

#### Denaturierung der Objektträger

- Denaturierung der OT bei 75°C für 3min in Denaturierungslösung 1
- Inkubation der OT bei 4°C in 2xSSC für 1-2min
- Aufsteigende Ethanolreihe (70% (-20°C), 90% und Ethanol absolut bei RT; je 3min)
- OT lufttrocknen

#### Denaturierung der Sonden

- Je 1,5µl Sonde (Ansatz 1-15) in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführen
- Denaturierung bei 75°C für 5min

#### Hybridisierung

- Je 1,5µl Sonde auf die entsprechend markierten Regionen der OT auftragen
- Deckglas (Ø 12mm) auflegen und mit Fixogum versiegeln
- Inkubation über Nacht (ÜN) bei 37°C in feuchter Kammer (Brutschrank)

### 3.3.1.2.3 Stringente Waschschritte

Zur Entfernung fehlgepaarter und überschüssiger Sondenanteile wurden im Anschluss an die Hybridisierung stringente Waschschritte durchgeführt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Waschlösungen zu erzielen, erfolgten die folgenden Schritte unter ständigem Schütteln.

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

#### **3.3.1.2.4 Gegenfärbung**

Die Gegenfärbung dient der Visualisierung und Identifikation der Chromosomen. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) verwendet. Dieser interkaliert in die DNA und erzeugt aufgrund seiner hohen Affinität zu AT-Sequenzen eine Chromosomenbänderung, die invertiert etwa der G-Bänderung nach Trypsinverdau und Giemsa-Färbung entspricht.

- Inkubation für 8min in 80ml DAPI-Färbelösung, schütteln
- OT 3x mit aqua dest. spülen
- Aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, Ethanol absolut), je 3min inkubieren
- OT lufttrocknen
- Etwa 40µl Citifluor auf OT pipettieren, mit 24x60mm-Deckglas luftblasenfrei eindecken
- OT durch Trockenblock ziehen

#### **3.3.1.3 Auswertung und Dokumentation**

Die mikroskopische Auswertung und die Dokumentation erfolgten an einem motorisierten Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan) der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) über eine Charged Coupled Device-Kamera (Sensys-CCD, Photometrics, Tucson, AZ) und die FISH-Software Cytovision 2.81 der Firma Applied Imaging (New Castle upon Tyne, UK). Das Mikroskop war mit einem computergesteuerten Filterblock mit Excitations- und Emissionsfiltern der Firma AHF-Analysetechnik (Tübingen, Deutschland) ausgestattet. Zur Visualisierung der jeweiligen Fluorochrome wurden die folgenden Filter verwendet:

SpectrumGreen: HQ-Filterset für Cy2, F41-054

SpectrumOrange: HQ-Filterset für Cy3, F41-007

SpectrumAqua: HQ-Filterset für DEAC, F31-036

DAPI: MC-0 (DAPI)-Filterset, F36-670

Für jede Metaphase wurde jeweils eine Sequenz von Bildern mit den spezifischen Filtern aufgenommen. Über die Computersoftware wurden den verwendeten Fluorochromen Falschfarben zugeordnet: SpectrumGreen=grün, SpectrumOrange=rot, Spectrum Aqua=dunkelblau, DAPI=marineblau. Die Einzelbilder wurden übereinander gelegt, so dass die mit SpectrumGreen und SpectrumOrange markierten Sonden in der Mischfarbe „gelb“ dargestellt wurden. Für jeden Fall wurden pro Hybridisierung mindestens sechs Metaphasen dokumentiert.

### 3.3.2 „Eigenes Sondenset“: Sondenauswahl und Charakterisierung

Für die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und die S-COBRA-FISH wurde ein eigenes Set subtelomerischer Sonden zusammengestellt. Mit Ausnahme der Sonde für 19q wurden alle Klone aus dem „second generation probe panel“ nach Knight et al. (2000) ausgewählt und getestet. Ein großer Teil der Sonden wurde dabei in Form von Glycerolstocks von Flint, Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, zur Verfügung gestellt. Die Klone für 8pter, 9qter, 11pter, 14qter, 15qter und 17qter wurden von Incyte Genomics (Palo Alto, CA, USA) und der Klon für Xpter/Ypter von CHORI BACPAC Resources (Oakland, CA, USA) bezogen. Der BAC-Klon RP11-420P11 für 19qter wurde von Drechsler, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Die Auswahl und Charakterisierung der verschiedenen Sonden erfolgte überwiegend durch den Projektleiter am LUMC in Leiden. Im Rahmen der eigenen Arbeit wurden 16 Klone für fünf Subtelomere ausgetestet. Jeder Klon wurde als Sonde in Zwei- oder Drei-Farb-Hybridisierungen („Locus checks“) bezüglich seiner Lokalisation, dem Vorhandensein von subtelomerischen Kreuzhybridisierungen und der Signalstärke charakterisiert. Zur Isolation, Markierung und Hybridisierung wurden dabei die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Techniken angewandt. Sonden falscher Lokalisation sowie Sonden mit Kreuzhybridisierungen und schwachen Hybridisierungssignalen wurden nicht in das Sondenset übernommen. Neben Kreuzhybridisierungen, deren Ursache in der Sequenzhomologie verschiedener Subtelomere liegt (vgl. 2.1), wurden für einige Subtelomere benigne Deletions-Polymorphismen z.B. der Subtelomerregionen von 2q, 7p, 16p, 17p und XpYp beschrieben (Knight und Flint, 2000; Martin et al., 2002; van Karnebeek et al., 2002; Jalal et al., 2003). Diese sind auf eine variable Länge der Zielregion, mit der die entsprechende Sonde hybridisiert, zurückzuführen. Sonden, für deren Zielregion Polymorphismen beschrieben waren, wurden gegen andere Sonden des „second generation probe panel“ (Knight et al., 2000) ausgetauscht. Für einige Subtelomerregionen standen mehrere Klone mit guten Hybridisierungseigenschaften zur Verfügung. Hier wurde jeweils der dem Telomer am nächsten liegende spezifische Klon ausgewählt. Allgemein kamen BAC bzw. PAC-Klone als Sonden zum Einsatz, da diese mit 100-200kb im Vergleich zu Cosmiden (35-40kb) größere Inserts und damit stärkere Hybridisierungssignale aufweisen.

Nach den beschriebenen Kriterien wurde ein komplettes Sondenset aus 41 BAC bzw. PAC-Klonen für die 43 relevanten euchromatischen Subtelomerregionen des menschlichen Chromosomensatzes zusammengestellt (vgl. Tabelle 23 im Anhang). Sonden für die p-Arme der fünf akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 waren nicht enthalten, da Aberrationen dieser DNA-Sequenzen keine phänotypische Relevanz haben. Die Subtelomere der kurzen bzw. langen Arme der Chromosomen X und Y wurden aufgrund der Sequenzhomologien zwischen Xpter und Ypter bzw. Xqter und Yqter jeweils durch eine

Sonde abgedeckt. Die Subtelomersonden waren zwischen 100 und 200kb groß. Ihre Distanz vom Telomer wurde durch in silico-Analysen mittels der UCSC- und NCBI-Genome Browser bestimmt, sie lagen durchschnittlich 320kb vom Telomer entfernt (vgl. 4.3).

Die Hybridisierungseffizienzen der einzelnen Sonden wurde in Zwei bzw. Drei-Farb-Experimenten im Rahmen der Etablierung der S-COBRA-FISH bestimmt. Für die Mehrzahl der Sonden lag diese über 95%.

Für die Sechs-Farben-FISH kamen zusätzlich zu den Subtelomersonden noch Sonden zur Identifikation der akrozentrischen Chromosomen zum Einsatz (Tabelle 24 im Anhang). Diese waren jeweils proximal im q-Arm lokalisiert und wurden anhand der genomischen Datenbank Ensembl Human Genome Browser (<http://www.ensembl.org/Homo-sapiens/>) ausgewählt.

### **3.3.3 Subtelomer-Sechs-Farben-FISH**

Die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH wurde zur Untersuchung der Subtelomerregionen bei insgesamt 19 Fällen angewandt.

#### **3.3.3.1 Prinzip der Zusammenstellung der Sonden**

Im Rahmen des bereits genannten DFG-Projektes wurde die Sechs-Farben-FISH in der Diplomarbeit „Untersuchung der Rolle subtelomerischer Chromosomenaberrationen bei der Entstehung von Spontanaborten“ (Hoischen, 2003) etabliert. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der subtelomerischen Chromosomenregionen aus Lymphocyten zugrunde gelegt und für dieses Zellsystem optimiert. Während die Zusammenstellung der einzelnen Hybridisierungsansätze (A-G) übernommen wurde, wurden hinsichtlich der eingesetzten DNA-Mengen einzelner Sonden leichte Modifikationen durchgeführt (Tabelle 6). Die Sonden der einzelnen Hybridisierungsansätze wurden nach folgenden Kriterien kombiniert.

- Die in einer Hybridisierung eingesetzten Sonden sollten eine ähnliche Hybridisierungseffizienz und Signalstärke aufweisen. Dies wurde durch Anpassung der Gesamtmenge der einzelnen Sonden-DNAs erreicht.
- Parallel in einer Hybridisierung untersuchte Chromosomen sollten morphologisch gut unterscheidbar sein.
- Sonden für den p- und q-Arm eines Chromosoms wurden in einer Hybridisierung eingesetzt, um die Identifizierung der Chromosomen zu erleichtern.
- Die Subtelomersonden der fünf akrozentrischen Chromosomen wurden parallel eingesetzt und zur eindeutigen Identifizierung zusätzlich mit spezifischen centromernahen Sonden kombiniert. Dieser Hybridisierungsansatz umfasste daher insgesamt zehn Sonden.

Sonde	DNA-Menge (ng)	dGreen-ULS in ng (%)	Cy3-ULS in ng (%)	Cy5-ULS in ng (%)
<b>Hybridisierung A</b>				
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)	
<b>Hybridisierung B</b>				
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)	
<b>Hybridisierung C</b>				
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)	
<b>Hybridisierung D</b>				
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)	
<b>Hybridisierung E</b>				
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)	
<b>Hybridisierung F</b>				
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)	
<b>Hybridisierung G</b>				
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 6: Markierungsschemata der Sechs-Farben-FISH mit Angabe der absoluten DNA-Mengen (ng) und der Farbmischungsverhältnisse (%).

Ausgehend von einer DNA-Menge von 200ng, die pro Hybridisierungsansatz für jede Sonde verwendet wurde, wurde in den zur Etablierung durchgeführten Versuchsreihen die optimale Sondenmenge für jede Sonde bestimmt. In Abhängigkeit von der Signalintensität und Signalgröße wurde dabei die Sondenmenge sukzessiv erhöht bzw. erniedrigt. Die eindeutige visuelle Unterscheidung aller Sonden einer Hybridisierung erforderte, abweichend vom theoretischen 50% zu 50% Mischungsverhältnis einer kombinatorischen Markierung, eine Anpassung der verschiedenen markierten DNA-Anteile der in Mischfarben dargestellten Sonden. In der Praxis ergaben sich dem entsprechend auch Mischungsverhältnisse von 60% zu 40% (vgl. Tabelle 6, z.B Sonde 9p oder 4q).

### 3.3.3.2 Durchführung

#### 3.3.3.2.1 DNA-Isolierung aus BAC- und PAC-Klonen

Die Multi-Colour-FISH-Techniken, bei denen mehr als drei Sonden in einer Hybridisierung gleichzeitig dargestellt werden, erfordern Sonden-DNA höchster Qualität. Jede zusätzlich verwendete Sonde einer Hybridisierung kann Kreuzhybridisierungen sowie unerwünschte Hintergrundmarkierungen in die Hybridisierung einbringen. Um diese Effekte gering zu halten, sollte die Sonden-DNA frei von bakterieller genomischer DNA, Proteinanteilen und Salzen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur DNA-Isolation ausgetestet, darunter das Plasmid-Maxi-Kit und das Large Construct-Kit der Firma Qiagen sowie die *cleared lysate*-Methode mit doppelter Acetatfällung (Bruce Roe, University of Oklahoma; [www.genome.ou.edu/DbIAcetateProcV3.html](http://www.genome.ou.edu/DbIAcetateProcV3.html)). Die Isolation mit dem Qiagen Large Construct Kit kam aufgrund zu geringer DNA-Ausbeute nicht zum Einsatz. Die mithilfe der anderen Methoden isolierten Sonden wurden in Testhybridisierungen mit steigenden Sondenanzahlen pro Hybridisierung eingesetzt. Dabei erbrachten diejenigen Sonden, die mittels der *cleared lysate*-Methode isoliert wurden, in Mehrfarben-Experimenten die besten Hybridisierungsergebnisse. Die *cleared lysate*-Methode wurde daher für die Isolation des gesamten Subtelomer-Sondensets eingesetzt. Sie ermöglicht durch zweifache Acetatfällung und darauf folgende Einfrierschritte sowie eine doppelte Phenol-Extraktion die Isolation hochreiner DNA, die weitgehend frei ist von unerwünschter bakterieller DNA. Nachteilig bei dieser Methode sind jedoch der mit 2-6µg DNA aus 250ml-Kulturen geringe Ertrag sowie ein hoher zeitlicher Aufwand. Als Ergänzung zur DNA-Isolation wurde daher versucht, die Sonden-DNA durch DOP-PCR zu amplifizieren (Telenius et al., 1992). Nach Hybridisierung zeigten so gewonnene Sonden starke Kreuzhybridisierungen und Hintergrund, so dass auch diese Methode nicht zum Einsatz kam.

Die Klone wurden als Bakterien-Glycerolstocks (25% Glycerol/25% H<sub>2</sub>O/50% LB-Medium) bei -70°C gelagert. Es handelte sich um BAC- und PAC-Klone, wobei BAC-Klone den transfizierten *E-coli*-Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol,

PAC-Klone gegen Kanamycin verliehen. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 250ml unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums selektiv vermehrt (Chloramphenicol 12,5µg/ml LB-Medium, Kanamycin 25µg/ml LB-Medium).

#### Durchführung:

- 3ml LB-Medium mit ca. 1µl Bakterien-Glycerolstock-Lösung animpfen
- Inkubation der Vorkultur bei 37°C und 250U/min für 6-7h
- 1l-Kulturkolben mit je 250ml LB-Medium befüllen, mit 40-80µl (je nach Zelldichte) der Vorkultur animpfen
- Inkubation bei 37°C und 250U/min ÜN
- Überführen der Zellsuspension in 250ml-Gefäße
- Zentrifugieren bei 5000U/min und 4°C für 15min (Ultrazentrifuge; GSA-Rotor)
- Überstand verwerfen, Sediment für mindestens 2h bei -70°C einfrieren
- Zellsediment auftauen
- Zugabe von 10ml P1-Lösung, mit Einmalplastikpipette durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren
- Inkubation für 5min bei RT
- Zugabe von 20ml P2-Lösung, Gefäße verschließen, ca. 8-10x invertieren
- Inkubation für 5min bei RT
- Zugabe von 15ml P3-Lösung (4°C), Gefäße verschließen, ca. 8-10x invertieren
- Inkubation bei -20°C ÜN
- Lösung auftauen, Zentrifugation bei 10.000U/min und 4°C für 15min
- Überstand in neue 250ml Gefäße überführen, Zentrifugation bei 10.000U/min und 4°C für 15min
- Überstand durch Gaze in neue 250ml-Gefäße überführen
- DNA-Fällung durch Zugabe von 1x Gesamtvolumen 2-Propanol
- Zentrifugation bei 5.000U/min und 4°C für 15min
- Überstand vorsichtig abgießen, DNA-Pellets antrocknen lassen
- Zugabe von 4,5ml 10:50 TE-Puffer, DNA-Pellets bei 37°C lösen
- Lösung in 50ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Zugabe von 2,25ml 7,5M Kaliumacetat, mischen
- Inkubation bei -70°C für 30-45min
- Lösung auftauen, Zentrifugation bei 6.000U/min und 4°C für 10min (Ultrazentrifuge, SS-34-Rotor)
- DNA-Fällung durch Zugabe von 2 ½ Gesamtvolumina (~18ml) Ethanol absolut
- Zentrifugation bei 8000U/min und 4°C für 15min
- Überstand verwerfen, DNA-Pellets antrocknen lassen
- Zugabe von 700µl 50:50 TE-Puffer, DNA-Pellets bei 37°C und 250U/min im Schüttelinkubator lösen
- Röhrchen kurz anzentrifugieren
- Zugabe von 15µl RNase A-Lösung
- Inkubation bei 37°C für 30min



- Je zwei Reaktionsgefäße (2ml) mit 700µl Phenol und ein Reaktionsgefäß (1,5ml) mit 700µl 2-Propanol befüllen
- Lösung in erstes Phenol-befülltes Reaktionsgefäß überführen, mischen
- Zentrifugation bei 12.000U/min und 4°C für 5min (Kühlzentrifuge)
- Wässrige Phase in zweites Phenol-befülltes Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation bei 12.000U/min und 4°C für 5min
- Wässrigen Überstand in 2-Propanol-befülltes Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation bei 14.000U/min und 4°C für 5min
- Überstand verwerfen, Zugabe von 500µl 70% Ethanol
- Zentrifugation bei 14.000U/min und 4°C für 5min
- Überstand verwerfen, DNA-Pellets trocknen lassen
- Zugabe von 40µl EB-Puffer, DNA-Pellets auf dem Thermomixer (700U/min) lösen
- Zugabe von ¼ Gesamtvolumen 10M Ammoniumacetat und 2 ½ Gesamtvolumina Ethanol absolut (-20°C), mischen
- Inkubation für 30min in Eiswasser
- Zentrifugation bei 14.000U/min und 4°C für 30min
- Überstand verwerfen, Zugabe von 500µl 70% Ethanol
- Zentrifugation bei 14.000U/min und 4°C für 5min
- Überstand verwerfen, DNA-Pellets trocknen lassen
- Zugabe von 30-50µl EB-Puffer, DNA-Pellets bei 37°C und 700U/min auf dem Thermomixer lösen

#### Abschätzung des Sondenertrags im Agarosegel

Zur Abschätzung der DNA-Menge wurde ein Aliquot (1µl) Sonden-DNA mit 5µl Ladepuffer versetzt und im Vergleich zu einem Mengenstandard im 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

#### **3.3.3.2.2 Fragmentierung der DNA mittels DNaseI**

Das Hybridisierungsverhalten von DNA-Sonden wird unter anderem durch ihre Fragmentlänge bestimmt. Zum einen binden die Sonden umso fester, je länger sie sind. Zum anderen unterliegen lange Sonden bei der Hybridisierung größeren sterischen Behinderungen, so dass sie ihre Zielsequenzen schlechter erreichen können. Eine optimale Hybridisierungseffizienz wird bei Fragmentlängen zwischen 100 und 600 Basenpaaren erzielt. Die isolierten Sonden wiesen eine Länge zwischen 100 und 200 Kilobasenpaaren auf. Durch einen unspezifischen Enzymverdau mittels DNaseI wurden sie auf Fragmentlängen von 100-600bp zerkleinert. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert.

DNase-Verdau (pro Ansatz)	
Sonden-DNA (5-10µg)	xµl
10xNP-Puffer	12,5µl
DNaseI (1:5000 verdünnt)	25µl
dH <sub>2</sub> O	yµl
Gesamtvolumen	125µl

- Inkubation der Ansätze bei 37°C für 2-5min, je nach abgeschätzter DNA-Menge
- Ansätze sofort auf Eis stellen, Aliquot für Kontrollgel entnehmen und Ansätze einfrieren (-20°C)

#### Abschätzung der Fragmentlängen im Agarosegel

Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde ein Aliquot (5µl) fragmentierte Sonden-DNA mit 5µl Ladepuffer im Vergleich zu einem Längenstandard im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und durch im Gel enthaltenes Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Sonden-DNAs, deren Fragmente nicht der gewünschten Länge von 100-600bp entsprachen, wurden erneut mit DNaseI (1:5000) inkubiert.

#### Reinigung der fragmentierten Sonden

Zur Aufreinigung der fragmentierten Sonden wurde das QIAquick Purification kit eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

#### Konzentrationsbestimmung der Sonden

Die Konzentration der Sonden-DNA wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum doppelsträngiger (ds) DNA, in einer geeichten Messung ( $ds=10OD=50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) bestimmt. Die gegebene Konzentration wurde durch Verdünnung mit EB-Puffer auf eine Endkonzentration von 50-150ng/µl gebracht.

#### **3.3.3.2.3 Markierung der Sonden-DNA durch das Universal-Linkage-System/ULS**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Multi-Colour-FISH-Techniken, die Sechsfarben-FISH und die S-COBRA-FISH, basieren auf der kombinatorischen Markierungsstrategie bzw. einer Verknüpfung von *ratio*- und kombinatorischer Markierungsstrategie. Beide Markierungsstrategien, insbesondere aber die *ratio*-Markierung, erfordern ein hohes Maß an Markierungsintensität, Effizienz und vor allem Reproduzierbarkeit. Während die enzymatische Markierung von Sonden-DNA durch z.B. PCR, Random-Primed-Labeling oder Nick-Translation nicht exakt reproduzierbar ist, ermöglicht das chemische Verfahren des *Universal-Linkage-Systems/ULS*-Markierung (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande) eine stöchiometrische und damit reproduzierbare und standardisierbare Markierung. Bei diesem System wird die Sonden-DNA durch kovalente Bindung eines Fluorochromgekoppelten, monoreaktiven cis-Platin-Derivats markiert. Dabei wird bei einem 1:1 Verhältnis zwischen Mikrogramm eingesetzter DNA und Einheit (U) ULS-Reagenz bei optimalen Reaktionsbedingungen (65 bzw. 85°C, je nach Markierungsreagenz) eine Markierungsdichte von eins auf 10-15 Basen erzielt. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass alle Sondenanteile, die mit demselben Fluorochrom markiert werden sollen, gleichzeitig in einem

Ansatz markiert werden können. So kann die Fluoreszenzmarkierung aller fünf bzw. sechs verschiedenfarbigen Sonden bei der Sechs-Farben-FISH in nur drei Reaktionsansätzen erfolgen. Diesem Vorteil kommt bei der COBRA-FISH eine noch größere Bedeutung zu. Hier können 20 bzw. 21 Sonden mit drei *ratio*-Fluorochromen und einer binären Markierung in vier Ansätzen markiert werden (vgl. 3.3.4.2.1). Eine entsprechende Markierung in einzelnen Ansätzen, wie sie z.B. bei der Nick-Translation nötig wäre, würde dagegen über 40 Markierungsreaktionen voraussetzen. Die Fluorochrom-gekoppelten Sonden werden im Anschluss an die ULS-Markierung in den gewünschten Verhältnissen gemischt.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Verwendung einer neuen Charge ULS-Reagenz jeweils das optimale Verhältnis zwischen einzusetzender DNA-Menge und Einheiten (U) ULS-Reagenz in Testhybridisierungen, so genannten *Ratio-Checks* bestimmt. Ausgehend von einem 1:1-Verhältnis zwischen Mikrogramm DNA und Einheit ULS wurde in einer Versuchsreihe in Stufen von je 0,05 Einheiten ULS das optimale Verhältnis für jedes ULS-Fluorochrom austestet. Pro Mikrogramm DNA waren in der Regel 1,00 Einheiten dGreen-ULS, 1,05 Einheiten Cy3-ULS und 1,00 Einheiten Cy5-ULS einzusetzen.

Alle Sondenanteile einer Hybridisierung (vgl. Tabelle 6, Hybridisierung A-G), die mit demselben Fluorochrom markiert werden sollten, wurden in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben. Die Markierungsreaktion erfolgte nach Zugabe des entsprechenden Fluorochroms (dGreen, Cy3 bzw. Cy5) durch Inkubation bei 65°C.

- Sondenanteile (vgl. Tabelle 6) auf Eis in entsprechend beschriftete („grün“, „rot“ und „blau“) Reaktionsgefäße pipettieren, mischen
- Zufügen der Fluorochrome dGreen-ULS, Cy3-ULS, Cy5-ULS, mischen und kurz abzentrifugieren
- Inkubation für 15min bei 65°C im Wasserbad
- Abstoppen der Markierungsreaktion durch Zugabe des fünffachen Gesamtvolumens PB-Puffer des QIAquick Purification-Kits
- Vereinigung der drei Ansätze „grün“, „rot“ und „blau“ einer Hybridisierung in einem Säulchen des QIAquick Purification-Kits
- Aufreinigung der vereinigten markierten Sonden-DNA mit dem QIAquick Purification-Kit gemäß den Angaben des Herstellers.
- Elution der gereinigten DNA mit 90µl EB-Puffer

#### **3.3.3.2.4 Fällung der markierten Sonden-DNA**

Die Sonden-DNA wurde zur Absättigung repetitiver Sequenzen sowie zur besseren Fällungseffizienz mit einem 25-fachen Überschuss an unmarkierter, repetitiver DNA der humanen Cot1-Fraktion gemischt. Bei DNA-Mengen unter einem Mikrogramm wurde zusätzlich ein 50-facher Überschuss an Fisch-Sperma-DNA und Yeast-tRNA zugegeben. Die Fällung erfolgte mit Ammoniumacetat und Ethanol.

- Markierte DNA mit 25-fachem Überschuss Cot1-DNA mischen
- Zugabe von  $\frac{1}{4}$  Gesamtvolumen 10M Ammoniumacetat
- Zugabe von  $2\frac{1}{2}$  Gesamtvolumina Ethanol absolut (-20°C), mischen
- Inkubation für 30min in Eiswasser
- Zentrifugation bei 14.000 U/min (Kühlzentrifuge) und 4°C für 30min, Überstand verwerfen
- Zugabe von 500µl 70% Ethanol
- Zentrifugation bei 14.000 U/min und 4°C für 5min, Überstand verwerfen
- Trocknen der DNA-Pellets bei 37°C auf dem Thermomixer
- Lösen der Pellets in 11µl Hybridisierungslösung bei 37°C auf dem Thermomixer, (700U/min, ÜN)

### 3.3.3.2.5 Denaturierung, Preannealing und Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung von Sonden-DNA und Metaphasechromosomen ist ein Prähybridisierungsschritt, das Preannealing, notwendig. Dieser Schritt wird im Anschluss an die Denaturierung durchgeführt. Die repetitiven Sequenzen der Sonden-DNA reassoziieren dabei mit den komplementären Sequenzen der Cot1-DNA. Diese können in der folgenden Hybridisierung nicht mehr an die Ziel-DNA binden, so dass unerwünschte Kreuzhybridisierungen supprimiert werden.

Die Herstellung und Vorbehandlung der Lymphocytenpräparate erfolgte wie in 3.3.1.2 beschrieben.

#### Denaturierung der Sonden

- In Hybridisierungslösung aufgenommene Sonden erneut mischen und kurz abzentrifugieren
- Denaturierung bei 80°C für 7min 30sec im Wasserbad
- Abkühlen auf Eis für 30sec
- Preannealing bei 37°C für 30min

#### Denaturierung der Lymphocytenpräparate

- 80µl Denaturierungslösung auf 24x60mm-Deckglas pipettieren
- Deckglas mit invertiertem OT aufnehmen, Luftblasen vermeiden!
- Denaturierung bei 80°C für 1min 20sec im Thermocycler
- Deckglas abschlagen, Inkubation für 1-2min in 2xSSC (4°C)
- aufsteigende Ethanolreihe (70% (-20°C), 90% und Ethanol absolut bei RT) je 3min inkubieren
- OT lufttrocknen

#### Hybridisierung

- Sonde auf denaturierte OT auftragen
- 21x25mm-Deckglas auflegen, Luftblasen vermeiden!
- OT mit DG nach unten hängend in Querküvette stecken

- Inkubation bei 37°C für 48h in feuchter Kammer (60% Formamid/2xSSC-getränktes Tuch einlegen)

### **3.3.3.2.6 Stringente Waschschritte und Gegenfärbung**

- Abwaschen der DG in Waschlösung 3, maximal 10min
- 4min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 2x5min waschen in Waschlösung 4 bei 45°C
- 3min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 2x5min waschen in Waschlösung 5 bei 60°C
- 20min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 5min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C

Gegenfärbung vgl. 3.3.1.2.4

### **3.3.3.3 Auswertung und Dokumentation**

Die mikroskopische Auswertung und die Dokumentation erfolgten mittels der in 3.3.1.3 aufgeführten Ausstattung. Zur Visualisierung der jeweiligen Fluorochrome wurden die folgenden Filter verwendet:

dGreen: HQ-Filterset für Cy2, F41-054

Cy3: HQ-Filterset für Cy3, F41-007

Cy5:HQ-Filterset für Cy5, F41-008

DAPI: MC-0 (DAPI)-Filterset, F36-670)

Für jede Metaphase wurde jeweils eine Sequenz von Bildern mit den spezifischen Filtern aufgenommen. Über die Computersoftware wurden den verwendeten Fluorochromen Falschfarben zugeordnet: dGreen=grün, Cy3=rot, Cy5=dunkelblau und DAPI=marineblau. Die vier Einzelbilder wurden übereinander gelegt, so dass die unterschiedlich markierten Sonden in den entsprechenden Mischfarben dargestellt wurden. Für jeden Fall wurden pro Hybridisierung mindestens sechs Metaphasen dokumentiert.

## **3.3.4 Subtelomer-/S-COBRA-FISH**

Nach der Etablierung der Subtelomer-COBRA-FISH wurde die Methode für die Untersuchung der Subtelomerregionen bei 17 Fällen eingesetzt.

### **3.3.4.1 Prinzipien der Zusammenstellung der Farbdreiecke**

Bei der S-COBRA-FISH galt es, sämtliche 41 Subtelomersonden in zwei Hybridisierungen zu untersuchen. Dabei wurden die 41 Sonden zunächst auf zwei SONDENSETS, Set A und Set B, aufgeteilt, wobei ein SONDENSET jeweils einen Hybridisierungsansatz bildete (Tabelle 7). Für die Zusammenstellung der beiden Sets galten die in 3.3.3.1 beschriebenen Kriterien. Sonden

für den p- und q-Arm desselben Chromosoms wurden zur einfacheren Identifizierung in einem Set kombiniert. Abweichend von den in 3.3.3.1 beschriebenen Kriterien wurden die akrozentrischen Chromosomen bei der S-COBRA-FISH so auf die Sets verteilt, dass eine eindeutige Identifizierung dieser Chromosomen anhand der Gegenfärbung möglich war.

#### Entwicklung der Farbdreiecke / Markierungsschemata

Zur besseren Veranschaulichung werden die COBRA-Markierungsschemata im Folgenden in Form von Farbdreiecken dargestellt (Abbildung 6).

Die ersten COBRA-Markierungsschemata für Subtelomersonden wurden vom Leiter des DFG-Projektes PR131/19-1 am LUMC in Leiden etabliert. Zum Zeitpunkt des Transfers der Methode in die Arbeitsgruppe des Instituts für Humangenetik in Bonn waren bereits 37 der insgesamt 41 Subtelomersonden in Farbdreiecke integriert. Jeder Sonde eines Sets war eine spezifische *ratio*-Farbe, also eine spezifische Position im Farbdreieck zugeordnet. Zur besseren Übersicht waren Sonden für den p- und den q-Arm desselben Chromosoms möglichst mit derselben *ratio*-Farbe markiert, wobei die Differenzierung über die binäre Markierung des q-Arms gegeben war. Im Rahmen der eigenen Arbeit wurden die noch fehlenden vier Subtelomersonden (5p, 10p, 12q und 19q, in Abbildung 6 fett gedruckt) in die bestehenden Farbdreiecke eingegliedert. Diese Integration erfolgte schrittweise für jede Sonde einzeln nach den folgenden Prinzipien: Jeder neuen Sonde wurde eine spezifische *ratio*-Farbe entsprechend der noch unbesetzten Positionen im Farbdreieck zugeordnet. Die DNA-Anteile einer neuen Sonde wurden zunächst gemäß den theoretischen Verhältnissen der verschiedenen *ratio*-Farben gemischt und in Testhybridisierungen eingesetzt. Die Auswertung dieser Testhybridisierungen erfolgte nach Aufnahme und Digitalisierung in drei Stufen unter Verwendung des Bildanalyseprogramms ColourProc: 1.) visuell anhand der überlagerten Falschfarbenbilder aller Farbdreiecke, 2.) durch Messung der Fluoreszenzintensitäten in den drei Farbkanälen rot/grün/blau an jeweils zwei Messpunkten je Chromatidsignal (zentral und randständig) mit anschließender Berechnung ihrer Mischungsverhältnisse und statistischer Auswertung, 3.) durch so genannte *scatter plots*, wobei die für jede *ratio*-Farbe bzw. Sonde gemessenen Farbintensitäten von der Software in einem zweidimensionalen Farbdigramm aufgetragen wurden. Ein solches Farbdigramm ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Entfernung eines Diagrammpunktes vom Achsenschnittpunkt steigt mit abnehmender Intensität. Die ungemischten Farben entsprechen Abszisse bzw. Ordinate; die Mischfarben liegen entsprechend ihrer Farbanteile zwischen den Achsen.

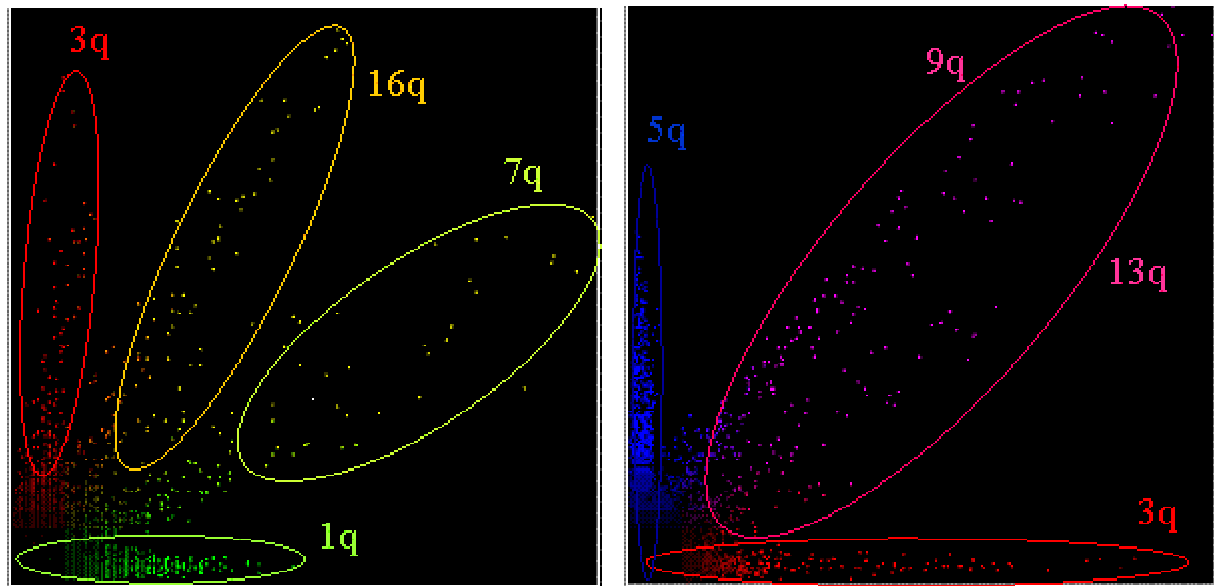


Abbildung 5: *Scatter plots* im zweidimensionalen Farbdiaagramm; a: ideale Auflösung der durch Mischen der Fluorochrome Cy3 („rot“) und dGreen („grün“) generierten *ratio*-Farben der Sonden 3q, 16q, 7q, 1q; b: Mangelhafte Trennung der *scatter plots* vor der Optimierung: Überschneidung der *scatter plots* der Sonden 13q und 9q aufgrund diffuser Signalmorphologie und schwankenden Mischungsverhältnisse.

Für jede *ratio*-Farbe bzw. Sonde wurden im Mittel vier Metaphasen ausgewertet. Aus den jeweils gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde für jede *ratio*-Farbe das tatsächlich erreichte mittlere Mischungsverhältnis der Fluorochrome errechnet. Wurde dabei das theoretisch zu erwartende Verhältnis der Farben nicht erreicht oder war keine eindeutige Unterscheidbarkeit benachbarter *ratio*-Farben möglich, so wurden die jeweiligen DNA-Anteile relativ zueinander erhöht bzw. erniedrigt und erneut in Testhybridisierungen eingesetzt. Bei sehr schwachen Sonden wurde zusätzlich die Gesamtmenge der DNA erhöht.

Die exakten Positionen der Sonden im Farbdreieck wurden zudem von zwei essentiellen Sondereigenschaften, dem Vorhandensein von subtelomerischen Kreuzhybridisierungen und der Signalmorphologie bestimmt. Sonden mit schwachen subtelomerischen Kreuzhybridisierungen wurden mit anderen *ratio*-Fluorochromen markiert als die Regionen, an denen ihre Kreuzhybridisierungen auftraten. Auf diese Weise wurden ungewollte *ratio*-Verschiebungen dieser Regionen vermieden. Sonden mit distinkten Signalen und konstanten Mischungsverhältnissen konnten problemlos in die Farbdreiecke integriert werden. Die Darstellung der einzelnen gemessenen Fluorochrom-Mischungsverhältnisse solcher Sonden zeigte im *scatter plot*-Diagramm eine optimale Auflösung der benachbarten *ratio*-Farben ohne Überschneidungen der gemessenen Fluorochrom-Mischungen (Abbildung 5a). Dagegen neigten Sonden mit diffusen Signalmorphologien zu einer leichten Variation der Intensitätsverhältnisse. Dies ließ sich auch an einer weiteren Streuung der *scatter plots* mit Überschneidungen der Fluorochrom-Mischungen benachbarter *ratio*-Farben vor allem in niedrigen Intensitätsbereichen beobachten (Abbildung 5b). Um derartige Überschneidungen

der *scatter plots* und damit mögliche Verwechslungen von Sonden zu vermeiden, wurden solche Sonden nicht nebeneinander in einem Dreieck eingesetzt.

Durch die Arbeiten am LUMC und die eigenen Arbeiten gelang es, sämtliche Subtelomersonden in die Farbdreiecke zu integrieren. Damit konnten alle 41 Sonden unter Verwendung von drei *ratio*-Fluorochromen und einer binären Markierung differentiell markiert und in zwei Hybridisierungen analysiert werden. Durch Mischen von zwei *ratio*-Fluorochromen wurden vier verschiedene *ratio*-Farben erzeugt. Eine Ausnahme bildete die Mischung von grün und rot in Hybridisierung A. Hier wurden fünf *ratio*-Farben generiert. Aus den drei möglichen Paaren der *ratio*-Fluorochrome wurden die in Abbildung 6 dargestellten Farbdreiecke konstruiert.

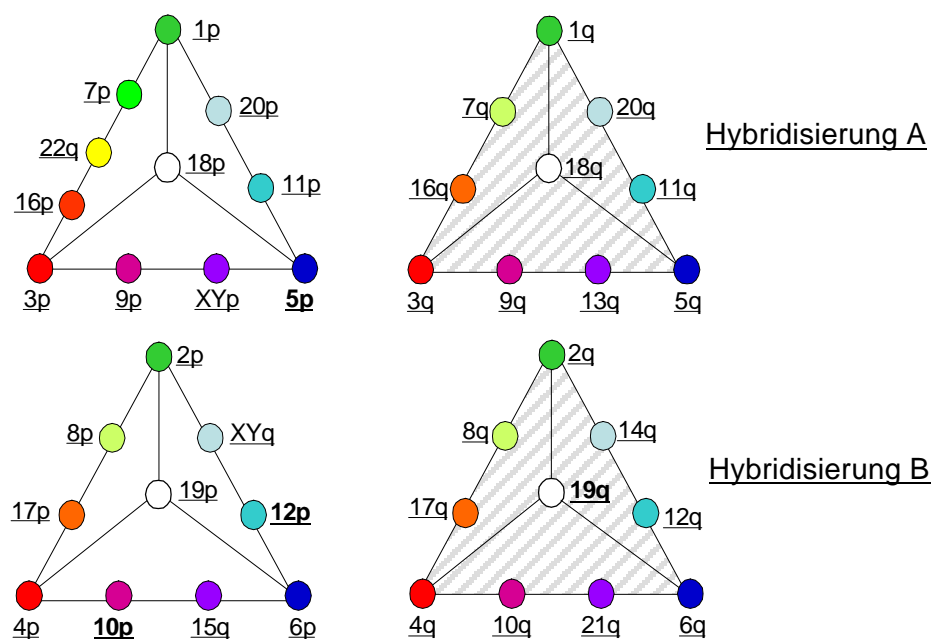


Abbildung 6: Markierungsschema der S-COBRA. Die Mischungsverhältnisse der *ratio*-Farben dGreen („grün“), Cy3 („rot“) und Cy5 („blau“) sind durch Farbe und Position der Sonden in den Dreiecken veranschaulicht. Die graue Schraffur symbolisiert die binäre Markierung. Fett gedruckte Sonden: Im Rahmen der eigenen Arbeit integrierte Sonden.

Pro Dreieck ergaben sich neun (z.B. Hybridisierung B, linkes Dreieck) bzw. zehn (Hybridisierung A, linkes Dreieck) unterschiedliche *ratio*-Farben. Eine zehnte bzw. elfte Farbe wurde durch Kombination aller drei *ratio*-Fluorochrome erzeugt (Mitte der Dreiecke). Zur Erhöhung der Multiplizität wurde das Farbdreieck der Hybridisierung B für die *ratio*-Markierung von zehn weiteren Sonden beider Hybridisierungen eingesetzt. Deren Differenzierung erfolgte über die zusätzliche binäre Markierung (graue Schraffur der rechten Dreiecke). So wurden Multiplizitäten von 20 (Hybridisierung B) bzw. 21 (Hybridisierung A) erreicht. Auf der Grundlage dieser Markierungsschemata konnte ein FISH-Signal durch seine *ratio*-Farbe und die An- oder Abwesenheit der binären Markierung eindeutig der entsprechenden Sonde zugeordnet werden. Beispielsweise wurden für die Sonden 11p und 11q (Hybridisierung A) jeweils 2/3 der eingesetzten DNA-Menge mit dGreen („grün“) und 1/3



mit Cy5 („blau“) markiert. Daraus ergab sich für beide Sonden die Falschfarbe „türkis“, wobei 11q zusätzlich die binäre Markierung DNP trug.

Nach Vervollständigung und Optimierung der Farbdreiecke bzw. der Markierungsschemata war eine rein visuelle Unterscheidung der *ratio*-Farben und damit der einzelnen Subtelomersonden möglich. Beispielsweise konnte die *ratio*-Farbe für die Subtelomerregion 20q durch den zusätzlichen Blauanteil von derjenigen für 1q unterschieden werden (Hybridisierung A, rechtes Dreieck).

### 3.3.4.2 Durchführung

Die Sondenisolation und Fragmentierung wurde wie in 3.3.3.2.1 und 3.3.3.2.2 beschrieben durchgeführt.

#### 3.3.4.2.1 Markierung der Sonden

Die Markierung der Sonden erfolgte wie in 3.3.3.2.3 beschrieben chemisch mittels ULS. Zusätzlich zu den drei Fluorochromen dGreen, Cy3 und Cy5 wurde zur binären Markierung das DNP-ULS verwendet, welches durch LaserPro IR790-konjugierte Antikörper nachgewiesen wurde. In Tabelle 7 sind die Markierungsschemata für die beiden COBRA-Sondensets A und B dargestellt. Es sind die für jede Sonde einzusetzenden absoluten DNA-Mengen sowie die jeweiligen Farbmischungsverhältnisse (%) angegeben.

Set A	<i>ratio</i> -Farbe			binäre Markierung
Subtelomer-Region	dGreen-ULS in ng (%)	Cy3-ULS in ng (%)	Cy5-ULS in ng (%)	DNP-ULS in ng
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)	
XpYp		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

Set B Subtelomer- Region	ratio-Farbe			binäre Markierung DNP-ULS in ng
	dGreen-ULS in ng (%)	Cy3-ULS in ng (%)	Cy5-ULS in ng (%)	
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)	
XqYq	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

Tabelle 7: Markierungsschemata für das Sondenset A und B der S-COBRA-FISH mit Angabe der absoluten DNA-Mengen (ng) und der Farbmischungsverhältnisse (%).

Alle Sonden und Sondenanteile, die in der gleichen Farbe markiert werden sollten, wurden wie in 3.3.3.2.3 beschrieben gemeinsam in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem entsprechenden ULS-Fluorochrom versetzt. Zusätzlich wurde das Markierungsreagenz DNP-ULS in einem Verhältnis von 1,00 Einheiten ULS pro Mikrogramm DNA eingesetzt. Die Markierung der DNA mit DNP erfolgte durch Inkubation bei 85°C für 15min unter Zugabe einer vom Hersteller mitgelieferten Markierungslösung (1/2 Volumen Lösung pro Markierungsansatz).

- Sonden bzw. Sondenanteile (vgl. Tabelle 7) auf Eis in entsprechend beschriftete („grün“, „rot“, „blau“, „DNP“) Reaktionsgefäße pipettieren und mischen
- Zufügen der Fluorochrome dGreen-, Cy3-, Cy5- bzw. DNP-ULS, mischen und kurz abzentrifugieren
- Zufügen von ½ Volumen Markierungslösung in das mit „DNP“ beschriftete Reaktionsgefäß
- Inkubation für 15min bei 65°C (dGreen, Cy3, Cy5) bzw. 85°C (DNP) im Wasserbad
- Abstoppen der Markierungsreaktion durch Zugabe des fünf-fachen Gesamtvolumens PB-Puffer des QIAquick Purification-Kits
- Aufreinigung der Markierungsansätze mit dem QIAquick Purification-Kit gemäß den Angaben des Herstellers.
- Elution der gereinigten DNA mit 150µl EB-Puffer

### 3.3.4.2.2 Fällung der markierten Sonden-DNA

Die in den vier verschiedenen Ansätzen markierten Sonden bzw. Sondenanteile eines Hybridisierungsansatzes wurden gemeinsam unter Zugabe eines 25-fachen Überschusses an Cot1-DNA mit Ethanol und Ammoniumacetat gefällt (vgl. 3.3.3.2.4). Die gefällte Sonden-DNA wurde in 13µl Hybridisierungslösung aufgenommen und mindesten 24h bei 37°C und 700U/min auf dem Thermomixer gelöst.

### 3.3.4.2.3 Denaturierung, Preannealing und Hybridisierung

Die Denaturierung und das Preannealing der Sonden-DNA, die Denaturierung der OT sowie die Hybridisierung erfolgten wie in 3.3.3.2.5 beschrieben.

### 3.3.4.2.4 Stringente Waschschrte und Detektion

Im Anschluss an die Stringenzwaschschrte erfolgte der indirekte Nachweis der binären Markierung DNP. Zunächst wurde ein gegen das DNP gerichteter Antikörper aus dem Kaninchen (Rabbit  $\alpha$  DNP) verwendet, welcher seinerseits von einem Fluorochromgekoppelten Antikörper aus der Ziege (Goat  $\alpha$  Rabbit-LaserPro IR790) detektiert wurde. Die Antikörper wurden zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einem Überschuss gelöster Proteine (Blocking-Reagent) gemischt.

- Abwaschen der DG in Waschlösung 3, maximal 10min
- 4min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 2x5min waschen in Waschlösung 4 bei 45°C
- 3min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 2x5min waschen in Waschlösung 5 bei 60°C
- 20min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 5min waschen in Waschlösung 3 bei 37°C
- 100µl Antikörperlösung 1 auf OT pipettieren, 24x60mm-Deckglas auflegen, OT mit Deckglas nach unten hängend in Querküvette stecken
- Inkubation bei 37°C für 30min im Brutschank
- Deckglas abschlagen, 3x3min waschen in TNT bei RT
- 100µl Antikörperlösung 2 auf OT pipettieren, 24x60mm-Deckglas auflegen, OT mit Deckglas nach unten hängend in Querküvette stecken
- Inkubation bei 37°C für 30min im Brutschank
- Deckglas abschlagen, 3x3min waschen in TNT bei RT

Gegenfärbung vgl. 3.3.1.2.4

### 3.3.4.3 Auswertung und Dokumentation

Die mikroskopische Auswertung und Digitalisierung wurde vom Projektleiter am LUMC durchgeführt. Die angefertigten Bilder wurden in der eigenen Arbeit mittels des Bildanalyseprogramms ColourProc bearbeitet und ausgewertet.

Die verwendete Mikroskopausstattung sowie die Vorgehensweise zur Bilderstellung sind der Publikation von Tanke et al. (1999) zu entnehmen. Der Nachweis der binären Markierung DNP erfolgte über das Fluorochrom LaserPro IR790, welches unter Verwendung des HQ-Cy7-Filtersets (Chroma, Brattleboro, VT, USA) visualisiert wurde. Für jeden Fall wurden pro Hybridisierung zehn Metaphasen dokumentiert.

Für jede Metaphase wurde jeweils eine Sequenz von Bildern mit den spezifischen Filtern aufgenommen. Über die Computersoftware wurden den verwendeten Fluorochromen Falschfarben zugeordnet: dGreen=grün, Cy3=rot, Cy5=dunkelblau, DAPI=marineblau, LaserPro IR790=violett. Zur Minimierung von Hintergrundsignalen und zur Auswertung von Fluorochrom-Mischungsverhältnissen kleiner FISH-Sonden wurde die *interactive stretch*-Funktion der Software ColourProc eingesetzt. Hierbei wurde in jedem Fluorochrom-Kanal (16-Bit-Image, 255 Graustufen) der relevante Intensitätsbereich eines Bildes definiert. Die untere Schwelle eines jeden Farbkanals wurde jeweils knapp unterhalb der Autofluoreszenz der Chromosomen gesetzt, die obere Schwelle knapp oberhalb der stärksten Signale. Die so bearbeiteten DAPI-, dGreen-, Cy3- und Cy5- Einzelbilder wurden übereinander gelegt, so dass die in unterschiedlichen Fluorochromen markierten Sonden in den entsprechenden Mischfarben dargestellt wurden. Die binäre Markierung zur Unterscheidung gleicher Mischfarben wurde in einem separaten Bild beurteilt.

## 3.4 MAPH

Die Subtelomer-MAPH wurde zur Analyse der Subtelomerregionen bei 76 Fällen eingesetzt.

### 3.4.1 Sondensets

Für die MAPH wurden zwei Sets subtelomerischer Sonden (Set A und Set B, vgl. Tabelle 25 und Tabelle 26) verwendet. Beide Sets wurden am LUMC in Leiden entwickelt und für die Etablierung und Durchführung der MAPH am Institut für Humangenetik in Bonn zur Verfügung gestellt.

#### 3.4.1.1 Eigenschaften und Auswahl der Sonden

Die Auswahl der subtelomerischen Sonden erfolgte auf der Grundlage von Informationen, die den Web-Seiten des NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov>) und des Human Working Drafts (<http://www.genome.ucsc.edu>)

entnommen wurden. Bevorzugt wurden möglichst distale Sequenzen gewählt, die im Exonbereich zentralnervös exprimierter Gene lokalisiert waren. Für einen effizienten Einsatz in der MAPH sollten die Sequenzen allgemein den folgenden Kriterien genügen:

- Die DNA Sequenz einer Sonde darf nur einmal im Genom vorkommen, Gensequenzen sind von Vorteil.
- Der GC-Gehalt der Sondensequenz sollte zwischen 30 und 65% liegen.
- Die Länge einer Sonde ist auf ein Intervall zwischen 100 und 500bp beschränkt.
- Die einzelnen Sonden eines Sets sollten sich in ihrer Länge idealerweise um etwa 3bp unterscheiden.

Die Einzigartigkeit einer Sequenz im Genom ist Voraussetzung für ihren Einsatz als Sonde zur molekulargenetischen Quantifizierung der entsprechenden Sequenz im Testgenom. Sequenzen, die mehrfach im Genom vorkommen, sind ungeeignet. Liegt eine Sequenz beispielsweise zweimal statt nur einmal im haploiden Genom vor, so ist der relative Zahlenunterschied zwischen dem diploiden Normalzustand (vier Kopien statt nur zwei Kopien) und einer Deletion (drei Kopien statt nur eine Kopie) für eine eindeutige Untersuchung der Kopienzahlen nicht ausreichend. Polymorphe Loci des Genoms sind als MAPH-Sonden ebenfalls ungeeignet.

Der GC-Gehalt und die Länge einer Sonde bestimmen über ihr Verhalten bei der Hybridisierung bzw. bei der PCR. Je höher der GC-Gehalt einer Sequenz ist, desto stärker sind die Wechselwirkungen, mit denen die Heteroduplices aus Sonde und genomischer DNA hybridisieren (vgl. 3.3). Der praktische Ablauf der MAPH fordert sowohl eine stabile Hybridisierung von Nukleinsäurehybriden als auch eine Reversibilität dieser Bindungen unter Bewahrung der nativen Struktur der DNA-Stränge. Der GC-Gehalt von DNA-Sonden ist damit auf einen Bereich von etwa 30% bis 65% festgelegt.

Für die Länge von DNA-Sonden gelten folgende allgemeine Regeln: Kurze Sonden werden in der PCR effizienter amplifiziert, während lange Sonden effizienter hybridisieren. Die untere Grenze der Sondenlänge wird demnach durch die Hybridisierungseffizienz limitiert. Die minimale Stranglänge für eine stabile Bindung zwischen Sonde und Ziel-DNA liegt bei etwa 100bp (Hollox et al., 2002a). Die obere Grenze für die Länge von DNA-Sonden wird dagegen in erster Linie durch praktische Eigenschaften der PCR bestimmt. Die Effizienz der Polymerase nimmt während der Synthese eines DNA Stranges mit zunehmender Stranglänge ab. Nach einer bestimmten Syntheseleistung löst sich die Bindung zwischen Enzym und Template, bevor die Synthese vollständig abgeschlossen ist. Eine effiziente Amplifikation erfolgt bis zu einer Fragmentlänge von etwa 500bp. Da sich die beschriebenen Effekte der Sondenlänge während der MAPH ausgleichen, können Sonden unterschiedlicher Längen zu einem Sonden-Set zusammengefasst und mit ähnlicher Effizienz eingesetzt werden.

### 3.4.1.2 Zusammensetzung der Sondensets

Das in der vorliegenden Arbeit zunächst verwendete MAPH-Sondenset A umfasste insgesamt 36 Sonden und wurde für die erste Etablierungsphase der MAPH am Institut für Humangenetik in Bonn eingesetzt. Parallel wurde dieses Set am LUMC bearbeitet, nicht informative Sonden wurden ersetzt und fehlende Sonden wurden ergänzt. Das so modifizierte zweite MAPH-Sondenset (Set B) enthielt Sonden für insgesamt 43 Subtelomerregionen. Dabei wurde die Region 12q durch zwei Sonden abgedeckt, deren Zuverlässigkeit bei Erhalt des Sondensets noch am LUMC erprobt wurde. Für die Region 16q stand keine Sonde zur Verfügung.

Die korrekte Lokalisation der Sonden sowie ihre Einzigartigkeit im Genom wurden durch die Analyse bekannter Aberrationen (vgl. 3.2.2) überprüft. In den eigenen Arbeiten wurde dies für insgesamt acht Sonden (2q, 5p, 7q, 8q, 14q, 16p, 22q, XqYq) durchgeführt. Die Charakterisierung neun weiterer Sonden des Sets B (1p, 6p, 6q, 7p, 15q, 18p, 18q, 20q, Xq) erfolgte im Rahmen von Patientenuntersuchungen am LUMC in Leiden (Kriek et al., 2004). Diese Daten wurden zur Charakterisierung der Sonden des Sets B in die vorliegende Arbeit einbezogen.

### 3.4.2 Durchführung

#### 3.4.2.1 Herstellung der Sonden

Die Herstellung der Sonden erfolgte ausschließlich am LUMC. Die entsprechenden Protokolle sind der Dissertation „Detection of Chromosomal Aberrations in Patients with Mental Retardation using Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)“ (Kriek, 2002), sowie den „Leiden Muscular Dystrophy-Pages“, (<http://www.dmd.nl/DMD-MAPH.html>) zu entnehmen. Die Endkonzentration jeder Sonde im Sondenset lag bei 100pg/μl.

#### 3.4.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Menschliche hochmolekulare DNA wird aus kernhaltigen Leukocyten gewonnen. Als Antikoagulans wird dem Blut EDTA zugesetzt. Bei der nicht-toxischen Aussalzmethode nach Miller et al. (1988) werden die Zellen zunächst lysiert. Es folgt ein enzymatischer Verdau von Proteinen mit anschließender Reinigung zur Entfernung von Zellbestandteilen und Kern-Proteinen. Schließlich wird die verbleibende DNA präzipitiert.

- 5-10ml EDTA-Vollblut in 50ml Falcon-Zentrifugenröhrchen füllen
- Mit Lysispuffer auf ein Volumen von 50ml ergänzen, mischen
- 5min auf Eis inkubieren
- Zentrifugieren für 5min bei 2000rpm und 4°C
- Überstand verwerfen, Leukocytenpellet umgekehrt stehend 2-3min trocknen

- 5ml Kernlysispuffer, 350µl 10% SDS und 100µl Protease K (10mg/ml) zufügen
- Proteinverdau ÜN bei 37°C
- Zugabe von 3,2ml gesättigter NaCl-Lösung, kräftig schütteln
- Zentrifugieren für 15min bei 5500rpm
- Überstand in neues Röhrchen überführen
- DNA-Fällung durch Zugabe eines halben Volumens Isopropanol, leicht schwenken
- DNA-Flocke mit gebogener Pasteurpipette entnehmen
- Kurz in 70% EtOH schwenken, 1min an der Luft trocknen
- DNA in 200-600µl TE<sup>-4</sup> lösen

### 3.4.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Die gegebene Konzentration wurde durch Verdünnung auf eine Endkonzentration von 0,5µg/µl (+/- 0,15µg) gebracht.

### 3.4.2.4 Vorbereitung der Filter und Auftragen der genomischen DNA

Es wurden je zwölf Test-DNAs gleichzeitig in einem MAPH-Experiment analysiert. Diese wurden nach basischer Denaturierung auf etwa 2x3mm großen Nylonfiltern durch UV-Quervernetzung immobilisiert. Zur Differenzierung wurden die Filter nummeriert.

- Zuschneiden der Nylonfilter mit einem Skalpell in 2x3mm große Stücke, Nummerierung der Filter mit einem Bleistift
- Pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte 1µl 1M NaOH vorlegen, dann 2µl (1µg) DNA (~0,5µg/µl) zufügen und durch Auf- und Abpipettieren mischen
- Mit einer Pinzette den entsprechend nummerierten Filter zufügen und mit einer sauberen Pipettenspitze in die Lösung tauchen, Kontaminationen zwischen den verschiedenen DNAs vermeiden
- Trocknen bei 37 °C für 10min im Brutschrank
- Mikrotiterplatte mit Folie überspannen
- Quervernetzung der DNA durch UV-Bestrahlung im Stratalinker, dabei Mikrotiterplatte von beiden Seiten mit 50mJ bestrahlen

### 3.4.2.5 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten nach den in 3.3 und 3.3.3.2.5 beschriebenen Prinzipien. Die Test-DNA lag jedoch nicht wie im Fall der in situ-Hybridisierung als Metaphasen bzw. Interphasen auf Objektträgern fixiert vor, sondern war in Form einzelsträngiger DNA-Moleküle an Nylonfilter gebunden. Zur Absättigung repetitiver Sequenzen und damit zur Vermeidung unspezifischer Hybridisierungen zwischen der genomischen Test-DNA und der Sonden wurden Prähybridisierungen mit fragmentierter Fisch-Sperma-DNA sowie mit Cot1-DNA durchgeführt. Zur Hybridisierung wurde das

Gemisch der verschiedenen Sonden zusätzlich mit Blockade-Primern versetzt (20pmol). Die Sequenz der Blockade-Primer entsprach der Sequenz des Primerpaares, welches jede Sonde eines Sets flankiert. Durch diese Absättigung der Primersequenzen wurden Kreuzhybridisierungen zwischen verschiedenen Sonden eines Sets verhindert.

#### Prähybridisierung:

- Filter mit einer Pinzette in ein gemeinsames 1,5ml Eppendorfgefäß überführen
- 1ml Prähybridisierungslösung A zufügen
- Prähybridisierung bei 60°C für 2h (oder ÜN) im Wasserbad
- 250µl Prähybridisierungslösung B bei 95°C für 2min auf dem Thermomixer (700rpm) erhitzen
- Prähybridisierungslösung A über den Filtern abpipettieren und durch 200µl Prähybridisierungslösung B ersetzen
- Inkubation bei 60°C für 30-60min im Wasserbad

#### Hybridisierung:

- Hybridisierungslösung mit 2µl 1 M NaOH versetzen, mischen
- Denaturierung bei 37°C für 1min
- Kurz auf Eis abkühlen
- 3µl 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zur Neutralisation zufügen, mischen
- Gesamtes Volumen Hybridisierungslösung (12µl) zur Prähybridisierungslösung B zufügen
- Hybridisierung bei 37°C ÜN im Wasserbad

#### **3.4.2.6 Posthybridisierungs-Waschschritte**

Bei den Posthybridisierungs-Waschschritten wurden überschüssige bzw. fehlgepaarte Sondenanteile von der fixierten genomischen DNA entfernt. Dabei wurden die Stringenzbedingungen so gewählt, dass die gewünschten Heteroduplices aus Sonde und genomischer DNA erhalten blieben.

- Hybridisierungslösung über den Filtern abpipettieren
- Filter mit einer Pipettenspitze in ein gemeinsames 50ml-Gefäß überführen
- 25ml vorgewärmte (60°C) Waschlösung A zufügen
- 5x3min waschen mit Waschlösung A bei 60°C im Schüttelwasserbad, zum Lösungswechsel Waschlösung vorsichtig über einem Becherglas abgießen
- 5x5min mit waschen mit Waschlösung B bei 60°C im Schüttelwasserbad
- Filter in eine Petrischale überführen
- Filter identifizieren und mit einer Pinzette in entsprechend nummerierte PCR-Gefäße überführen



### 3.4.2.7 Denaturierung der Heteroduplices

Die spezifisch gebundenen Sonden wurden durch Erhitzen der Filter von der immobilisierten genomischen DNA gelöst und somit für die anschließende PCR-Amplifikation zugänglich gemacht.

- Filter in 50µl 1xPCR-Puffer II aufnehmen
- Denaturierung bei 94°C für 5min im Thermocycler (GeneAmp PCR-System 9700)
- In der Zwischenzeit PCR-Mix (vgl. 3.4.2.8) vorbereiten
- Proben direkt auf Eis stellen, zügig weiterarbeiten!

### 3.4.2.8 Polymerase-Kettenreaktion/PCR

Die PCR ist eine schnelle und sensitive Methode zur in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht dadurch die Detektion kleinster DNA-Mengen (Saiki et al., 1985). Das Prinzip der PCR basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Abschnitts (Template) nach Anlagerung von zwei entgegengesetzt orientierten Startersequenzen (Primern) bekannter Sequenz. Die Reaktion verläuft als zyklischer Prozess aus je drei aufeinander folgenden Schritten: 1. einem Denaturierungsschritt, in dem die beiden DNA-Stränge des Templates voneinander getrennt werden, 2. einem Hybridisierungsschritt, in dem die spezifischen Primer an die komplementären Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts binden und 3. einem Syntheseschritt, in dem die DNA-Sequenz zwischen den Primern mithilfe einer DNA-Polymerase und der im Reaktionsansatz enthaltenen freien Desoxyribonukleotide (dNTPs) spezifisch synthetisiert wird. Durch erneutes Erhitzen auf 92-95°C kann die DNA-Synthese abgebrochen und die doppelsträngige DNA erneut denaturiert werden. Bei Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) kann somit der nächste Zyklus der DNA-Amplifikation beginnen. Da in jedem weiteren Zyklus die neu synthetisierten DNA-Stränge als Template zur Verfügung stehen, führt die PCR theoretisch zu einer exponentiellen Amplifikation des Templates.

In der Praxis folgt die PCR jedoch nur über einen begrenzten Zeitraum diesem mathematischen Modell, da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifikation des Zielproduktes sowohl am Anfang als auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind. Nach der zunächst exponentiell verlaufenden Amplifikation folgt eine Plateauphase, die zum einen in der abfallenden Enzymaktivität und der abnehmenden Konzentration der Reaktionskomponenten begründet liegt. Zum anderen beruht sie auf der Tatsache, dass die amplifizierten DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den freien Oligonukleotid-Primern, sondern untereinander hybridisieren und somit nicht als Template zur Verfügung stehen.

Bei der MAPH wurde die PCR im Rahmen einer quantifizierenden Methode verwendet. Ziel war es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge des eingesetzten Templates, also der hybridisierten Sonden, zu schließen. Nukleotide und Taq-Polymerase

wurden im Überschuss eingesetzt, so dass sie Synthese von der Konzentration vorhandener Reaktionskomponenten unabhängig war. Zur exponentiellen Amplifikation der Sonden-DNA wurden 23-25 PCR-Zyklen durchgeführt. Für die anschließende Fragmentanalyse wurde der Vorwärts-Primer in fluoreszenzmarkierter Form (Fluoreszenzfarbstoff FAM) eingesetzt.

Die PCR wurde als „Mastermix“ mit allen Komponenten außer der Template-DNA pipettiert und auf verschiedene PCR-Gefäße verteilt. Anschließend wurde die Sonden-DNA zu den einzelnen Ansätzen hinzugeben. Die Reaktion erfolgte in einem automatisierten Thermocycler (GeneAmp PCR-System 9700, Applied Biosystems).

PCR-Mastermix (für 12 Ansätze)	
10x PCR-Puffer II	30µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	24µl
dNTP (10mM)	7,5µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	3µl
MAPH Vorwärts-Primer, FAM markiert (20µM)	3µl
MAPH Rückwärts-Primer (20µM)	3µl
H <sub>2</sub> O	199,5µl
Gesamtvolumen	270µl

- Pro Ansatz 22,5µl PCR-Mix in nummerierte PCR-Gefäße vorlegen
- Je 2,5µl der abgelösten Sonden-DNA als Template zufügen (maximal 10min nach der Denaturierung!)
- PCR-Programm starten:

94°C, 5min
23-25 Zyklen:
95°C, 45sec
57°C, 1min
68°C, 1min
68°C, 10min
4°C, unendlich

#### Reinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das SigmaSpin Post Reaktion Purification Kit eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

#### **3.4.2.9 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese**

Die Trennmatrix in Polyacrylamidgelen besteht aus einem Polymer aus Acrylamid und Bisacrylamid. Die Polymerisation dieser Komponenten wird durch Ammoniumpersulfat (APS) eingeleitet, welches durch homolytische Spaltung von Kohlenwasserstoff-Doppelbindungen Radikale produziert. Der Gellösung zugesetztes TEMED stabilisiert diese Radikale kurzzeitig, so dass zu Beginn der Reaktion viele Startermoleküle vorhanden sind. Die Quervernetzung der Acrylamidketten erfolgt durch Bisacrylamid.

Zur Kontrolle der PCR-Effizienz wurde ein Aliquot (8µl) der PCR-Produkte im Vergleich zu einem Standard im Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch anschließende Silberfärbung

(vgl. 3.4.2.10) sichtbar gemacht. Dieser Kontrollschritt diente nicht der exakten Quantifizierung der PCR-Produkte, sondern einer groben Abschätzung des DNA-Gehaltes jedes Ansatzes. Anhand dieser visuellen Abschätzung wurde das für die nachfolgenden Fragmentanalysen einzusetzende Volumen jedes Ansatzes ermittelt.

Gellösung (10%) für 500ml	
Glycerin (87%)	45ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	125ml
TEMED	500µl
ad 500 ml 0,5xTTE	

- Pro Gel 20ml 10%ige Gellösung mit 200µl APS (10%) versetzen, mischen und sofort in Gelträger gießen, Kamm einstecken, ca. 30min aufrecht auspolymerisieren lassen
- Elektrophoresekammer zusammenbauen und Pufferreservoir mit 0,5xTTE befüllen
- Pro Ansatz 8µl PCR-Produkt mit 1µl Ladepuffer versetzen und auf das Gel auftragen
- 5µl Standard auftragen
- Gellauf bei 200V und 160mA für 2h

### 3.4.2.10 Silberfärbung

Eines der sensitivsten Nachweisverfahren von DNA in Polyacrylamidgelen beruht auf der Reduktion von Silbernitrat. Dieses wird durch Formaldehyd bei einem erhöhten pH-Wert zu metallischem Silber reduziert. Die Reaktion wird durch Makromoleküle, in diesem Fall DNA, beschleunigt. Die Silberionen assoziieren dabei mit der DNA und machen diese nach der Reduktionsreaktion sichtbar.

Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen zu gewährleisten, wurden die folgenden Arbeitsschritte unter ständigem Schütteln durchgeführt.

- Fixierung der DNA in 10% Ethanol für 10min
- Ansäuerung des Gels in 1% HNO<sub>3</sub> für 5min
- Färbung in 0,2% AgNO<sub>3</sub> (unmittelbar vor Gebrauch 1µl Formaldehyd (37%) pro ml 0,2% AgNO<sub>3</sub> zugeben)
- 3x kurz mit aqua dest. spülen
- Reduktion der Silberionen durch 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (unmittelbar vor Gebrauch 1µl Formaldehyd (37%) pro ml 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zufügen), Lösung mehrmals wechseln, bis gewünschte Färbungsintensität erreicht ist
- Abstoppen der Reaktion mit 10% Essigsäure für 5min
- Gel auf Whatman-Papier legen und bei 80°C für 120min unter Vakuum trocknen

### 3.4.2.11 Automatische Fluoreszenz-Detektion mit dem ABI Prism 377-System

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde das gelbasierte Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionssystem ABI Prism 377 verwendet. Die Detektion und Quantifizierung der aufgetrennten Fragmente erfolgte über die Messung von Fluoreszenzintensitäten.

Bei der Amplifikation der DNA (vgl. 3.4.2.8) wurde einer der beiden PCR-Primer in fluoreszenzmarkierter Form eingesetzt. Dadurch wurden die amplifizierten Sonden während der PCR-Reaktion enzymatisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markiert. Die markierten Fragmente wurden in einem 4,25%igen Polyacrylamidgel ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Beim ABI Prism 377-System wurden die Produkte aller Gelbahnen während der Elektrophorese im unteren Drittel des Gels durch eine horizontal bewegliche Scanner-einrichtung ausgewertet. Die an die DNA-Fragmente gekoppelten Fluorophore wurden durch einen Argonlaser angeregt und das emittierte Licht von einem Scanner erfasst. Die Menge des emittierten Lichtes war proportional zur Menge markierter DNA. Während des gesamten Gellaufs wurden diese Daten dokumentiert und anschließend mit der Software des angeschlossenen Computers ausgewertet.

#### Vorbereitung der Proben:

12µl des gereinigten PCR-Produktes jedes Ansatzes wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in einem Gemisch aus Ladepuffer und TAMRA-Längenstandard aufgenommen. Basierend auf der visuellen Abschätzung des DNA-Gehaltes (vgl. 3.4.2.9) wurden je zwei verschiedene Volumina jedes Ansatzes (zwischen 0,7µl und 2µl) auf das Gel aufgetragen. Es wurde jeweils diejenige Gelspur ausgewertet, die distinkte und gut sichtbare Banden aufwies. Zur exakten Längenbestimmung der Fragmente, also der verschiedenen Sonden, wurde der TAMRA-Längenstandard verwendet.

- 12µl gereinigtes PCR-Produkt in ein 1,5ml Gefäß überführen und bei geöffnetem Deckel für 20min in einer Vakuumzentrifuge trocknen
- Pellet in 3µl Puffer+TAMRA-Längenstandard aufnehmen und durch Auf- und Abpipettieren mischen
- Kurz vor dem Auftragen auf das Acrylamidgel Proben bei 95°C für 3min denaturieren
- Proben auf Eis stellen

#### Vorbereitung des Acrylamidgels

Gellösung (4,25%)	
Harnstoff	21g
aqua dest.	22,8ml
Acrylamid/Bis (29:1) (30%)	5,3ml
10xTBE	6ml
TEMED	15µl

- Gelvorrichtung (480x200x0,2mm) zusammenbauen
- 4,25%ige Gellösung ansetzen und mit einer Vakuumpumpe entgasen
- 350µl APS zufügen, mischen
- Gel sofort zwischen die Glasplatten gießen und Kamm einstecken
- Ca. 1h trocknen
- Gel in Elektrophoresekammer einbauen, Pufferreservoir mit 1xTBE füllen
- Gelvorlauf, bis eine Temperatur von 51°C erreicht ist

- Denaturierte Proben auftragen, dabei zunächst jede zweite Tasche beladen, 10min einlaufen lassen, dann restliche Taschen beladen
- Gellauf bei 51°C, 3kV, 60mA (200W) für 6,5h

### 3.4.3 Auswertung und statistische Analyse der MAPH-Daten

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der im ABI Prism 377 aufgetrennten PCR-Produkte wurden mittels der GeneScan Analysis Software 2.1 (Applied Biosystems), der Genotyper Software (Applied Biosystems) und Excel (Microsoft) ausgewertet. Die ersten beiden Software-Programme generieren Informationen über die Länge, die Peakhöhe sowie die Peakfläche der aufgetrennten DNA-Fragmente und ermöglichen einen quantitativen Vergleich verschiedener Fragmente. In einem Diagramm wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (U) (Ordinate) gegen die Sondenlänge in Basenpaaren (Abszisse) aufgetragen, wobei jeder Peak einer amplifizierten Sonde entsprach. Die Höhe der Peaks war jeweils proportional zur Menge der vorhandenen Sonde. Es wurden nur die Peaks ausgewertet, deren Höhe zwischen 600 und 6000U lag.

Nach Zuordnung der einzelnen Peaks zu den entsprechenden Sonden wurden die ermittelten Daten in eine Excel-Datei transferiert. Jedes MAPH-Experiment, bestehend aus mindestens acht und höchstens zwölf parallel untersuchten Fällen, wurde isoliert betrachtet.

Zur Auswertung der Daten wurde eine Kombination aus verschiedenen etablierten Methoden angewandt, die für die Analyse von MAPH- ( Armour et al., 2000; Sismani et al., 2001; Hollox et al., 2002a; White et al., 2002) und *array*-basierten CGH-Experimenten (Hodgson et al., 2001) beschrieben sind.

Zunächst erfolgte eine Normalisierung der Daten, um Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten einzelner Sonden sowie zwischen den verschiedenen Ansätzen, also den verschiedenen Test-DNAs eines Experimentes, auszugleichen. Im ersten Schritt wurden die einzelnen Peakhöhen zueinander in Relation gesetzt, indem sie durch die Summe der Peakhöhen ihrer vier direkten Nachbarn (nur Autosomen-spezifische Sonden und Sonden für XqYq) geteilt wurden. Die so errechneten relativen Peakhöhen sollten, eine normale disome Kopienzahl (bei autosomalen Zielregionen) vorausgesetzt, für jede Sonde über alle Ansätze konstant sein. Peakhöhen der Sonden für Xp und Xq wurden in Experimenten, in denen weibliche und männliche Patienten parallel untersucht wurden, zunächst mit einem Korrekturfaktor multipliziert (vgl. 3.4.3.1) und dann ebenfalls durch die Summe der vier Nachbarwerte geteilt.

Im nächsten Schritt der Auswertung wurde für jede Sonde der Median ( $X_M$ ) über die relativen Peakhöhen aller Patienten-DNAs dieses Experimentes bestimmt. Zur Normalisierung wurde dann jede relative Peakhöhe durch den zugehörigen Median geteilt. Sonden, deren Standardabweichung (SD) über alle Patienten-DNAs in einem Experiment größer als 0,15

war, wurden für dieses Experiment als nicht aussagekräftig erachtet und von der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen.

Die normalisierten relativen Peakhöhen spiegeln das Mengenverhältnis der einzelnen Sonden innerhalb einer Patienten-DNA wider. Aus diesem Mengenverhältnis, also der relativen Kopienzahl, lässt sich auf die Kopienzahl der untersuchten genomischen Regionen im Testgenom schließen. Für die normale disome Situation, in der pro diploider Zelle zwei Kopien der untersuchten autosomalen Zielregion vorliegen, liegt der Erwartungswert nach Normalisierung bei 1,0. Für eine heterozygote Deletion, d.h. eine Monosomie, bei der nur eine Kopie der entsprechenden Zielregion vorhanden ist, beträgt dieser Wert 0,5. In diesem Fall steht für die PCR nur die Hälfte an Template-DNA zur Verfügung, und es entsteht nur halb so viel markiertes PCR-Produkt. Nach Fluoreszenzmessung ergibt sich eine im Verhältnis zu den parallel eingesetzten Sonden geringere Peakhöhe, deren Wert nach Normalisierung theoretisch bei 0,5 liegt. Ausgehend vom Wert 1,0 für eine normale disome Kopienzahl spiegelt dieses Mengenverhältnis eine Deletion wider. Bei Vorliegen einer heterozygoten Duplikation, d.h. einer Trisomie, liegt der Erwartungswert entsprechend bei 1,5.

Wegen der Streuung der Werte wurden in der Praxis normalisierte Peakhöhen als normal, (disom) angesehen, wenn sie in einem Intervall zwischen 0,8 und 1,2 lagen. In der Literatur beschriebene entsprechende Schwellenwerte liegen bei 0,75 bzw. bei 1,25 (Armour et al., 2000; Kriek et al., 2004). Durch das in der vorliegenden Arbeit gewählte engere Intervall sollte der vollständige Nachweis aller vorhandenen Mikrodeletionen und -duplikationen gewährleistet und damit der Anteil falsch-negativer Ergebnisse minimiert werden.

Die Standardabweichung der Werte innerhalb dieses Intervalls (0,8-1,2) wurde für jede Patienten-DNA bestimmt. Dabei wurden nur diejenigen Sonden berücksichtigt, die nach den oben beschriebenen Kriterien als aussagekräftig erachtet wurden (Standardabweichung über alle Patienten-DNAs = 0,15). Abweichungen um zwei bzw. drei Standardabweichungen vom Median ( $X_M \pm 2SD$  bzw.  $X_M \pm 3SD$ ) wurden als potentiell auffällig, also als mögliche Kopienzahlveränderung gewertet. Beide Grenzwerte wurden parallel verwendet, um am Ende der Versuchsreihe die Falsch-Negativ- und Falsch-Positiv-Raten beider Schwellenwerte miteinander vergleichen zu können.

Patienten-DNAs, deren Standardabweichung über alle Sonden über 0,15 lag, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt (White et al., 2002). Für diese galt das entsprechende MAPH-Experiment als nicht aussagekräftig und wurde wiederholt.

### **3.4.3.1 Auswertung der MAPH-Daten X-gekoppelter-Subtelomerregionen**

Die Sonden, die spezifisch für die Subtelomere des X-Chromosoms (Xp, Xq) sind, nehmen aufgrund der Dosisunterschiede im männlichen und weiblichen Geschlecht eine

Sonderstellung ein. Im weiblichen Geschlecht entspricht die Anzahl X-gekoppelter Loci im Normalzustand der Anzahl autosomaler Loci. Im männlichen Geschlecht liegt dagegen pro diploider Zelle im Normalzustand eine Kopie X-gekoppelter Loci vor. In Experimenten, in denen sowohl männliche als auch weibliche Patienten parallel untersucht wurden, wurde dieser Dosisunterschied durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor, der theoretisch dem Wert zwei entspricht, ausgeglichen. In der Praxis wurde dieser Korrekturfaktor für die Sonden Xp und Xq für jedes Experiment einzeln berechnet. Dabei wurde die mittlere Peakhöhe der Sonden Xp bzw. Xq über alle weiblichen Patienten-DNAs bestimmt und durch diejenige aller männlichen Patienten-DNAs dividiert. Anschließend wurden die Peakhöhen der Sonden Xp bzw. Xq aller männlichen Patienten-DNAs mit dem ermittelten Korrekturfaktor multipliziert. Die relativen Peakhöhen für die Sonden Xp und Xq wurden dann wie oben beschrieben durch Division durch die Summe der Peakhöhen ihrer vier direkten Nachbarn berechnet und anschließend normalisiert. Für den hemizygoten Normalzustand X-gekoppelter Loci im männlichen Geschlecht lag der Erwartungswert nach Multiplikation mit dem Korrekturfaktor und darauf folgender Normalisierung bei 1,0. Dieser Wert entspricht dem Erwartungswert X-gekoppelter Loci im weiblichen Geschlecht.

#### **3.4.4 Interpretation und Verifizierung der MAPH-Daten**

Jede Patienten-DNA wurde in zwei voneinander unabhängigen MAPH-Experimenten analysiert, so dass für jede Subtelomerregion zwei Ergebnisse vorlagen. Zur Interpretation wurden die Ergebnisse beider Experimente miteinander kombiniert. Die Grundlagen zur Interpretation von MAPH-Ergebnissen sowie die verwendeten Auswertungskriterien werden gemeinsam mit den beobachteten Ergebnissen bzw. Ergebniskombinationen in Kapitel 4.2.2 erläutert.

##### **3.4.4.1 Verifizierung der MAPH-Ergebnisse**

Sämtliche durch Subtelomer-MAPH detektierte potentielle Aberrationen wurden in Verifizierungsexperimenten überprüft. Bei den meisten dieser Fälle wurden FISH-Analysen mit PAC- oder BAC-Sonden durchgeführt, welche die als MAPH-Sonde verwendete Sequenz beinhalteten oder höchstens 500kb davon entfernt lokalisiert waren. Dabei kamen Subtelomersonden aus dem eigenen Sondenset (vgl. 3.3.2) sowie weitere Locus-spezifische Sonden aus den zu analysierenden genomischen Regionen zum Einsatz (Tabelle 28 im Anhang). Diese wurden aus dem UCSC Genome Browser ausgewählt (<http://www.genome.ucsc.edu>) und vom Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Isolierung und Markierung der Sonden sowie die Hybridisierung in Zwei-Farb-Experimenten und die Stringenzwaschungen erfolgten mit den beschriebenen

Techniken (vgl. 3.3.3.2.1 bis 3.3.3.2.6). Zur Markierung wurden die Fluorochrome dGreen und Cy3 eingesetzt, wobei pro Sonde 250 Nanogramm DNA markiert wurden.

14 Fälle (13 Negativkontrollen, eine Positivkontrolle) des Bonner MR-Kollektivs waren bereits am LUMC in Leiden durch MAPH analysiert worden und konnten somit als Vergleichswerte für die eigenen Daten verwendet werden.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 FISH

Für den methodischen Vergleich der drei angewandten FISH-Techniken zur Untersuchung der Subtelomerregionen (ToTelVysion-System, Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und S-COBRA-FISH) wurden die Analysen von 66 Patienten des Bonner MR-Kollektivs herangezogen. 16 Patienten waren jeweils durch zwei der drei Techniken untersucht worden. Für die Subtelomeruntersuchungen waren zwei verschiedenen Sondensets verwendet worden, das „eigene“ FISH-Sondenset (Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und S-COBRA-FISH; vgl. Tabelle 23 im Anhang) und das ToTelVysion Probe Panel der Firma Vysis (ToTelVysion-System; vgl. Tabelle 22 im Anhang).

#### 4.1.1 Beurteilungskriterien

Um die verschiedenen FISH-Methoden miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils die quantitativen und qualitativen Anforderungen an das Untersuchungsmaterial abgeschätzt und der zeitliche und praktische Arbeitsaufwand für die Vorbereitung und Durchführung der Subtelomeranalysen für alle drei Techniken bestimmt. Als weiteres Vergleichskriterium wurde die Auswertung der FISH-Experimente herangezogen. Wichtige Faktoren waren dabei a) die Hybridisierungseffizienz der Sonden, b) die Signalintensität und das Verhältnis zwischen Signal- und Hintergrundstärke (*signal-to-noise-ratio*), c) das Auftreten von Kreuzhybridisierungen und d) die Unterscheidbarkeit der Signale einer Hybridisierung. Diese vier Faktoren beeinflussen sich gegenseitig und sind daher oft nicht klar voneinander trennbar. Zusammengenommen bestimmen sie jedoch die Auswertbarkeit und deren Effizienz, die sich in der Zahl der Metaphasen, die für eine eindeutige Aussage nötig sind, und der Zahl der notwendigen Nachhybridisierungen widerspiegelt (s.u.).

Die Hybridisierungseffizienz einer Sonde gibt den Anteil der Metaphasen an, in dem das spezifische Signal einer Sonde eindeutig sichtbar ist. Dabei musste bei den vorliegenden Untersuchungen das Signal subtelomerisch lokalisiert und dem jeweiligen Chromosom eindeutig zuzuordnen sein. Die Hybridisierungseffizienz wird streng genommen in solchen Hybridisierungen bestimmt, in denen eine Sonde mit nur einem Fluorochrom markiert und isoliert eingesetzt wird. Für das kommerziell erhältliche ToTelVysion Probe Panel war eine isolierte Betrachtung der Hybridisierungseffizienz nicht möglich, da die Sonden nur in den vom Hersteller vorgegebenen Kombinationen, welche sich teilweise aus zwei Fluorochromen zusammensetzten, zur Verfügung standen. Für beide Sondensets analysierbar waren dagegen die Intensität der Hybridisierungssignale und das damit verbundene Verhältnis zwischen Signalstärke und Hintergrundstärke (*signal-to-noise-ratio*). Ein Hybridisierungs-

signal wurde als „eindeutig vorhanden“ angesehen, wenn es in seiner Größe und Intensität deutlich vom Hintergrund bzw. von gleichfarbigen zusätzlichen Hybridisierungssignalen zu unterscheiden war.

Zusätzliche subtelomerisch lokalisierte Signale mussten bei der Auswertung von Hybridisierungen besonders beachtet werden, da es sich bei diesen um potentielle Chromosomenaberrationen handeln konnte. Traten diese Signale in weniger als 20% der betrachteten Metaphasen auf oder wurden sie auf beiden Homologen eines Chromosoms beobachtet, so wurden sie als echte Kreuzhybridisierungen, verursacht durch kleinere Homologien zwischen der Sondensequenz und anderen Regionen im Genom, und damit nicht als potentielle Aberration gewertet.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Beurteilung von Hybridisierungssignalen war die Unterscheidbarkeit sämtlicher in einer Hybridisierung dargestellter Sonden. Bei den angewandten FISH-Techniken waren die Sonden teilweise durch Kombination von zwei Fluorochromen markiert. (z.B. grün und rot, Mischfarbe gelb). Erschien eine Farbkomponente weniger stark als die andere, so war eine Differenzierung von den in reinen Farben markierten Sonden (z.B. grün oder rot) der gleichen Hybridisierung nicht immer möglich.

Anzahl auszuwertender Metaphasen / Nachhybridisierungen: Voraussetzung für die Beurteilung einer Subtelomerregion war die eindeutige Identifizierung der entsprechenden FISH-Sonde in mindestens vier Metaphasen eines Probanden. Die dazu notwendige Mindestzahl auszuwertender Metaphasen wurde maßgeblich von den oben genannten Faktoren (Hybridisierungseffizienz, Signalintensität, *signal-to-noise-ratio*, zusätzliche Signale, Unterscheidbarkeit der Sonden) bestimmt. Zur Identifizierung fraglicher Sonden wurden maximal zehn Metaphasen ausgewertet. War auch dann keine abschließende Beurteilung der Sonden in mehr als der Hälfte aller betrachteten Metaphasen möglich, so mussten für die betreffenden Subtelomerregionen Nachhybridisierungen durchgeführt werden. Die Häufigkeit solcher Nachhybridisierungen stellte ein Maß für die Effizienz der einzelnen FISH-Methoden und damit ein wichtiges Vergleichskriterium der drei FISH-Techniken dar.

#### **4.1.2 Subtelomeranalysen durch das ToTelVysion-System**

Für die Charakterisierung des ToTelVysion Probe Panels sowie für die Beurteilung der FISH-Technik zur Analyse der Subtelomerregionen wurden die Untersuchungen von 39 Patienten des MR-Kollektivs herangezogen.

##### Quantitative und qualitative Anforderungen an das Untersuchungsmaterial

Die Subtelomeranalyse eines Patienten erfolgte in 15 Hybridisierungen, wobei unter Verwendung von zwei Fluorochromen Multiplizitäten von maximal drei erreicht wurden (Tabelle 8).

Je Patient waren 15 Hybridisierungsareale von je 12mm Durchmesser mit mindestens 12-15 gut gespreiteten Metaphasen notwendig. Bei etwa jedem siebten Patienten des MR-Kollektivs war eine Untersuchung durch das ToTelVysion-System nicht möglich, da das jeweils zur Verfügung stehende Zellmaterial den genannten Anforderungen nicht genügte.

#### Vorbereitung und Durchführung

Zur Herstellung der Präparate musste zunächst die Konzentration jeder Zellsuspension in Abhängigkeit vom vorliegenden Mitoseindex eingestellt werden. Pro Patient waren meist sechs Präparate notwendig, auf denen sorgfältig 15 geeignete Hybridisierungsregionen ausgewählt und markiert werden mussten. Die Vorbereitung der Präparate erforderte je Fall etwa 2h.

Die Sonden des ToTelVysion-Systems waren direkt markiert und lagen gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung vor. Es war lediglich eine Denaturierung erforderlich.

An die Hybridisierung, welche für circa 16h durchgeführt wurde, schlossen sich kurze Stringenzwaschungen an.

#### Auswertung

Wie in 4.1.1 erläutert, konnte die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Sonden des ToTelVysion Probe Panels nicht isoliert bestimmt werden. Als Maß für die Hybridisierungseigenschaften und die Qualität der Sonden wurde daher die Häufigkeit, mit der die einzelnen Sonden jeweils in Nachhybridisierungen eingesetzt werden mussten, herangezogen. Dabei fiel auf, dass bestimmte Sonden vermehrt unklare Ergebnisse erbrachten. Die Sonden 6p und 9p lieferten für etwa jede zehnte, die Sonden 1p und 3p sogar für etwa jede fünfte aller durchgeführten Untersuchungen fragliche Resultate, so dass zur Analyse der entsprechenden Subtelomerregionen Nachhybridisierungen durchgeführt werden mussten. Für diese „schlechten“ Sonden war jedoch in etwa 94% aller analysierten Metaphasen das jeweils erwartete Hybridisierungssignal sichtbar, so dass die Hybridisierungseffizienzen der betreffenden Sonden eigentlich zufrieden stellend waren. Die dennoch beobachteten schlechten Hybridisierungseigenschaften waren maßgeblich auf andere Faktoren wie die geringe Signalintensität (Abbildung 7) und die dadurch hervorgerufene ungünstige signal-to-noise-ratio zurückzuführen. Teilweise waren die Signale auf den erwarteten Chromosomenenden zwar schwach erkennbar, ihre Stärke reichte jedoch nicht für eine eindeutige Unterscheidung vom Hintergrund aus. Eine digitale Signalverstärkung durch Veränderung der Schwellen im Aufnahmemodus der Cytovision Software verbesserte die Auswertbarkeit nur in sehr sauberen Hybridisierungen, da sie ebenfalls eine Verstärkung des Hintergrundes bewirkte.

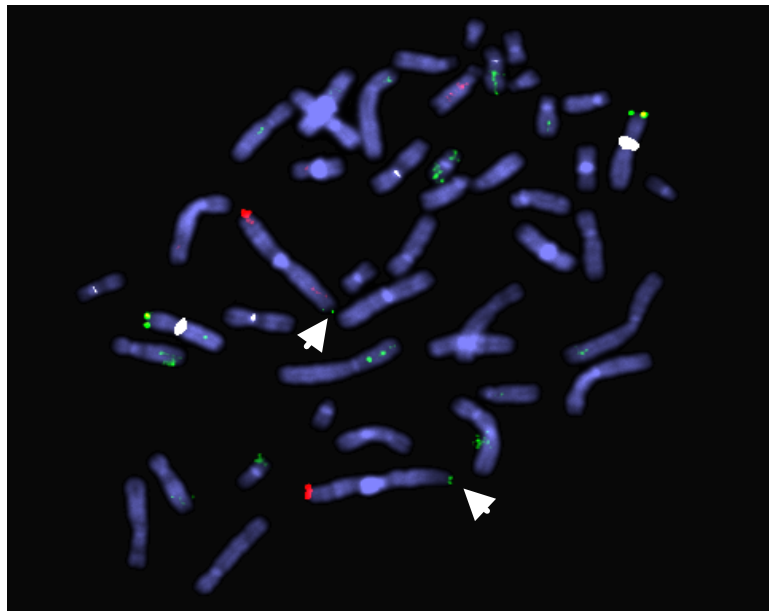


Abbildung 7: Metaphase nach Hybridisierung mit dem ToTelVysion Probe Panel (Ansatz #1). 1p-Signale (grün, Pfeile) weisen im Vergleich zu 1q-Signalen (rot) und Xp-Signalen (gelb) eine geringe Signalintensität auf und sind schwer von gleichfarbigen Hintergrundsignalen zu unterscheiden.

Ein Vergleich der Größen der Sonden des ToTelVysion Probe Panels zeigte, dass die Stärke der Hybridisierungssignale sowie die damit zusammenhängende Hybridisierungseffizienz tendenziell mit der Sondengröße korrelierte. Während schwache Sonden wie beispielsweise 1p, 3p, 6p, 7p, 10p und 13q nur 60-90kb groß waren, umfassten starke Sonden wie 4p, 5p, 20p, 20q dagegen 140-191kb.

Kreuzhybridisierungen wurden bei einer Sonde des ToTelVysion Probe Panels gehäuft beobachtet. Die Sonde 11p hybridisierte mehrfach auf den Chromosomen der G-Gruppe (19, 20), wobei die zusätzlichen Signale zum Teil subtelomerisch lokalisiert waren (Abbildung 8).

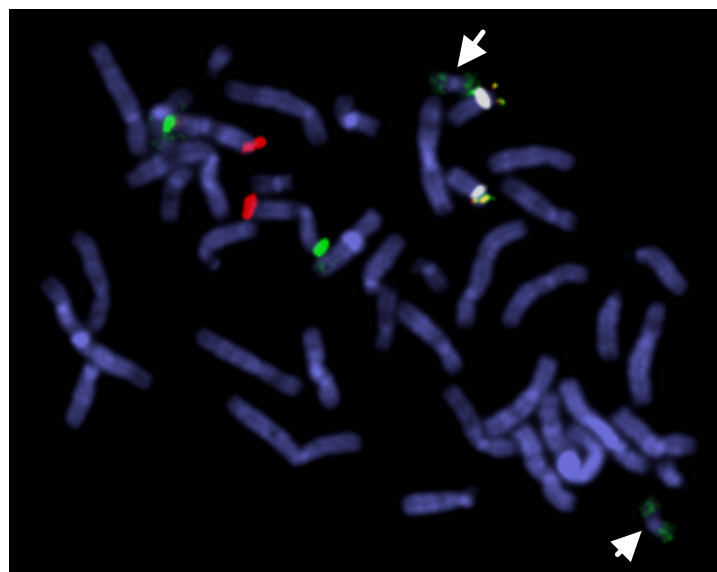


Abbildung 8: Metaphase-Ausschnitt nach Hybridisierung mit dem ToTelVysion Probe Panel (Ansatz #11). Beide Chromosomen 20 (Pfeile) weisen Kreuzhybridisierungen der grün markierten Sonde 11p auf.

Da die Signale meist auf beiden homologen Chromosomen sichtbar waren und sich die Signalmorphologie und -größe dieser Kreuzhybridisierungen von den tatsächlichen 11p Signalen sowie von denjenigen der Sonden 19p und 20p unterschieden, war nach gezielter Auswertung von durchschnittlich fünf Metaphasen pro Sonde dennoch eine eindeutige Zuordnung der Signale gegeben.

Beim ToTelVysion-System waren pro Hybridisierung maximal drei subtelomerisch lokalisierte Sonden voneinander zu differenzieren. Für bestimmte Hybridisierungsansätze war eine eindeutige Unterscheidbarkeit mehrfach nicht gegeben. Dies galt für Ansätze, in denen schwache Sonden (kleines Signal, geringe Intensität) mit starken Sonden (großes Signal, hohe Intensität) in einer Hybridisierung kombiniert waren, wie beispielsweise für den Ansatz #7. Dieser setzte sich aus den starken Sonden 7q (rot) und 14q (grün/rot) und der schwächeren Sonde 7p (grün) zusammen (Abbildung 9). Eine Verstärkung des schwachen 7p Signals durch Veränderung der Schwelle im Aufnahmemodus bewirkte gleichzeitig eine Verstärkung des Grünanteils der Sonde 14q, wodurch die eindeutige Unterscheidbarkeit der rein grün markierten Sonde (7p) und der in der Mischfarbe markierten Sonde (14q) nicht mehr gegeben war. In solchen Fällen konnte nur durch Erhöhung der Anzahl ausgewerteter Metaphasen (bis zu zehn) oder durch Nachhybridisierung eine eindeutige Identifizierung erzielt werden.

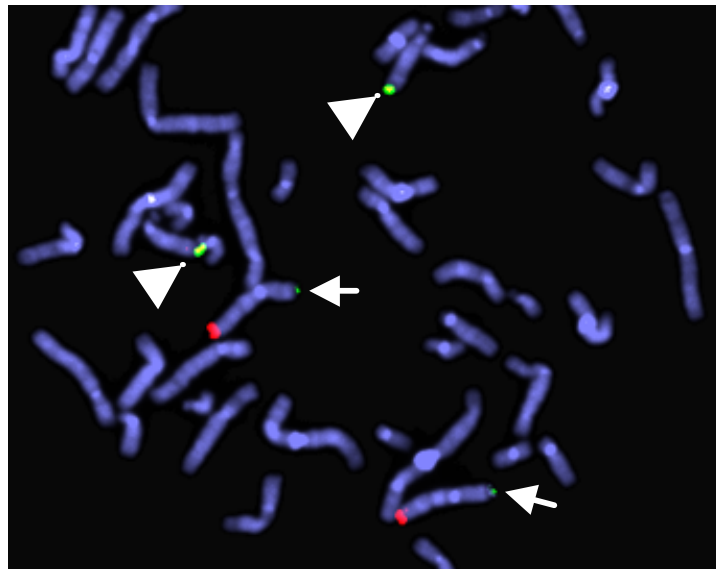


Abbildung 9: Metaphase-Ausschnitt nach Hybridisierung mit dem ToTelVysion Probe Panel (Ansatz #7). Beispiel einer ungünstigen Sondenkombination aus schwachen (7p, grün, Pfeile) und starken (14q, gelb, Pfeilköpfe) Sonden.

Zur Beurteilung einer Subtelomerregion sollte die entsprechende Sonde in wenigstens vier Metaphasen eindeutig identifiziert werden. Die dazu notwendige Mindestzahl auszuwertender Metaphasen wurde anhand fünf repräsentativer Fälle, die durch das ToTelVysion-

System analysiert waren, ermittelt. Für 70% der Sonden reichte die Betrachtung von vier Metaphasen für eine eindeutige Identifizierung der Signale aus. Für 20% der Sonden mussten fünf bis sechs Metaphasen beurteilt werden (Tabelle 8). Die übrigen 10% fraglicher Sonden wurden gezielt in einer höheren Anzahl Metaphasen (bis zu zehn) analysiert. Dabei handelte es sich meistens um Sonden mit schwachen Hybridisierungssignalen (1p, 3p, 6p, 9p), die bei nicht optimaler Präparatqualität, wie beispielsweise bei Präparaten mit viel Cytoplasmaresten, nur schwer von unspezifischen Hintergrundsignalen unterscheidbar waren. Für 4% aller Sonden war auch nach Erhöhung der Auswertung keine abschließende Beurteilung möglich, so dass für diese Nachhybridisierungen durchgeführt werden mussten. Durchschnittlich waren damit pro Sonde des ToTelVysion Probe Panels etwa fünf Metaphasen auszuwerten, um jedes Signal mindestens viermal zu erfassen. Bei 15 Hybridisierungen war für eine vollständige Analyse aller Subtelomere eines Patienten eine Gesamtzahl von durchschnittlich 75 Metaphasen notwendig. Nachuntersuchungen waren bei etwa jedem zweiten Fall für drei Subtelomerregionen erforderlich. Für solche Nachhybridisierungen wurden in der Regel die beliebig kombinierbaren Sonden des eigenen SONDENSSETS eingesetzt, wobei zuvor gesichert wurde, dass sich die detektierten Regionen weitgehend entsprachen. Auf diese Weise wurde vermieden, zur Klärung einzelner fraglicher Regionen jeweils die komplette vorgefertigte Sondenkombination des ToTelVysion Sets hybridisieren zu müssen.

Bei optimaler Qualität der Metaphasepräparate und der Hybridisierung war die Dokumentation und Auswertung sämtlicher Subtelomerregionen eines Patienten mit einem Zeitaufwand von durchschnittlich 8h zu bemessen.

Fazit: Das ToTelVysion-System war bei etwa 86% der Patienten des Bonner MR-Kollektivs anwendbar. Eine vollständige Subtelomeranalyse erforderte 15 Hybridisierungen, pro Patient mussten durchschnittlich 75 Metaphasen ausgewertet werden. Nachhybridisierungen waren bei jedem zweiten Fall für drei Subtelomerregionen notwendig.

notwendige Hybridisierungen / Hybridisierungsregionen	15
Multiplizität	2-3
ausgewertete Metaphasen pro Sonde	4 bei 70% der Sonden, 5-6 bei 20% der Sonden, 7-10 bei 10% der Sonden*
notwendige Nachhybridisierungen pro Fall	1,5
Dauer der Aufnahme und Auswertung pro Fall (im Durchschnitt)	8h

Tabelle 8: Methodische Gegebenheiten des ToTelVysion-Systems. \*4% aller Sonden waren auch nach Auswertung von zehn Metaphasen nicht abschließend beurteilbar und mussten in Nachhybridisierungen analysiert werden.

#### 4.1.2.1 Ergebnisse der Patientenanalysen

Bei fünf der insgesamt 39 Patienten (12,8%) des Bonner MR-Kollektivs wurde durch das ToTelVysion-System eine Aberration der Subtelomerregionen nachgewiesen. Für die übrigen 34 Patienten ergaben die Subtelomeranalysen jeweils ein unauffälliges Ergebnis. Nach Literaturangaben liegt die Häufigkeit, mit der bei Patienten mit idiopathischer MR eine Aberration der Subtelomere detektiert wird, zwischen 0% und 29,4% (Metastudie, Xu et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Detektionsrate kann als Hinweis auf die ausreichende Sensitivität der Sonden des ToTelVysion Probe Panels beim Nachweis subtelomerischer Aberrationen gedeutet werden. Als weiteres Maß für die Sensitivität der Subtelomersonden wurde ihre Entfernung vom jeweiligen Chromosomenende herangezogen. Die exakte Lage der verwendeten Sonden wurde durch *in silico*-Analysen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in Kapitel 4.3 erläutert (vgl. Tabelle 22 im Anhang).

#### 4.1.3 Subtelomeranalysen durch Sechs-Farben-FISH

Zur Beurteilung der Sechs-Farben-FISH wurden Untersuchungen an 19 Patienten des MR-Kollektivs berücksichtigt. Die Charakterisierung des verwendeten eigenen SONDENSETS erfolgte in umfangreichen Vorversuchen (vgl. 3.3.2), wobei jede neue Sonde in Zwei- oder Drei-Farb-Experimenten hinsichtlich ihrer Lokalisation, dem Vorhandensein von subtelomerischen Kreuzhybridisierungen sowie ihrer Signalstärke und Hybridisierungseffizienz bewertet worden war.

##### Quantitative und qualitative Anforderungen an das Untersuchungsmaterial

Die Sechs-Farben-FISH ermöglichte die Darstellung aller 43 relevanten Subtelomerregionen eines Patienten in sieben Hybridisierungen. Dabei wurden unter Verwendung von drei Fluorochromen Multiplizitäten von fünf (Hybridisierung G) bzw. sechs (Hybridisierungen A-F) erreicht (Tabelle 9). Je Patient waren sieben Hybridisierungsareale einer Größe von 21x25mm mit mindestens 12-15 gut gespreiteten Metaphasen erforderlich.

##### Vorbereitung und Durchführung

Bei der gegebenen Größe der Hybridisierungsregionen war eine exakte Einstellung der Zelldichte der Suspension meist nicht notwendig. Zur Auswahl von sieben geeigneten Regionen reichten pro Fall in der Regel vier bis fünf Präparate aus. Die Vorbereitung der Präparate dauerte pro Patient etwa 45min bis 1h.

Vor der Hybridisierung war eine Markierung der 41 Sonden des eigenen SONDENSETS mit den entsprechenden Fluorochromen erforderlich. Für jeden der sieben Hybridisierungsansätze wurde ein Markierungsschema erstellt, in welchem das mit einem bestimmten Fluorochrom

zu markierende Volumen einer Sonde in Abhängigkeit ihrer Konzentration berücksichtigt wurde (vgl. 3.3.3.1). Dies musste bei Verwendung einer neu isolierten Sonde einer Subtelomerregion (neuer *batch*) jeweils leicht angepasst werden.

Die Hybridisierung erfolgte für 48h. Es schlossen sich Stringenzwaschungen an, wobei ein Antikörperrnachweis aufgrund der direkten Markierung der Sonden nicht notwendig war.

### Auswertung

Die Hybridisierungseffizienz jeder Sonde des eigenen Sets war in Vorversuchen durch Analyse von > 200 Metaphasen in = zwei unabhängigen Hybridisierungen bestimmt worden und lag für die Mehrzahl der Sonden über 95%: 24 Sonden zeigten Hybridisierungseffizienzen zwischen 95 und 97%, 14 Sonden zwischen 97 und 99%. Nur drei Sonden (10q, 18p und 18q) wiesen Hybridisierungseffizienzen unter 95% auf. Die Beurteilung der Signalstärke, welche meist mit der Hybridisierungseffizienz korrelierte, ergab für 17 Sonden gute bis sehr gute Ergebnisse, 21 Sonden wiesen mittelstarke Signale auf. Drei Sonden zeigten schwache Hybridisierungssignale (10q, 18p und 18q), welche bei geringerer Hybridisierungsqualität mitunter nicht sichtbar waren. Für die Verwendung der einzelnen Sonden in der Sechs-Farben-FISH bzw. der S-COBRA-FISH wurden die eingesetzten Sondenmengen entsprechend den jeweiligen Signalstärken angepasst.

Nach sorgfältiger Vorauswahl und zahlreichen Vorversuchen konnte ein Set subtelomerischer Sonden zusammengestellt werden, dessen Hybridisierungseigenschaften den hohen Anforderungen von Multi-Colour-FISH-Techniken gerecht wurden. Trotz dieser guten Voraussetzungen konnten bei der Sechs-Farben-FISH nach Auswertung von bis zu zehn Metaphasen pro Sonde mehrere Subtelomerregionen nicht abschließend beurteilt werden, so dass diese jeweils in Nachhybridisierungen (rechnerisch etwa 3,5 Nachhybridisierungen pro Patient, s.u.) untersucht werden mussten. Zu etwa 25% lag die Ursache dieser Nachuntersuchungen in der bei Multiplizitäten von fünf bzw. sechs erhöhten Hintergrundfluoreszenz, welche zu einer Verschlechterung der signal-to-noise-ratio führte. Etwa 15% der Nachhybridisierungen waren auf ein völliges Fehlen von Hybridisierungssignalen oder auf zu schwache Signale zurückzuführen, deren Aussagekraft für die eindeutige Beurteilung einer Subtelomerregion nicht ausreichte. Eine mangelnde Unterscheidbarkeit der sechs differentiell dargestellten Sonden einer Hybridisierung war die Ursache für etwa 60% aller notwendigen Nachhybridisierungen. Zweifarbig markierte Sonden konnten durch die geringe Intensität jeweils einer Farbkomponente häufig nicht von der entsprechenden einfarbigen Sonde derselben Hybridisierung differenziert werden (Abbildung 10). Das Problem einer unzureichenden Unterscheidbarkeit aufgrund der Kombination schwacher und starker Sonden in einer Hybridisierung, wie es bei dem ToTelVysion-System beobachtet wurde, zeigte sich bei der Sechs-Farben-FISH nur selten. Anhand der Informationen aus den umfassenden Voranalysen wurde schon bei der Zusammenstellung der Hybridisierungs-



ansätze die Signalstärke berücksichtigt und es wurden möglichst nur gleichstarke Sonden miteinander kombiniert (vgl. 3.3.3.1).

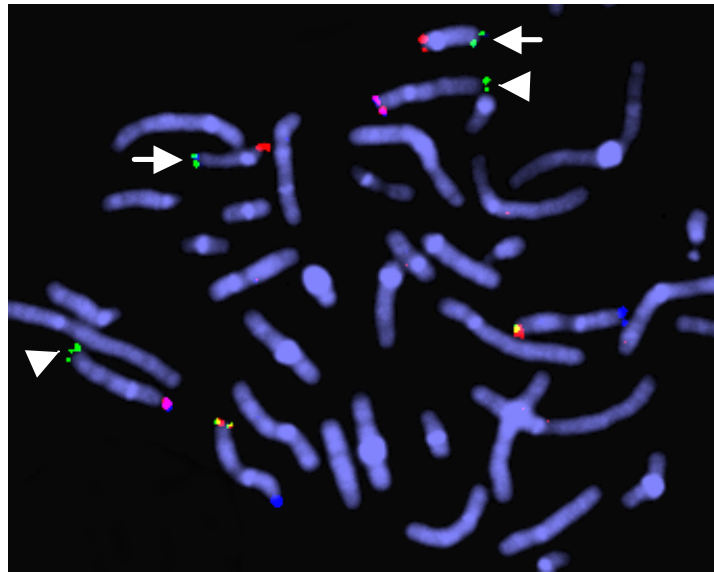


Abbildung 10: Metaphase-Ausschnitt nach Sechs-Farben-FISH (Ansatz E). 18q-Signale („türkis“, Pfeile) sind wegen zu geringem Blauanteil nicht eindeutig von 10q-Signalen (grün, Pfeilköpfe) unterscheidbar.

Für keine der im eigenen Set enthaltenen Sonden wurden konstant auftretende, subtelomerisch lokalisierte Kreuzhybridisierungen beobachtet. Für die Sonde 17p waren interstitielle Kreuzhybridisierungen in 17q bekannt, wodurch die Eindeutigkeit dieser Sonde jedoch nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 11). Für einige Sonden wurden bei Anwendung in Multi-Colour-Experimenten gelegentlich zusätzliche, schwache Signale in bestimmten Chromosomenregionen beobachtet. Bei diesen konnte es sich entweder um tatsächliche Kreuzhybridisierungen oder um Verunreinigungen der verwendeten Sonden handeln. Sämtliche zusätzliche Signale wurden dokumentiert. Bei wiederholtem Auftreten bei unterschiedlichen Patienten wurde das Vorwissen über solche Zusatzsignale bestimmter Sonden bei der Auswertung berücksichtigt, so dass für die betreffenden Regionen teilweise keine Nachhybridisierungen durchgeführt werden mussten.

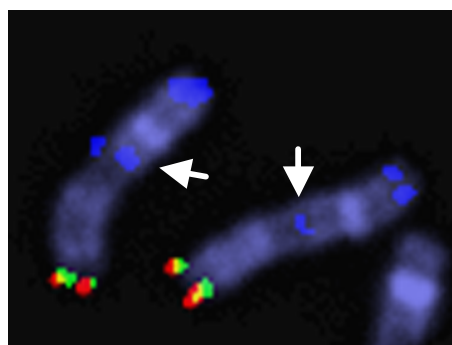


Abbildung 11: Sechs-Farben-FISH mit den Subtelomersonden 17p (blau) und 17q (gelb) (Ausschnitt). Beide Chromosomen 17 weisen interstitielle Kreuzhybridisierungen im q-Arm auf (Pfeile).

Bei der Analyse der Subtelomerregionen durch Sechs-Farben-FISH galt es ebenfalls, jede Sonde in mindestens vier Metaphasen eindeutig zu identifizieren. Es wurden wiederum fünf repräsentative Fälle, welche durch Sechs-Farben-FISH analysiert waren, zur Bestimmung der Mindestzahl auszuwertender Metaphasen herangezogen. Bei der gegebenen Hybridisierungseffizienz von durchschnittlich 95% reichte für etwa 60% der Sonden die Betrachtung von vier Metaphasen aus, für 26% der Sonden mussten fünf bis sechs Metaphasen ausgewertet werden, um jedes Signal mindestens viermal eindeutig zu identifizieren (Tabelle 9). Die übrigen 14% der Sonden wurden gezielt in bis zu vier weiteren Metaphasen analysiert. Für etwa 10% aller Sonden war auch nach dieser erhöhten Auswertung keine abschließende Beurteilung möglich. Im Durchschnitt waren damit pro Sonde etwa fünf Metaphasen auszuwerten. Bei sieben Hybridisierungen mussten für eine vollständige Subtelomeranalyse bei einem Patienten insgesamt etwa 35 Metaphasen beurteilt werden. Nachhybridisierungen waren bei jedem zweiten Fall für etwa sieben Sonden erforderlich. Durch gezielte Zusatzuntersuchungen in Zwei bzw. Drei-Farb-Hybridisierungen konnten unter Verwendung der Sonden des eigenen Sets alle Subtelomerregionen eindeutig ausgewertet werden.

Bei optimaler Qualität der Metaphasepräparate und der Hybridisierung erforderte die Dokumentation und Auswertung einer Sechs-Farben-FISH pro Fall einen zeitlichen Aufwand von durchschnittlich 6h.

Fazit: Für eine vollständige Subtelomeranalyse durch Sechs-Farben-FISH waren sieben Hybridisierungsregionen erforderlich. Diese konnten in der Regel problemlos aus dem für jeden Patienten zur Verfügung stehenden Zellsediment hergestellt werden. Zur Beurteilung aller Subtelomerregionen mussten pro Patient durchschnittlich 35 Metaphasen ausgewertet werden. Nachhybridisierungen waren bei jedem zweiten Fall für sieben Subtelomerregionen notwendig.

notwendige Hybridisierungen / Hybridisierungsregionen	7
Multiplizität	5-6
ausgewertete Metaphasen pro Sonde	4 bei 60% der Sonden, 5-6 bei 26% der Sonden, 7-10 bei 14% der Sonden*
notwendige Nachhybridisierungen pro Fall	3,5
Dauer der Aufnahme und Auswertung pro Fall (im Durchschnitt)	6h

Tabelle 9: Methodische Gegebenheiten der Sechs-Farben-FISH. \*Etwa 10% aller Sonden waren auch nach Auswertung von zehn Metaphasen nicht abschließend beurteilbar und mussten in Nachhybridisierungen analysiert werden.

#### 4.1.3.1 Ergebnisse der Patientenanalysen

Bei zwei der 19 Patienten des Bonner MR-Kollektivs (10,5%) wurde durch Sechs-Farben-FISH eine Aberration der Subtelomerregionen nachgewiesen. Darüber hinaus konnten mit dieser Technik unter Verwendung des eigenen Sondensets sämtliche Aberrationen, welche zuvor durch das ToTelVysion-System detektiert worden waren, bestätigt werden. Falsch positive Ergebnisse wurden nicht beobachtet. Diese Resultate demonstrieren die Spezifität und Sensitivität der Sonden des eigenen Sondensets sowie die Anwendbarkeit der Sechs-Farben-FISH zur Analyse der Subtelomerregionen.

Die exakte Lokalisation der Sonden als Maß für ihre Aussagekraft bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen wurde auch für das eigene Sondenset durch *in silico*-Analysen bestimmt. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3 erläutert (vgl. Tabelle 23 im Anhang).

#### 4.1.4 S-COBRA-FISH

Nach der Etablierung der S-COBRA-FISH wurde die Effizienz und Nachweisgenauigkeit dieser Methode durch Analyse der Subtelomerregionen bei insgesamt 17 Probanden bestimmt. Durch Untersuchung von sieben Negativkontrollen, für welche die Analyse durch das ToTelVysion-System jeweils ein unauffälliges Ergebnis erbracht hatte, sollte unter anderem der Anteil falsch-positiver Resultate ermittelt werden. Die Eignung der S-COBRA-FISH zum Nachweis verschiedenster Arten balancierter und unbalancierter Subtelomeraberrationen wurde durch die Untersuchung von zehn Positivkontrollen mit nachgewiesenen Chromosomenstörungen überprüft.

##### 4.1.4.1 Ergebnisse der Etablierung der S-COBRA-FISH

Die Etablierung der S-COBRA-FISH, deren erster Teil vom Projektleiter am LUMC in Leiden durchgeführt wurde, konnte am Institut für Humangenetik in Bonn erfolgreich abgeschlossen werden (Engels et al., 2003). Grundlegende Techniken wie die DNA-Isolation und DNA-Markierung sowie die Hybridisierungsbedingungen wurden erfolgreich an die Erfordernisse der S-COBRA angepasst. Mit der cleared lysate-Methode wurde eine DNA-Isolationsmethode gefunden, welche die Gewinnung hochreiner DNA mit guten Hybridisierungseigenschaften ermöglichte (vgl. 3.3.3.2.1). Das ULS-Markierungssystem gewährleistete eine starke, effiziente und reproduzierbare Markierung der Sonden-DNA, was eine unabdingbare Voraussetzung für die S-COBRA-FISH darstellte (vgl. 3.3.3.2.3). Die Hybridisierungsbedingungen wurden für die Verwendung von subtelomerischen Sonden optimiert. Auf diesen grundlegenden Techniken aufbauend wurden nach den in Kapitel 3.3.4.1 geschilderten Prinzipien geeignete COBRA-Markierungsschemata (Farbdreiecke) entwickelt. Nach Integration sämtlicher Subtelomersonden in die Farbdreiecke wurde die

Unterscheidbarkeit der Sonden benachbarter *ratio*-Farben durch Erhöhung bzw. Erniedrigung der in verschiedenen Fluorochromen markierten DNA-Anteile in Testhybridisierungen optimiert. Sonden mit geringer Hybridisierungseffizienz oder schwachen Signalen (z.B. 10p, 18p, 18q) wurden durch Erhöhung der jeweils eingesetzten DNA-Menge in ihrer Intensität angeglichen. Die Anwendung der *interactive stretch*-Funktion zur selektiven Verstärkung der Signale ohne gleichzeitige Erhöhung des Hintergrundes stellte eine notwendige Voraussetzung für die Auswertung der COBRA-Hybridisierungen dar. Das durch die hohe Anzahl gleichzeitig eingesetzter Sonden hervorgerufene ungünstigere Verhältnis von Signal- und Hintergrundstärke konnte durch diese Schwellenfunktion deutlich verbessert werden. Auch die Erkennung der binären Markierung zur Unterscheidung gleichfarbig dargestellter Sonden war nach digitaler Signalverstärkung problemlos möglich. Auf diese Weise wurden die angestrebten Multiplizitäten von 20 (Hybridisierung B) bzw. 21 (Hybridisierung A) erreicht, so dass sämtliche euchromatische Subtelomerregionen unter Verwendung von vier Fluorochromen in zwei parallelen Hybridisierungen differentiell darstellbar waren.

#### **4.1.4.2 Subtelomeranalysen durch S-COBRA-FISH**

##### Quantitative und qualitative Anforderungen an das Untersuchungsmaterial

Für die zwei Hybridisierungen mit Multiplizitäten von 20 (Hybridisierung B) bzw. 21 (Hybridisierung A) waren pro Patient zwei Hybridisierungsareale einer Größe von 21x25mm mit mindestens 10-15 qualitativ hochwertigen, gut gespreiteten Metaphasen erforderlich (Tabelle 10).

##### Vorbereitung und Durchführung

Zur Gewinnung von zwei geeigneten Hybridisierungsregionen mussten pro Patient in der Regel zwei Präparate hergestellt werden. Die Vorbereitung der Präparate erforderte etwa 25min.

Wie bei der Sechs-Farben-FISH mussten die 41 Sonden des eigenen SONDENSETS zunächst mit den entsprechenden Fluorochromen markiert werden. Um eine Verschiebung der Mischungsverhältnisse und damit letztlich einen Verlust der Unterscheidbarkeit der Sonden zu vermeiden, mussten die exakten Sondenvolumina, die für die einzelnen Sonden einzusetzen waren, anhand ihrer jeweiligen Konzentrationen sorgfältig bestimmt und in entsprechenden Markierungsschemata eingetragen werden. Bei Verwendung neu isolierter Sonden war jeweils eine leichte Anpassung dieser Markierungsschemata notwendig. Die Zusammenstellung und das Pipettieren einer COBRA-Markierung erwiesen sich aufgrund der hohen Anzahl gleichzeitig in einem Ansatz eingesetzter Sonden als komplex und

zeitaufwendig. Das Pipettieren der zwei Ansätze, welche für die Durchführung von bis zu vier Experimenten ausreichte, dauerte etwa 2-3h.

Die Hybridisierungszeit bei der S-COBRA-FISH betrug 48h. Daran anschließend waren Stringenzwaschungen sowie ein Antikörpernachweis zur Detektion der binären Markierung erforderlich.

### Auswertung

Für die S-COBRA-FISH wurden die Sonden des eigenen SONDENSETS verwendet. Die Hybridisierungseigenschaften dieser Sonden (Hybridisierungseffizienz, Signalstärke, Kreuzhybridisierungen) waren nach strenger Vorauswahl und Charakterisierung sehr gut bis zufrieden stellend (vgl. 4.1.3). Unterstützt durch die *interactive stretch*-Funktion der digitalen Bildauswertung lieferten sie auch beim Einsatz in die S-COBRA-FISH gute Ergebnisse. Nach digitaler Verstärkung waren die Hybridisierungssignale in nahezu allen Metaphasen gut sichtbar und eindeutig vom Hintergrund zu differenzieren (günstige signal-to-noise-ratio). Probleme bei der Auswertung waren fast ausschließlich auf eine unzureichende Unterscheidbarkeit der 20 bzw. 21 differentiell dargestellten Sonden einer Hybridisierung zurückzuführen. Beispielsweise führte die Unterrepräsentation einer bestimmten Farbkomponente („grün“, „rot“ oder „blau“) in einer Metaphase oder Hybridisierung zu einer schlechteren Differenzierbarkeit der Sonden, deren *ratio*-Farbe sich unter anderem aus dieser Farbkomponente zusammensetzte. Auch Schwankungen in den eingesetzten DNA-Mengen beeinflussten die Eindeutigkeit der Signalfarben. In beiden Fällen war eine Identifizierung der Sonden zum Teil erst durch die aufwendige Messung von Fluoreszenzintensitäten (s.u.), zum Teil aber auch erst in Nachhybridisierungen (rechnerisch 1,5 Nachhybridisierungen pro Patient, s.u.) möglich. Neben der Unterscheidbarkeit stellte die Qualität der Metaphasepräparate bei der S-COBRA-FISH einen bedeutenden Faktor dar, welcher die Anzahl der pro Fall auszuwertenden Metaphasen beeinflusste. Um 21 bzw. 22 relevante Chromosomenenden (Xp/q und Yp/q getrennt betrachtet) in einer Metaphase beurteilen zu können, waren vollständige Metaphasen mit einer guten Spreitung der Chromosomen und wenigen Überlagerungen notwendig. Unterzähligkeit oder zahlreiche Chromosomenüberlagerungen resultierten in einer unvollständigen Auswertung, was die Betrachtung weiterer Metaphasen erforderlich machte.

Bei der *Etablierung* der S-COBRA-FISH erfolgten die Auswertungen mit dem Bildanalyseprogramm ColourProc in jeweils drei Stufen: 1.) visuell anhand der überlagerten Falschfarbenbilder 2.) durch Messung der Fluoreszenzintensitäten (Messbereich 0-255 Graustufen) der einzelnen Signale in den verschiedenen Fluorochromkanälen und anschließende Berechnung ihrer Mischungsverhältnisse und 3.) durch *scatter plot*-Analysen (vgl. Abbildung 5).

Bei der *Anwendung* der S-COBRA-FISH zur Analyse der Subtelomerregionen bei den sieben Negativ- und zehn Positivkontrollen wurde die Auswertung primär visuell anhand der Falschfarbenbilder durchgeführt. Die Messung von Fluoreszenzintensitäten wurde nur zur Identifizierung fraglicher Regionen verwendet. *Scatter plot*-Analysen kamen nur noch in Ausnahmefällen zur Abklärung einzelner Regionen zum Einsatz.

Auch bei der S-COBRA-FISH galt es, jede Sonde in mindestens vier Metaphasen eindeutig zu identifizieren. Zur Bestimmung der dazu notwendigen Mindestzahl auszuwertender Metaphasen sowie des jeweils erforderlichen Auswertungsprozesses wurden vier repräsentative Fälle, welche durch S-COBRA-FISH analysiert waren, herangezogen. Nach einer Übungsphase zur Erkennung der spezifischen Signalfarben war es möglich, 75% der Sonden durch eine rein visuelle Auswertung von vier Metaphasen eindeutig zu beurteilen (Tabelle 10). Für 15% der Sonden mussten 5-6 Metaphasen betrachtet werden. Bei diesen war in der Regel zwar eine Unterscheidbarkeit der Signale gegeben, jedoch reichte die Auswertung von vier Metaphasen wegen Unterzähligkeit oder zahlreicher Chromosomenüberlagerungen nicht für eine abschließende Beurteilung aus. Für etwa 10% der Sonden war auch nach gezielter Betrachtung dieser 5-6 Metaphasen keine eindeutige Unterscheidbarkeit anhand des visuellen Auswertungsverfahrens gegeben. Um diese fraglichen Sonden dennoch zu identifizieren und damit zahlreiche Nachhybridisierungen zu vermeiden, wurden vier der zuvor visuell ausgewerteten Metaphasen zusätzlich durch Intensitätsmessungen analysiert. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Signale wurden in den verschiedenen Fluorochromkanälen gemessen und die Mischungsverhältnisse berechnet. Anschließend wurden die Mischungsverhältnisse der fraglichen Sonden verglichen. Für 4% der Sonden war auch nach diesen aufwendigen Zusatzanalysen keine abschließende Beurteilung möglich, so dass sie in Nachhybridisierungen untersucht werden mussten. Basierend auf den Ergebnissen der beiden parallel angewandten Auswertungsverfahren mussten für eine komplette Subtelomeranalyse durch zwei Hybridisierungen pro Patient etwa 18 Metaphasen beurteilt werden. Nachhybridisierungen ergaben sich ungefähr bei jedem zweiten Patient für drei Regionen.

Durch gezielte Nachuntersuchungen in Zwei- bzw. Drei-Farb-Hybridisierungen war für alle fraglichen Sonden eine eindeutige Identifizierung möglich.

Die Aufnahme und Auswertung der COBRA-Hybridisierungen dauerte im Idealfall pro Patient mindestens 6h. Bei schlechter Qualität der Präparate und der Hybridisierungen war mit einem Zeitaufwand von bis zu 13,5h zu rechnen. Als Durchschnittswert kann ein zeitlicher Aufwand von 10h angegeben werden. Es ist jedoch zu beachten, dass dieser zeitliche Rahmen nur von einem geübten Auswerter realisiert werden konnte.

Fazit: Für eine vollständige Subtelomeranalyse durch S-COBRA-FISH waren zwei Hybridisierungsregionen erforderlich. Diese konnten problemlos aus dem für jeden Probanden zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterial hergestellt werden. Nach S-COBRA-FISH mussten pro Patient durchschnittlich 18 Metaphasen ausgewertet werden. Nachhybridisierungen ergaben sich bei jedem zweiten Fall für drei Subtelomerregionen.

notwendige Hybridisierungen / Hybridisierungsregionen	2
Multiplizität	20-21
ausgewertete Metaphasen pro Sonde	<b>visuell:</b> 4 bei 75% der Sonden, 5-6 bei 15% der Sonden <b>visuell / Intensitätsmessung:</b> 7-10 bei 10% der Sonden*
notwendige Nachhybridisierungen pro Fall	1,5
Dauer der Aufnahme und Auswertung pro Fall (im Durchschnitt)	10h

Tabelle 10: Methodische Gegebenheiten der S-COBRA-FISH. \*Von den visuell ausgewerteten 5-6 Metaphasen wurden vier zusätzlich durch Intensitätsmessung analysiert. Etwa 4% aller Sonden waren auch nach Kombination der beiden Auswertungsverfahren nicht abschließend beurteilbar und mussten in Nachhybridisierungen analysiert werden.

#### 4.1.4.2.1 Validierung der S-COBRA-FISH

Durch die Analyse der Subtelomere bei Probanden mit normalem Karyotyp (Negativkontrollen) wurde die Spezifität der S-COBRA-FISH bestimmt. Sämtliche Subtelomerregionen konnten korrekt identifiziert werden. Es ergaben sich keine falsch-positiven Ergebnisse. Damit war die Anwendbarkeit des COBRA-Prinzips auf Locus-spezifische Sonden der Subtelomere sowie die hohe Spezifität der Methode bewiesen.

Die Sensitivität der S-COBRA-FISH wurde durch Untersuchung von zehn Patienten mit Subtelomeraberrationen (Positivkontrollen) überprüft (vgl. Tabelle 3). Die Mehrzahl dieser Fälle diente entweder als komplette Blinduntersuchung (Fälle 1, 4, 6 und 8) oder es sollte zuvor nachgewiesenes, zusätzliches Chromosomenmaterial identifiziert werden (Fälle 3 und 9). Bei den übrigen Fällen sollte eine schon bekannte Subtelomeraberration durch S-COBRA-FISH detektiert werden (Fälle 2a, 2b, 5, und 7).

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Sämtliche Fälle wurden erfolgreich analysiert. Es traten weder falsch-negative noch falsch-positive Ergebnisse auf.

In den Fällen 1, 2a und 3 konnten unbalancierte Translokationen (Abbildung 12b, Abbildung 13c) in den Fällen 2b, 4 und 5 balancierte Translokationen (Abbildung 12a, Abbildung 13a und b), und in den Fällen 6, 7 und 8 Deletionen (Abbildung 13d) diagnostiziert werden. Fall 9 demonstrierte die Eignung der S-COBRA-FISH zur Detektion intrachromosomaler Aberrationen wie perizentrischer Inversionen (Abbildung 13e). Darüber hinaus wurde durch S-COBRA-FISH ein zuvor unbekanntes Mosaik mit einem relativ hohen Anteil aberranter Zellen detektiert, wodurch die hohe Effizienz der Methode bestätigt wurde.

Fall	Information vor COBRA-FISH	Ergebnis der S-COBRA-FISH	Aberration	Interpretation
1	„kryptische subtelomerische Chr. Aberration“	zusätzliches 11pter-Signal in 4q35, 4qter-Signal deletiert	der(4)t(4;11) (q35;p15) unbalancierte kryptische Translokation	Aberration detektiert
2a	bekannte unbal. Translokation t(11;16)(q25;q24)	zusätzliches 16qter-Signal in 11q25, 11qter-Signal deletiert	der(11)t(11;16) (q25;q24) unbalancierte kryptische Translokation	Aberration bestätigt
2b	bekannte bal. Translokation t(11;16)(q25;q24) (Mutter von Fall 2a)	reziproke Translokation von 11qter- und 16qter-Signalen	t(11;16)(q25;q24) balancierte kryptische Translokation	Aberration bestätigt
3	unbekanntes Material in 4q35 der(4)add(4)(q35)	zusätzliches 11pter-Signal in 4q35, 4qter-Signal deletiert	der(4)t(4;11) (q35;p15) unbalancierte Translokation	unbekanntes Material identifiziert
4	„kryptische subtelomerische Chr. Aberration“	reziproke Translokation von 2qter- und 6pter-Signalen	t(2;6)(q37;p25) balancierte kryptische Translokation	Aberration detektiert
5	bekannte bal. Translokation t(1;16)(p36;p13.3)	reziproke Translokation von 1pter- und 16pter-Signalen	t(1;16)(p36;p13.3) balancierte kryptische Translokation	Aberration bestätigt
6	„kryptische subtelomerische Chr. Aberration“	1qter-Signal deletiert	del(1)(q44) kryptische Deletion	Aberration detektiert
7	bekannte Deletion del(2)(q37.3)	2qter-Signal deletiert	del(2)(q37.3) kryptische Deletion	Aberration bestätigt
8	„kryptische subtelomerische Chr. Aberration“	2qter-Signal deletiert	del(2)(q37.3) kryptische Deletion	Aberration detektiert
9	unbekanntes Material in 1p terminal	1qter-Signal in 1p36, 1pter-Signal deletiert (in 11/16 Zellen)	Mosaik rec(1)dup(1q)inv(1) (p36.1q42)	unbekanntes Material identifiziert

Tabelle 11: Validierung der S-COBRA-FISH durch Analyse von Positivkontrollen. Chr.Aberration: Chromosomenaberration.



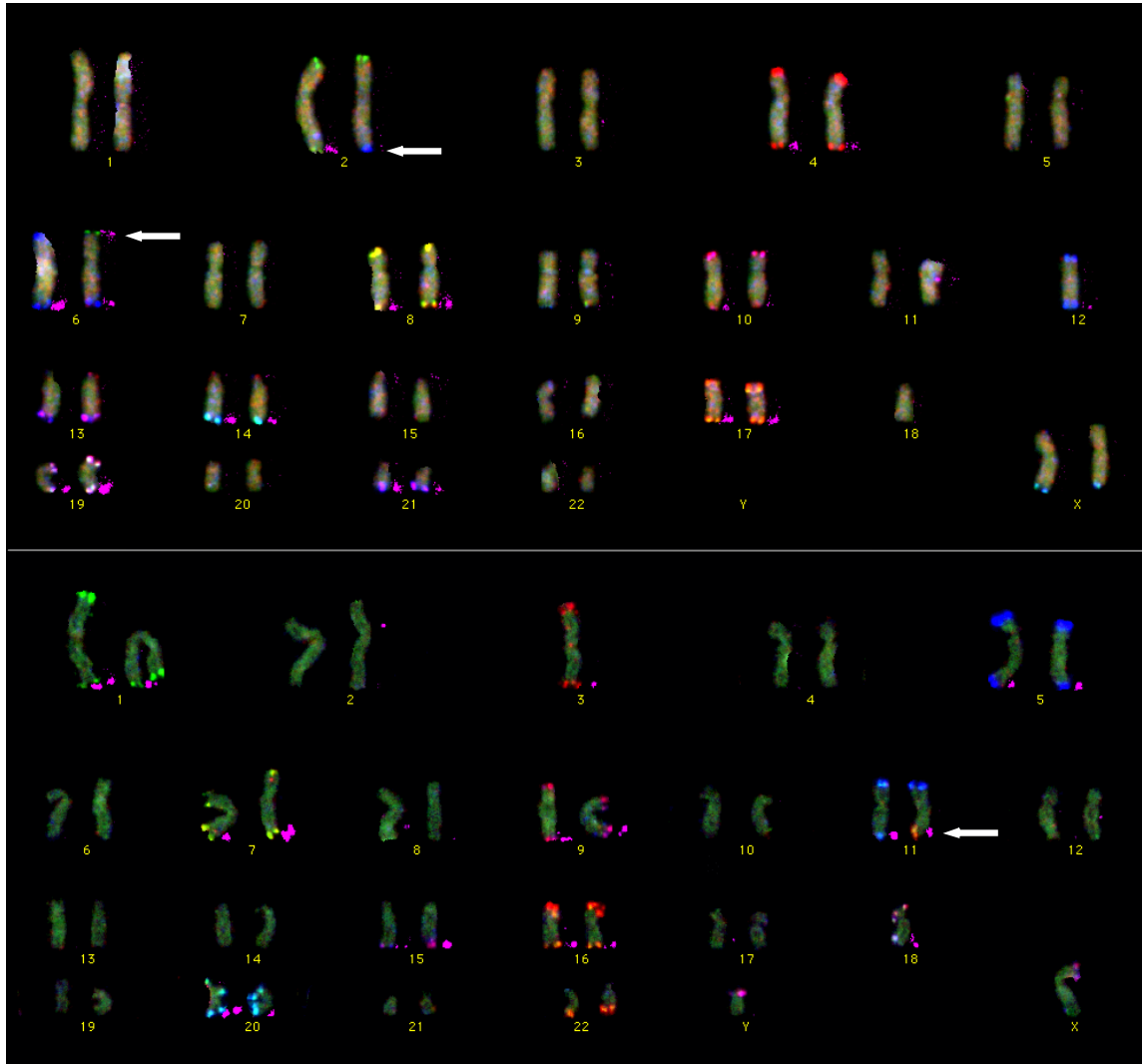


Abbildung 12: Durch S-COBRA-FISH analysierte Metaphasen in Karyogrammdarstellung. (a) (oben): Sondenset B (Subtelomere der Chromosomen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 17, 19, 21, XqYq). (b) (unten): Sondenset A (Subtelomere der Chromosomen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 16, 18, 20, 22, XpYp). *Ratio*-Signale sind auf den Chromosomen, binäre Signale in pink rechts neben den Chromosomen dargestellt. Schwache oder fragliche Signale sowie fehlende Chromosomen wurden in anderen Metaphasen erfolgreich analysiert. (a) Fall 4, Hybridisierung B: balancierte Translokation der Signale 2qter und 6pter (Pfeile). (b) Fall 2a, Hybridisierung A: unbalancierte Translokation eines 16qter-Signals auf 11qter (Pfeil). Trotz geringer Hybridisierungsqualität mit granulärer Morphologie war eine eindeutige Analyse möglich: Eine Verwechslung der zunächst ähnlich erscheinenden 16qter und 22qter-*ratio*-Signale war anhand der binären Markierung in 16qter ausgeschlossen.

Im Folgenden werden die in Abbildung 13 dargestellten S-COBRA-FISH-Ergebnisse der Positivkontrollen erläutert. Die Zuordnungen der Signalfarben sind den Markierungsschemata der Hybridisierungen A (Sondenset A) und B (Sondenset B) in Abbildung 6 zu entnehmen.

Fall 2b, Abbildung 13a: Die Ergebnisse der Hybridisierung A zeigten eine balancierte Translokation der Signale 11qter und 16qter.

Fall 5, Abbildung 13b: Nach Hybridisierung mit dem Sondenset A war ein reziproker Austausch der Signale 1p und 16p erkennbar.

Fall 3, Abbildung 13c: Nach Hybridisierung mit dem Sondenset B fehlte an einem Chromosom 4 das 4qter-spezifische Signal (links). Mit dem Sondenset A konnte ein zusätzliches 11pter Signal in 4qter (Mitte) nachgewiesen werden. Die Signale der Chromosomen 11 waren regelrecht (rechts).

Fall 6, Abbildung 13d: Nach Hybridisierung mit dem Sondenset A fehlte an einem Chromosom 1 das 1qter-spezifische Signal. Keine andere Sonde hybridisierte in dieser Chromosomenregion.

Fall 9, Abbildung 13e: Die Ergebnisse der Hybridisierung A zeigten an beiden Chromosomen 1 sowohl im kurzen als auch im langen Arm identische *ratio*-Signale, welche sich im Normalzustand durch An- (1qter) oder Abwesenheit (1pter) der binären Markierung unterschieden. Im hier dargestellten Fall zeigte das derivative Chromosom 1 an beiden Enden ein 1qter-spezifisches Signal mit binärer Markierung. Dieses Ergebnis entsprach einer unbalancierten perizentrischen Inversion 1 mit einer Deletion 1pter und einer Duplikation 1qter.

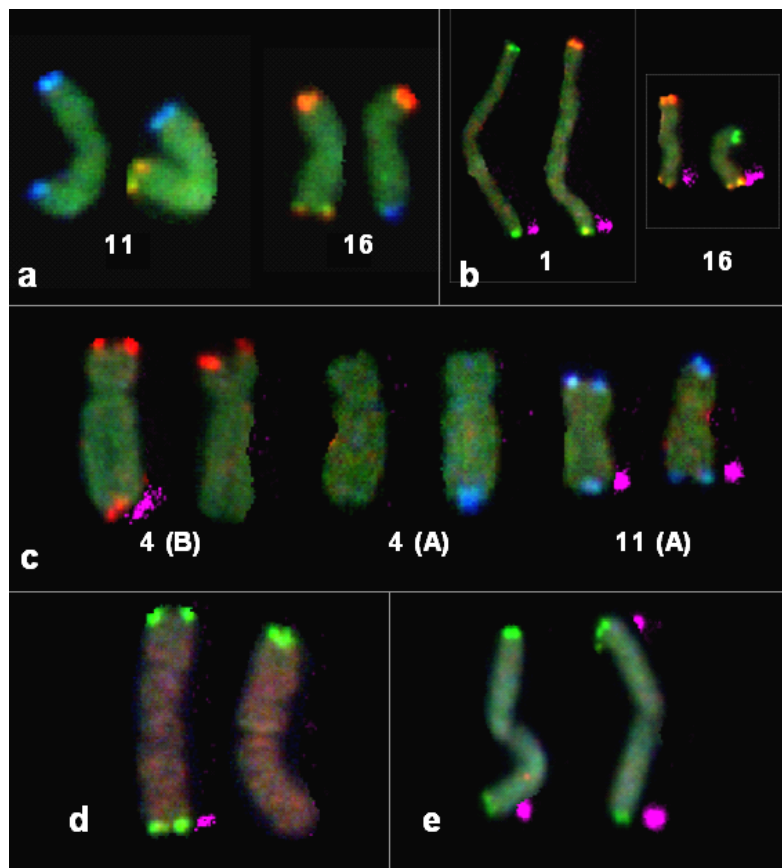


Abbildung 13: Teilkaryogramme, Beispiele durch S-COBRA-FISH detektierter balancierter (a, b) und unbalancierter (c) Translokationen, Deletionen (d) und Inversionen (e). Derivative Chromosomen sind jeweils rechts abgebildet. Binäre Signale sind in pink rechts neben den Chromosomen dargestellt. Erläuterung im Text.

Die hohe Spezifität und Nachweisgenauigkeit der S-COBRA-FISH konnte in den Validierungsexperimenten gezeigt werden. Nach Analyse von durchschnittlich 18 Metaphasen war in jedem Fall eine korrekte Identifizierung aller 43 relevanten Subtelomere gegeben, es traten weder falsch-negative noch falsch-positive Ergebnisse auf. Durch Untersuchung der sieben Positivkontrollen konnte die Eignung der S-COBRA-FISH zum Nachweis sämtlicher Arten balancierter und unbalancierter Aberrationen der Subtelomere bewiesen werden.

#### 4.1.5 Methodischer Vergleich der FISH-Techniken

In Tabelle 12 sind die wichtigsten methodischen Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit angewandten FISH-Techniken gegenübergestellt. Für eine vollständige Analyse aller 43 relevanten Subtelomerregionen eines Patienten durch das ToTelVysion-System waren 15 Hybridisierungen notwendig. Dabei wurden unter Verwendung von zwei Fluorochromen Multiplizitäten von maximal drei erreicht. Bei der Subtelomer-Sechs-Farben-FISH war dagegen mit drei Fluorochromen bei Multiplizitäten von fünf bis sechs eine komplette Analyse der Subtelomere in sieben Hybridisierungen gegeben. Mit der S-COBRA-FISH wurden mit vier Fluorochromen Multiplizitäten von 20 bzw. 21 erreicht, so dass eine vollständige Subtelomeranalyse in zwei Hybridisierungen möglich war.

Die Vorbereitung der Präparate erforderte beim Vysis-System etwa 2h, bei der Sechs-Farben-FISH etwa 45min bis 1h und bei der S-COBRA-FISH etwa 25min. Während die Subtelomersonden des Vysis-Systems direkt markiert waren und gebrauchsfertig vorlagen, mussten die bei der Sechs-Farben-FISH und der S-COBRA-FISH eingesetzten Sonden des eigenen SONDENSETS zunächst mit den gewünschten Fluorochromen markiert werden. Die Hybridisierungszeiten lagen beim Vysis-System bei 16h, bei den anderen beiden Methoden jeweils bei 48h. Nur bei der S-COBRA-FISH war nach der Hybridisierung ein Antikörpernachweis zur Detektion der indirekt markierten Sonden notwendig.

Die Auswertung der FISH-Analysen erfolgte beim Vysis-System und Sechs-Farben-FISH rein visuell. Bei der S-COBRA-FISH wurden zur eindeutigen Unterscheidung fraglicher Regionen zusätzlich Messungen der Fluoreszenzintensitäten durchgeführt. Zur vollständigen Analyse sämtlicher relevanten Subtelomerregionen eines Patienten waren beim Vysis-System durchschnittlich 75, bei der Sechs-Farben-FISH 35 und bei der S-COBRA-FISH 18 Metaphasen auszuwerten. Nachhybridisierungen waren beim Vysis-System und bei der S-COBRA-FISH rechnerisch für jeweils 1,5, bei der Sechs-Farben-FISH für 3,5 Regionen pro analysiertem Fall erforderlich (Tabelle 12).

Der zeitliche Aufwand für die komplette Aufnahme und Auswertung eines Falles lag beim Vysis-System im Durchschnitt bei 8h, bei der Sechs-Farben-FISH bei 6h und bei der S-COBRA-FISH bei 10h. Während diese Arbeitsschritte bei den zuerst genannten Methoden

wenig komplex waren und auch von einem ungeübten Auswerter durchgeführt werden konnten, waren bei der S-COBRA-FISH große Erfahrungen des Untersuchers erforderlich.

methodische Eigenschaften	ToTelVysion-System	Sechs-Farben-FISH	S-COBRA-FISH
notwendige Hybridisierungen bzw. Hybridisierungsregionen	15	7	2
Multiplizitäten	2-3	5-6	20-21
Dauer der Vorbereitung der Präparate	2h	45min-1h	25min
Markierung notwendig	nein	ja	ja, aufwendig
Hybridisierungszeit	16h	48h	48h
Detektion indirekter Markierungen	nein	nein	ja
ausgewertete Metaphasen pro Fall (im Durchschnitt)	75	35	18
notwendige Nachhybridisierungen pro Fall	1,5	3,5	1,5
Dauer der Aufnahme und Auswertung pro Fall (im Durchschnitt)	8h	6h	10h

Tabelle 12: Gegenüberstellung des Untersuchungsaufwandes der drei angewandten FISH-Techniken.

## 4.2 MAPH

In der vorliegenden Arbeit wurden 76 Fälle des Bonner MR-Kollektivs in 16 MAPH-Experimenten hinsichtlich des Vorliegens subtelomerischer Aberrationen untersucht. Pro MAPH-Experiment wurde die DNA von zwölf Patienten (Test-DNA) eingesetzt. Jede dieser Test-DNAs wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten analysiert. Eine solche zweifache Analyse war in 68 Fällen erfolgreich: Bei 53 dieser Fälle war eine Auswertung der zwei Experimente im ersten Versuchsansatz möglich, die Standardabweichung über alle Sonden lag jeweils unter der festgelegten Schwelle von 0,15 (Tabelle 13). In 15 Fällen war dagegen zunächst nur eines der beiden Experimente des ersten Ansatzes analysierbar. Eine Auswertung des zweiten Experimentes war entweder wegen einer Standardabweichung über 0,15 (n=9) oder wegen eines misslungenen MAPH-Experimentes nicht möglich (z.B. nicht ausreichende Amplifikation, geringe Bandenintensität im Gellauf; n=6). Diese Untersuchungen wurden wiederholt. Bei acht weiteren Fällen war eine Untersuchung der Subtelomerregionen durch MAPH nicht möglich. Jede dieser acht Test-DNAs wurde in mindestens zwei Experimente eingesetzt, welche jedoch aufgrund einer zu starken Streuung der ermittelten relativen Peakhöhen (Standardabweichung über alle Sonden >0,15) nicht auswertbar waren.

Damit konnten insgesamt 68 Fälle des Bonner MR-Kollektivs erfolgreich durch MAPH analysiert werden. Für etwa jeden fünften Fall waren drei anstelle von zwei MAPH-Experimenten notwendig. Etwa jeder zehnte Fall des Kollektivs konnte nicht durch MAPH analysiert werden.

Anzahl notwendiger MAPH-Experimente	Anzahl der Fälle
Auswertung nach zwei MAPH-Experimenten möglich	n=53
Auswertung nach drei MAPH-Experimenten möglich	n=15
nicht durch MAPH analysierbar	n=8
Summe	n=76

Tabelle 13: Analysierbarkeit der Patienten-DNAs durch MAPH.

Die 68 erfolgreich analysierten Fälle konnten verschiedenen Gruppen des MAPH-Kollektivs zugeordnet werden (Tabelle 14). Die erste Gruppe umfasste 51 Patienten, bei denen durch Subtelomer-FISH (n=48) bzw. durch MAPH (LUMC, Leiden) (n=13) das Vorliegen von Subtelomeraberrationen bereits ausgeschlossen worden war. Zehn Fälle waren durch beide Techniken analysiert worden. Die 51 Fälle dienten als Negativkontrollen.

Die zweite Gruppe bestand aus sieben Positivkontrollen, für die bereits eine Aberration der Subtelomere nachgewiesen worden war.

Die dritte Gruppe umfasste zehn Fälle, bei denen die Ergebnisse der Subtelomeranalysen durch FISH zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht vorlagen, sie wurden prospektiv durch MAPH untersucht.

Gruppe des MAPH-Kollektivs	Anzahl der Fälle
Retrospektiv analysierte Fälle ohne bekannte Aberrationen (Negativkontrollen)	n=51
Retrospektiv analysierte Fälle mit bekannten Aberrationen (Positivkontrollen)	n=7
Prospektiv analysierte Fälle, Ergebnis unabhängiger Subtelomeranalysen unbekannt	n=10
Summe	n=68

Tabelle 14: Gliederung des erfolgreich analysierten MAPH-Kollektivs.

Für die MAPH-Analysen kamen zwei Sondensets (Set A und Set B) zum Einsatz, wobei das Sondenset B die überarbeitete und ergänzte Ausführung des Sondensets A darstellte. Von den 68 Fällen, für die Ergebnisse aus zwei Experimenten vorlagen (15 Fälle beruhten auf drei Versuchsansätzen), wurden drei ausschließlich unter Verwendung des Sets A und 46 ausschließlich unter Verwendung des Sets B analysiert. Bei 19 Fällen kam für das erste Experiment das Set A, für das zweite das Set B zum Einsatz.

#### 4.2.1 Eigenschaften der MAPH-Sonden

Zunächst wurde das Sondenset A, welches 36 Subtelomer-spezifische Sonden enthielt, zur Etablierung der MAPH am Institut für Humangenetik in Bonn eingesetzt. Parallel wurde dieses Set am LUMC in Leiden überarbeitet, indem nicht informative Sonden ersetzt und fehlende Sonden ergänzt wurden. Das so modifizierte zweite Sondenset (Set B) enthielt

Sonden für 43 Subtelomerregionen. Dabei war die Region 12q durch zwei Sonden abgedeckt, während für die Region 16q keine Sonde zur Verfügung stand. Diejenigen Sonden, die im Rahmen der Überarbeitung des Sets A ausgetauscht wurden (zwei Sonden), wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher charakterisiert. Für sechs Subtelomerregionen (5q, 11p, 12q, 17q, 19q, 20p) war nur im Set B eine entsprechende Sonde enthalten.

Die Charakterisierung der Sonden erfolgte nach drei Kriterien: 1. ihrer eindeutigen Identifizierbarkeit nach dem Gellauf und der graphischen Darstellung der Sondenpeaks, 2. ihrer Standardabweichung und 3. ihrer Spezifität. Es wurden die Daten aus 16 MAPH-Experimenten herangezogen, wobei die Standardabweichung der einzelnen Sonden über 118 Test-DNAs bestimmt wurden. Insgesamt wurden fünf Sonden des Sets B von der Bewertung ausgeschlossen (1p, 5p, 20p, 22q, Xp). Die Ursachen für diesen Ausschluss werden im Folgenden näher erläutert.

### 1. Charakterisierung der MAPH-Sonden nach graphischer Darstellung der Sondenpeaks

Im Rahmen der Auswertung eines MAPH-Experimentes wurden unter Verwendung der Software-Programme GeneScan und Genotyper die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Units (U); Ordinate) gegen die Sondenlänge in Basenpaaren (bp; Abszisse) graphisch aufgetragen. Abbildung 14 zeigt ein entsprechendes Peakmuster für das Sondenset B.

42 der 43 im Set B enthaltenen Subtelomersonden konnte anhand ihrer Länge ein spezifischer Peak zugeordnet werden. Eine Ausnahme bildete die theoretisch 274 bp lange Sonde 20p. Für diese konnte kein eindeutiger und konstanter Peak identifiziert werden, sie wurde aus der Bewertung ausgeschlossen.

Es ließen sich deutliche Unterschiede in der Höhe der Peaks einzelner Sonden erkennen. Der Peak der Sonde 10p war beispielsweise klein im Vergleich zum Peak der Sonde 4q (Abbildung 14, Pfeile). Die Relation der Peakhöhen zueinander war jedoch, eine normale Kopienzahl der untersuchten Loci vorausgesetzt, über verschiedene MAPH-Experimente und Test-DNAs weitgehend konstant. Da die Höhe der Peaks proportional war zur Menge der hybridisierten Sonden und damit ein Maß für die Kopienzahl der untersuchten genomischen Regionen im Testgenom darstellte, konnten Veränderungen der Peakhöhen als potentielle Kopienzahlveränderungen gewertet werden. Bekannte Aberrationen waren in der Regel bereits visuell als Veränderung der Peakhöhe erkennbar. Für die Auswertbarkeit von MAPH-Experimenten galt, dass die Peakhöhen innerhalb des Intensitätsintervalls von 600-6000U liegen sollten. Peaks, die außerhalb dieses Intervalls lagen, erwiesen sich als unzuverlässig.

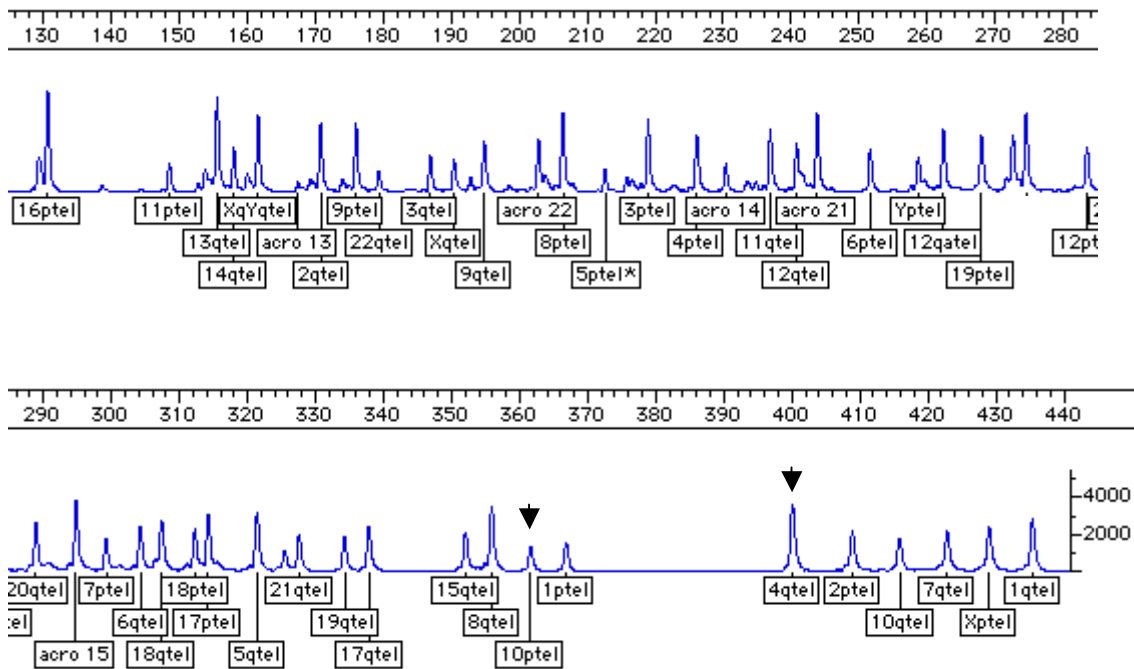


Abbildung 14: Genescan-Peakmuster des MAPH-Sondensets B, Analyse einer Test-DNA ohne Subtelomeraberration (Auftragung nach Sondenlänge), (Sonden acro 13, acro 14, acro 15, acro 21, acro 22 wurden nicht berücksichtigt).

## 2. Standardabweichungen der MAPH-Sonden

Die Standardabweichung der MAPH-Sonden wurde als Maß für ihre Zuverlässigkeit angesehen. Eine Sonde wurde als zuverlässig bezeichnet, wenn ihre Standardabweichung über alle Test-DNAs kleiner oder gleich 0,15 war. 39 der 42 Subtelomersonden (ungeachtet der zuvor bereits ausgeschlossenen Sonde 20p) wiesen Standardabweichungen zwischen 0,07 und 0,15 auf (vgl. Tabelle 26 im Anhang). Drei Subtelomersonden (1p, 5p, 22q) wurden aufgrund einer Standardabweichung größer 0,15 als unzuverlässig erachtet. Dabei war die Sonde 1p in 50%, die Sonde 5p in 31% und die Sonde 22q in 44% aller durchgeführten MAPH-Experimente wegen Überschreitung des Schwellenwertes (0,15) nicht auswertbar.

Wie oben erwähnt, wurde die Subtelomerregion 12q durch zwei Sonden abgedeckt (vgl. 3.4.1.2). Für die Sonde 12q(a) ergab sich eine Standardabweichung von 0,13, für die Sonde 12q(b) von 0,09, so dass beide als zuverlässig bewertet wurden (vgl. Tabelle 26 im Anhang). Die Sonde 12q(a) wies im Vergleich zur Sonde 12q(b) eine um ca. 1,9Mb geringere Distanz zum Telomer auf. Sie wurde aufgrund ihrer höheren Sensitivität für die nachfolgenden Analysen der Subtelomerregion 12q berücksichtigt.

## 3. Spezifität der MAPH-Sonden

Die Spezifität der Sonden 2p, 5p, 7q, 8q, 16p, 14q, 22q und XqYq konnte durch die Analyse von Fällen mit bekannten Subtelomeraberrationen überprüft werden. Die MAPH-Ergebnisse dieser Positivkontrollen werden gesondert dargestellt (vgl. 4.2.4).

### Spezifität der Subtelomersonden Xp und Xq

In fünf der 16 durchgeführten MAPH-Experimente wurde die DNA männlicher und weiblicher Patienten parallel analysiert. Um den Dosisunterschied X-gekoppelter Loci zwischen beiden Geschlechtern auszugleichen, erfolgte eine Normierung durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor (vgl. 3.4.3.1). Dieser wurde für die Sonden Xp bzw. Xq in jedem Experiment einzeln ermittelt. Für den Korrekturfaktor der Sonde Xq wurden in den verschiedenen Experimenten Werte zwischen 1,60 und 1,97 bestimmt, der Mittelwert lag bei 1,80. Dieser beobachtete mittlere Korrekturfaktor lag nahe dem theoretisch zu erwartenden Faktor zwei. Da eine deutliche Unterscheidung der Kopienzahl der durch die Sonde Xq detektierten Sequenz zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht gegeben war, wurde die Sonde Xq als spezifisch angesehen.

Dagegen konnte unter Verwendung der Sonde Xp kein Unterschied in der Kopienzahl zwischen beiden Geschlechtern beobachtet werden. Der berechnete Korrekturfaktor für diese Sonde lag im Mittel bei 1,09, die Einzelwerte schwankten zwischen 0,99 und 1,42. Diese Abweichung vom Erwartungswert (zwei) lässt sich durch eine Variabilität der durch die MAPH-Sonde detektierten Sequenz oder durch Homologien zwischen der Sondensequenz und verschiedenen Regionen im Genom erklären. Aufgrund der mangelnden Spezifität wurde die Sonde Xp als unzuverlässig bewertet.

### Zusammenfassung

Insgesamt lieferten 38 der 43 Subtelomersonden des Sets B zuverlässige Ergebnisse. Drei Sonden wurden aufgrund zu hoher Standardabweichungen (größer 0,15) als unzuverlässig angesehen (1p, 5p, 22q), einer Sonde (20p) war kein spezifischer Peak zuzuordnen. Die Sonde Xp ermöglichte keine Unterscheidung der Kopienzahl X-chromosomaler Loci zwischen den Geschlechtern. Sie wurde ebenfalls von der Bewertung ausgeschlossen. Für die Untersuchung der Subtelomerregion 12q wurde nur eine der beiden im Set enthaltenen Sonden (12q(a)) berücksichtigt.

In die nachfolgenden MAPH-Ergebnisse gingen damit die Analysen von 37 zuverlässigen Subtelomersonden ein.

## **4.2.2 Beobachtete Resultate der MAPH, ihre Kombination und Wertung**

Im Folgenden werden die beobachteten Resultate der MAPH-Experimente sowie die möglichen Ergebniskombinationen aus jeweils zwei Experimenten näher erläutert. Zudem werden die verwendeten Kriterien zur Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten dargelegt.



#### 4.2.2.1 Verwendete Schwellenwerte

Zur Ermittlung der günstigsten Kriterien zur Auswertung der MAPH-Experimente wurden verschiedene Schwellenwerte als Grenzen zwischen normalen Kopienzahlen und potentiellen Kopienzahlveränderungen eingesetzt: Als *enge* Schwellenwerte wurden Abweichungen um größer oder gleich zwei Standardabweichungen (2SD) vom Median ( $X_M \pm 2SD$ ) angewandt, als *weite* Schwellenwerte Abweichungen um größer oder gleich drei Standardabweichungen (3SD) ( $X_M \pm 3SD$ ). Beim zuerst genannten strengeren Kriterium wurden die Schwellenwerte demnach so gewählt, dass ein MAPH-Ergebnis schon bei einer relativ geringen Abweichung vom Median als auffällig bewertet wurde. Beim weniger strengen Kriterium der dreifachen Standardabweichung waren die Schwellenwerte dagegen weiter gefasst, ein MAPH-Ergebnis wurde erst bei einer starken Abweichung vom Median als auffällig angesehen.

#### 4.2.2.2 Ergebnisse für eine Subtelomerregion in einem MAPH-Experiment

Für jede analysierte Subtelomerregion eines Patienten ergaben sich drei mögliche Resultate eines MAPH-Experimentes:

##### 1. Unauffälliges Ergebnis / „o.B.“

Lag die relative Peakhöhe einer Sonde, im Folgenden als „MAPH-Ergebnis“ einer Sonde bezeichnet, für eine Test-DNA innerhalb des Intervalls von zwei bzw. drei Standardabweichungen vom Median, wurde die gemessene Kopienzahl als normal und damit das Ergebnis als unauffällig gewertet. Für ein solches unauffälliges MAPH-Ergebnis wird die Abkürzung „o.B.“ (ohne Befund) verwendet.

##### 2. Auffälliges Ergebnis / „auff.“

Das Ergebnis der MAPH-Analyse einer Subtelomerregion wurde als auffällig gewertet, wenn die relative Peakhöhe der entsprechenden Sonde um zwei bzw. drei Standardabweichungen vom Median abwich und damit eine Kopienzahlveränderung der betreffenden Region im Testgenom anzeigte. Für dieses MAPH-Resultat wird im Folgenden die Abkürzung „auff.“ (auffällig) verwendet.

##### 3. Subtelomerregion nicht auswertbar / „n.a.“

Das Ergebnis der MAPH-Analyse einer Subtelomerregion wurde als nicht auswertbar („n.a.“) bezeichnet, wenn die Standardabweichung der entsprechenden Sonde über alle Test-DNAs des Experimentes über dem definierten Schwellenwert von 0,15 lag (vgl. 3.4.3). Diese Bezeichnung wurde auch gewählt, wenn für eine Subtelomerregion keine Sonde im verwendeten Set enthalten war (Sondenset A: 32 zuverlässige Sonden, Sondenset B: 37 zuverlässige Sonden).

### 4.2.2.3 Ergebniskombinationen aus zwei MAPH-Experimenten und ihre Interpretation

Die DNA jedes Patienten wurde in zwei voneinander unabhängigen MAPH-Experimenten analysiert, so dass für jede Subtelomerregion zwei Ergebnisse vorlagen. Zur Interpretation der MAPH-Resultate wurden die beiden Ergebnisse jeder Subtelomerregion miteinander kombiniert. Wie oben beschrieben, wurden dabei jeweils zwei unterschiedlich strenge Bewertungskriterien mit engen (2SD) und weiten Schwellenwerten (3SD) angewandt. In Abbildung 15 sind die sechs möglichen Ergebniskombinationen aus den drei Einzelergebnissen „o.B.“, „auff.“ und „n.a.“ für einen Schwellenwert dargestellt.

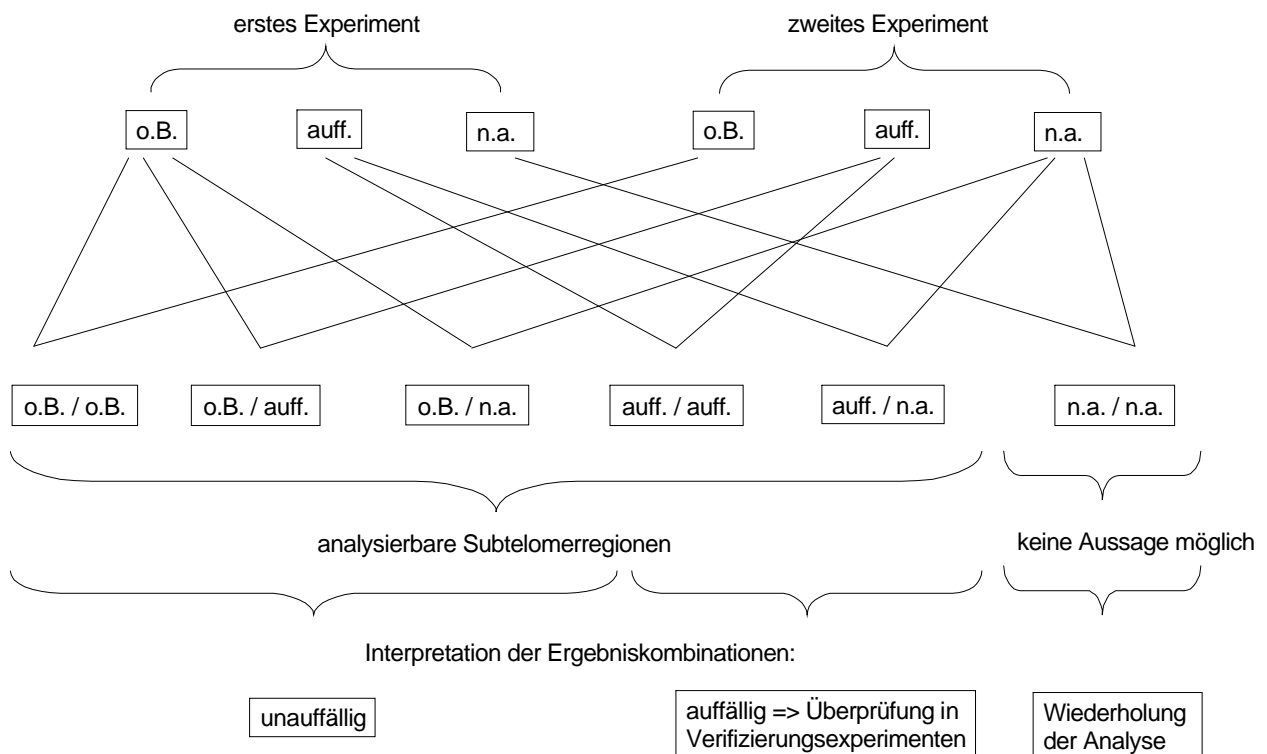


Abbildung 15: Darstellung der möglichen Ergebniskombinationen für eine Subtelomerregion aus jeweils zwei MAPH-Experimenten. Jede mögliche Kombination ist nur einmal aufgeführt.

#### Erläuterung der möglichen Ergebniskombinationen

##### Kombination „o.B. / o.B.“

Beide MAPH-Experimente lieferten für eine bestimmte Subtelomerregion eines Patienten ein unauffälliges Ergebnis.

##### Kombination „o.B. / auff.“

Eines der Experimente zeigte ein unauffälliges, das andere Experiment ein auffälliges Ergebnis (unter Berücksichtigung der jeweils verwendeten Schwellen).

Kombination „o.B. / n.a.“

Ein MAPH-Experiment resultierte in einem unauffälligen Ergebnis für eine bestimmte Subtelomerregion, während das zweite Experiment aufgrund einer zu hohen Standardabweichung oder wegen Fehlens der Sonde im verwendeten Set nicht auswertbar war.

Kombination „auff. / auff.“

Beide MAPH-Experimente lieferten für dieselbe Sonde ein auffälliges Ergebnis mit Abweichungen um 2SD bzw. 3SD vom Median, wobei die gemessene Kopienzahlveränderung auf denselben Aberrationstyp (Deletion oder Duplikation) hindeutete. Auffällige MAPH-Ergebnisse, die eine gegenläufige Veränderung der Kopienzahl der untersuchten Subtelomerregion zeigten, wurden als nicht aussagekräftig angesehen und in die Ergebniskategorie „na. / n.a.“ eingeordnet (s.u.).

Kombination „auff. / n.a.“

Eines der Experimente resultierte in einem auffälligen Ergebnis, während das zweite Experiment für die entsprechende Sonde nicht informativ war (Standardabweichung  $>0,15$  oder Fehlen der Sonde im verwendeten Set; vgl. 4.2.2.2).

Kombination „n.a. / n.a.“

Ergebniskombinationen wurden in die Kategorie „n.a. / n.a.“ eingeordnet, wenn beide Experimente für dieselbe Sonde nicht informativ waren (Standardabweichungen  $>0,15$  oder Fehlen der Sonde im verwendeten Set) oder wenn eines der Experimente auf eine Duplikation, das andere Experiment auf eine Deletion der untersuchten Subtelomerregion hindeutete (widersprüchliches Ergebnis).

Interpretation der MAPH-Ergebnisse

Subtelomerregionen, bei denen beide MAPH-Experimente ein auffälliges Ergebnis erbrachten („auff. / auff.“) sowie diejenigen, bei denen ein Experiment ein auffälliges Ergebnis lieferte, während das zweite Experiment für die entsprechende Sonde nicht informativ war, wurden als potentielle Aberrationen in Verifizierungsexperimenten näher charakterisiert. Regionen, bei denen beide Experimente keine Aussage lieferten („n.a. / n.a.“) wären prinzipiell in Nachuntersuchungen zu analysieren. Da für die retrospektiv analysierten Fälle bereits Befunde aus FISH-Untersuchungen vorlagen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf diese Nachuntersuchungen verzichtet.

Für Subtelomerregionen, bei denen die MAPH-Experimente die Ergebniskombinationen „o.B. / o.B“, „o.B. / n.a.“ oder „o.B. / auff.“ lieferten, wurden keine Kopienzahlveränderungen angenommen und die Ergebniskombinationen wurden als unauffällig interpretiert. In den letzten beiden Fällen basiert dies auf der geringen Wahrscheinlichkeit, mit der bei einem Patienten mit MR tatsächlich mit einer Aberration einer Subtelomerregion zu rechnen ist. Diese Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus den folgenden, für die Ergebnisse eines MAPH-Experimentes zugrunde zu legenden Annahmen:

Die Häufigkeitsverteilung von MAPH-Ergebnissen entspricht genähert einer Normalverteilung (Armour et al., 2000). Wird eine Abweichung um zwei Standardabweichungen vom Median als Schwelle zwischen einer „normalen“ Kopienzahl und einer potentiellen Kopienzahlveränderung definiert, so werden gemäß der Normalverteilung 5% aller Ergebnisse eines MAPH-Experimentes rein zufällig einen auffälligen Wert annehmen.

Diese auffälligen Ergebnisse setzen sich zum einen zusammen aus tatsächlich aberranten Subtelomerregionen, zum anderen aber auch aus falsch-positiven Ergebnissen. Wie groß die jeweiligen Anteile dieser falsch-positiven und tatsächlich-positiven Ergebnisse sind bzw. wie hoch die Wahrscheinlichkeit dieser Fälle ist, lässt sich aus der zu erwartenden Mutationsrate je Chromosomenende ableiten. Diese setzt sich zusammen aus 1. der Wahrscheinlichkeit, bei einem Patienten mit MR eine Aberration nachzuweisen sowie 2. der Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte der 43 relevanten Subtelomerregionen dieses Patienten betroffen ist. Im Durchschnitt kann bei etwa 4,60% aller Patienten mit idiopathischer MR eine Aberration der Subtelomere nachgewiesen werden (Metastudie, Xu et al., 2003). Da bei circa der Hälfte dieser Patienten zwei Subtelomerregionen betroffen sind (bei Translokationen) und bei der anderen Hälfte je eine (bei Duplikationen / Deletionen), sind im Durchschnitt 1,5 aberrante Subtelomerregionen bei jedem betroffenen Patienten zu erwarten. Bei 43 relevanten Subtelomerregionen beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Chromosomenende eines betroffenen Patienten eine Aberration aufweist  $1,5/43=0,035$  (3,50%). Bezogen auf den Anteil von Trägern subtelomerischer Chromosomenaberrationen unter Patienten mit idiopathischer MR von 4,60% ergibt sich damit eine Wahrscheinlichkeit von  $0,035 \times 0,046=0,0016$  (0,16%), dass bei einem beliebigen Patienten mit MR tatsächlich eine Aberration an einem bestimmten Chromosomenende vorliegt.

Unter der Voraussetzung einer Normalverteilung der MAPH-Ergebnisse und einem Schwellenwert von zwei Standardabweichungen als Grenze zwischen normal und auffällig resultieren, wie oben erläutert, 5% aller MAPH-Analysen in einem auffälligen Ergebnis. Die zu erwartende Mutationsrate für ein Chromosomenende bei einem Patienten mit MR liegt aber nur bei 0,16%. Demnach setzen sich die 5% auffälliger Ergebnisse voraussichtlich aus 0,16% tatsächlicher Aberrationen und 4,84% falsch-positiver Ergebnisse zusammen. Damit sind falsch-positive Ergebnisse etwa 30-mal häufiger als tatsächliche Aberrationen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die zu erwartende, also die *a priori*-Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven MAPH-Ergebnisses bei etwa 4,84% liegt. Die *a priori* Wahrscheinlichkeit, mit der es sich bei einem MAPH-Ergebnis um ein falsch-negatives Ergebnis handelt, kann nur so hoch sein wie die zu erwartende Mutationsrate für ein Chromosomenende. Sie liegt dementsprechend bei 0,16%.

Wie oben beschrieben, erfolgte die Interpretation der MAPH-Analysen unter Berücksichtigung der Ergebnisse zweier unabhängiger MAPH-Experimente. Dabei wurde die Ergebniskombination „o.B. / auff.“ als unauffällig bewertet, weil, wie bereits erläutert, das unauffällige Ergebnis des ersten Experimentes mit einer *a priori* Wahrscheinlichkeit von höchstens 0,16% falsch-negativ ist, während es sich bei dem auffälligen zweiten Ergebnis mit einer 30-mal höheren Wahrscheinlichkeit um ein falsch-positives Ergebnis handelt als um eine tatsächliche Aberration. Es scheint damit gerechtfertigt, diese Ergebniskombination als unauffällig zu bewerten. Die Ergebniskombination „o.B. / n.a.“ wurde aufgrund der geringen *a priori* Wahrscheinlichkeit eines falsch-negativen Ergebnisses (0,16%) ebenfalls als unauffällig bewertet.

Die Richtigkeit dieser Annahmen und ihrer Interpretation wurde in der vorliegenden Arbeit in Verifizierungsexperimenten geprüft (vgl. 4.2.3.4). Zudem wurde der tatsächliche Anteil falsch-negativer bzw. falsch-positiver Ergebnisse bestimmt, indem jeder durch Subtelomer-MAPH analysierte Fall durch FISH oder Subtelomer-MAPH (LUMC, Leiden) untersucht wurde. Dadurch war gewährleistet, dass keine tatsächliche Subtelomeraberration übersehen wurde.

#### **4.2.3 MAPH-Ergebnisse der Fälle ohne bekannte Aberrationen (Negativkontrollen)**

Es wurden 51 Fälle des Bonner MR-Kollektivs durch Subtelomer-MAPH analysiert, bei denen durch FISH (n=48) oder MAPH (LUMC, Leiden) (n=3) oder durch beide Techniken (n=10) das Vorliegen von Subtelomeraberrationen ausgeschlossen worden war. Anhand dieser Negativkontrollen sollte unter anderem der tatsächliche Anteil falsch-positiver Ergebnisse ermittelt werden, welcher sowohl für die Aussagekraft als auch für die Effizienz der Methode von Bedeutung ist (vgl. 4.2.6).

Wie oben beschrieben, wurde jeder Fall in zwei voneinander unabhängigen MAPH-Experimenten untersucht. Dabei wurden zwei Fälle ausschließlich unter Verwendung des SONDENSETS A und 34 Fälle ausschließlich unter Verwendung des Sets B analysiert. Bei 15 Fällen kam für das erste Experiment das Set A, für das zweite das Set B zum Einsatz. Unter Berücksichtigung der als zuverlässig bewerteten Subtelomersonden (Set A 32, Set B 37 Sonden) waren für die 51 Negativkontrollen theoretisch 1877 Subtelomerregionen durch MAPH zu analysieren. Die beobachteten Ergebniskombinationen werden im Folgenden je nach verwendeten Schwellenwerten (2SD und 3SD) getrennt dargestellt.

##### **4.2.3.1 Bewertung der MAPH-Ergebnisse bei engen Schwellenwerten (2SD)**

Bei eng gewählten Schwellenwerten mit einer zweifachen Standardabweichung vom Median als Grenze zwischen normal und auffällig konnte anhand der Ergebnisse aus jeweils zwei MAPH-Experimenten zu 1871 von 1877 Subtelomerregionen (99,68%) eine Aussage

getroffen werden. Sechs Regionen (0,32%) waren nicht auswertbar. Die beobachteten Ergebniskombinationen sowie deren ermittelten Häufigkeiten sind Tabelle 15 veranschaulicht.

Schwelle: $X_M \pm 2SD$					
o.B./o.B	o.B./auff.	o.B./n.a.	auff./auff.	auff./n.a.	n.a./n.a.
n=1483 79,01%	n=254 13,53%	n=115 6,13%	n=10 0,53%	n=9 0,48%	n=6 0,32%
		SD>0,15: n=51 (2,72%) Sonde nicht im Set: n=64 (3,41%)		SD>0,15: n=1 (0,05%) Sonde nicht im Set: n=8 (0,43%)	SD>0,15: n=1 (0,05%) widersprüchliches Ergebnis n=5 (0,27%)
unauffällig: n=1852 (98,67%)			auffällig: n=19 (1,01%)		nicht analysierbar: n=6 (0,32%)

Tabelle 15: Häufigkeiten der MAPH-Ergebniskombinationen für das Kollektiv ohne bekannte Subtelomeraberrationen (Negativkontrollen) bei engen Schwellenwerten (2SD) (51 Patienten, insgesamt 1877 Subtelomerregionen).

Für 1483 Subtelomerregionen (79,01%) lieferten beide MAPH-Experimente jeweils ein unauffälliges Ergebnis („o.B. / o.B.“). Bei 254 Subtelomerregionen (13,53%) resultierte eines der Experimente in einem unauffälligen, das andere Experiment in einem auffälligen Ergebnis („o.B. / auff.“). Für 115 Subtelomerregionen (6,13%) ergab eines der Experimente ein unauffälliges Ergebnis, während das zweite Experiment nicht auswertbar war („o.B. / n.a.“). Für 51 dieser Regionen (2,72%) waren dabei die Standardabweichungen der entsprechenden Sonden größer 0,15, für 64 Regionen (3,41%) war keine Aussage möglich, da die betreffenden Sonden nicht im verwendeten Set enthalten waren (Set A). Bei zehn Regionen (0,53%) ergaben beide MAPH-Experimente für dieselbe Sonde ein auffälliges Ergebnis mit Abweichungen um mindestens 2SD vom Median („auff. / auff.“). Für neun Subtelomerregionen (0,48%) resultierte eines der Experimente in einem auffälligen Ergebnis, während das zweite Experiment für die entsprechende Sonde nicht informativ war („auff. / n.a.“). Dabei lag in einem Fall die Standardabweichung der betreffenden Sonde über 0,15, in acht Fällen waren die entsprechenden Sonden nicht im verwendeten Set enthalten.

Bei 14 der 19 potentiellen Subtelomeraberrationen der Ergebniskategorien („auff. / auff.“) und („auff. / n.a.“) handelte es sich um Duplikationen, bei fünf Aberrationen um Deletionen. Insgesamt konnte zu sechs Subtelomerregionen (0,32%) keine Aussage getroffen werden („n.a. / n.a.“). Dabei waren fünf Regionen (0,27%) aufgrund widersprüchlicher MAPH-Ergebnisse nicht auswertbar. Eine Subtelomerregion (0,05%) war wegen einer zu hohen Standardabweichungen (>0,15) der entsprechenden Sonde in beiden Experimenten nicht analysierbar.

### Zusammenfassung der MAPH-Ergebnisse bei Schwellenwerten von $X_M \pm 2SD$

Basierend auf den oben beschriebenen Kriterien zur Auswertung und Interpretation der einzelnen Ergebniskombinationen wurden bei eng gewählten Schwellenwerten von den insgesamt 1877 betrachteten Subtelomerregionen der 51 Fälle ohne bekannte Subtelomeraberrationen 1852 Regionen (98,67%) als unauffällig bewertet (Ergebniskombinationen „o.B. / o.B.“, „o.B. / auff.“, „o.B. / n.a.“, Schwelle jeweils 2SD). Zu sechs Subtelomerregionen (0,32%) konnte keine Aussage getroffen werden („n.a. / n.a.“). Für zehn Regionen (0,53%) wurde in beiden Experimenten (Schwelle jeweils 2SD) eine potentielle Kopienzahlveränderung detektiert („auff. / auff.“), weitere neun Regionen (0,48%) waren in einem Experiment auffällig, während das zweite Experiment für diese Regionen nicht auswertbar war („auff. / n.a.“). Diese 19 (1,01%) durch MAPH detektierten potentiellen Aberrationen wurden in Verifizierungsexperimenten überprüft (vgl. 4.2.3.4).

### Anzahl notwendiger Verifizierungsexperimente pro Patient

Für das Kollektiv der Patienten ohne bekannte Subtelomeraberrationen (Negativkontrollen) lag der Anteil auffälliger MAPH-Befunde bei 1,01% und der Anteil nicht auswertbarer Regionen bei 0,32%. Damit waren nach MAPH 1,33% der Subtelomerregionen in Zusatzanalysen zu überprüfen. Bezogen auf die 37 Subtelomere, die mit dem zur Verfügung stehenden Sondenset analysiert werden konnten, waren somit für jeden Patienten rechnerisch 0,49 gezielte Verifizierungsexperimente durchzuführen. Hätten keine Befunde aus FISH-Analysen vorgelegen, so wären für eine vollständige Analyse aller 43 relevanten Subtelomere unter den vorliegenden Bedingungen nach MAPH pro Patient 6,49 zusätzliche Hybridisierungen erforderlich gewesen.

### **4.2.3.2 Bewertung der MAPH-Ergebnisse bei weiten Schwellenwerten (3SD)**

Wurde als Schwelle zwischen normal und auffällig die dreifache Standardabweichung vom Median gewählt, so konnte zu insgesamt 1876 Subtelomerregionen (99,95%) der 51 Fälle ohne bekannte Subtelomeraberrationen eine Aussage getroffen werden. Die für die einzelnen Ergebniskombinationen ermittelten Häufigkeiten sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

Schwelle: $X_M \pm 3SD$					
o.B./o.B	o.B./auff.	o.B./n.a.	auff./auff.	auff./n.a.	n.a./n.a.
n=1674 89,18%	n=82 4,37%	n=119 6,34%	n=0 0%	n=1 0,05%	n=1 0,05%
		SD>0,15: n=48 (2,56%) Sonde nicht im Set: n=71 (3,78%)		SD>0,15: n=0 (0%) Sonde nicht im Set: n=1 (0,05%)	SD>0,15: n=1 (0,05%) unklares Ergebnis n=0 0%
unauffällig: n=1875 (99,89%)			auffällig: n=1 (0,05%)		nicht analysierbar: n=1 (0,05%)

Tabelle 16: Häufigkeiten der MAPH-Ergebniskombinationen für das Kollektiv ohne bekannte Subtelomeraberrationen (Negativkontrollen) bei weiten Schwellenwerten (3SD) (51 Patienten, insgesamt 1877 Subtelomerregionen).

Es wurden 1674 Subtelomerregionen (89,18%) in beiden MAPH-Experimenten als unauffällig bewertet. Bei 82 Subtelomerregionen (4,37%) resultierte ein Experiment in einem unauffälligen, das zweite Experiment in einem auffälligen Ergebnis. Bei 119 Regionen (6,34%) ergab ein Experiment ein unauffälliges Ergebnis, während das zweite Experiment nicht auswertbar war. Für 48 Regionen (2,56%) waren dabei die Standardabweichungen der entsprechenden Sonden größer 0,15. Für 71 Regionen (3,78%) war keine Aussage möglich, da die betreffenden Sonden nicht im verwendeten Set enthalten waren (Set A). Bei einem Schwellenwert von 3SD ergab sich für keine analysierte Subtelomerregion in beiden MAPH-Experimenten ein auffälliges Ergebnis. Für eine Subtelomerregion (0,05%) lag aus einem Experiment ein auffälliges Ergebnis (Duplikation) vor. Im anderen Experiment war zu dieser Region keine Aussage möglich, da die Sonde noch nicht im verwendeten Set enthalten war. Eine Subtelomerregion (0,05%) konnte nicht analysiert werden. Die für diese Region spezifische Sonde zeigte in beiden Experimenten eine Standardabweichung über 0,15 und wurde damit aus der Bewertung ausgeschlossen.

#### Zusammenfassung der MAPH-Ergebnisse bei Schwellenwerten von $X_M \pm 3SD$

Von den 1877 betrachteten Subtelomerregionen der 51 Negativkontrollen wurden 1875 Regionen (99,89%) als unauffällig interpretiert (Ergebniskombinationen „o.B. / o.B.“, „o.B. / auff.“, „o.B. / n.a.“; Schwelle jeweils 3SD), zu einer Region (0,05%) konnte keine Aussage getroffen werden („n.a. / n.a.“). Für eine Region (0,05%) wurde in einem Experiment eine potentielle Kopienzahlveränderung detektiert („auff. / n.a.“), welche durch zusätzliche Analysen überprüft wurde (vgl. 4.2.3.4).

#### Anzahl notwendiger Verifizierungsexperimente pro Patient

Bei einem Schwellenwert von 3SD lag der Anteil auffälliger MAPH-Befunde sowie der Anteil nicht auswertbarer Regionen jeweils bei 0,05%, so dass nach MAPH 0,10% der



Subtelomerregionen nicht abschließend beurteilt werden konnten. Für jeden Patienten waren damit rechnerisch 0,04 der 37 analysierbaren Subtelomere in gezielten Verifizierungsexperimenten zu überprüfen. Zusammen mit den sechs Regionen, für die keine Sonden im MAPH-Sondenset enthalten waren, ergaben sich daraus für eine vollständige Subtelomeranalyse nach MAPH für jeden Patienten 6,04 zusätzliche Hybridisierungen, die nötig gewesen wären, wenn keine Befunde aus FISH-Analysen vorgelegen hätten.

#### 4.2.3.3 Vergleich der nach verschiedenen Schwellenwerten ermittelten Ergebnisse

In Tabelle 17 sind die anhand der verschiedenen Schwellenwerte (2SD und 3SD) ermittelten MAPH-Ergebnisse für die 51 Fälle ohne bekannte Subtelomeraberrationen (Negativkontrollen) einander gegenübergestellt. Bei 2SD wurden 1852 (98,67%), bei 3SD sogar 1875 Subtelomerregionen (99,89%) der insgesamt 1877 zu analysierenden Regionen als unauffällig bewertet. Dabei konnte im ersten Fall zu sechs Regionen (0,32%), im zweiten Fall zu einer Region (0,05%) keine Aussage getroffen werden. Der Anteil potentiell auffälliger Regionen war bei 2SD mit 1,01% etwa 20-mal höher als bei 3SD mit 0,05%. Nach den strengen Maßstäben der 2SD waren damit 20-mal mehr aufwendige Verifizierungsexperimente zur Überprüfung der potentiellen Aberrationen erforderlich.

Schwelle	o.B./o.B.	o.B./auff.	o.B./n.a.	auff./auff.	auff./n.a.	n.a./n.a.
$X_M \pm 2SD$	79,01%	13,53%	6,13%	0,53%	0,48%	0,32%
	unauffällig: (98,67%)			auffällig: (1,01%)		n.a.: (0,32%)
$X_M \pm 3SD$	89,18%	4,37%	6,34%	0%	0,05%	0,05%
	unauffällig: (99,89%)			auffällig: (0,05%)		n.a.: (0,05%)

Tabelle 17: Gegenüberstellung der nach verschiedenen Schwellenwerten (2SD und 3SD) ermittelten MAPH-Ergebnisse der 51 Fälle ohne bekannte Subtelomeraberrationen (insgesamt 1877 Subtelomerregionen).

#### 4.2.3.4 Ergebnisse der Verifizierungsexperimente

Die Überprüfung der durch Subtelomer-MAPH detektierten potentiellen Aberrationen sowie die Verifizierung der Ergebnisinterpretationen erfolgte durch FISH-Analysen mit Sonden, welche die als MAPH-Sonde verwendete Sequenz beinhalteten oder höchstens 500kb davon entfernt lokalisiert waren. Ergänzend wurden die MAPH-Ergebnisse der am LUMC in Leiden analysierten Fälle mit den eigenen Resultaten verglichen. Anhand dieser Verifizierungsexperimente wurde aus den ermittelten auffälligen MAPH-Ergebnissen (bei 2SD und 3SD) der jeweilige Anteil falsch-positiver Ergebnisse bestimmt.

Wurde die 3SD als Grenze zwischen normal und auffällig gewählt, so wurde lediglich eine Subtelomerregion als auffällig bewertet und war damit in Zusatzanalysen zu untersuchen. Wurden dagegen engere Schwellenwerte (2SD) verwendet, so ergab sich für 18 weitere Regionen ein auffälliges Ergebnis, welches in Verifizierungsexperimenten zu überprüfen war.

### Ergebnisse der FISH-Verifizierungsexperimente bei potentiell aberranten Regionen

Es wurden 13 der 19 potentiellen Subtelomeraberrationen (Schwellenwert 2SD) durch FISH überprüft. Bei neun dieser 13 Fälle handelte es sich um mögliche Duplikationen, bei vier Fällen um mögliche Deletionen.

Für das Kollektiv von Fällen ohne bereits bekannte Subtelomeraberrationen wurde keine der durch MAPH detektierten potentiellen Kopienzahlveränderungen durch FISH bestätigt. Bei den auffälligen MAPH-Ergebnissen handelte es sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um falsch-positive Resultate. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Überprüfung der MAPH-Ergebnisse durch FISH nur mit einer etwas eingeschränkten Genauigkeit erfolgen kann. Diese Einschränkungen sind bedingt durch das geringere Auflösungsvermögen der FISH gegenüber der MAPH, welches wiederum auf die verschiedenen Sondenlängen zurückzuführen ist. Während für die FISH Sondenlängen zwischen 100-200 Kilobasenpaaren erforderlich sind, umfassen MAPH-Sonden nur 100-500 Basenpaare. Kleine, durch MAPH detektierbare Aberrationen sind damit durch FISH nicht oder nur schwer erfassbar. Duplikationen werden in der Regel nur dann durch FISH detektiert, wenn sie eine Größe von mindestens 30kb umfassen und wenn die zusätzlich vorliegenden Sequenzen nicht in direkter Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind (Tandemduplikationen). Für die Nachweisbarkeit von Deletionen gilt, dass mindestens die Hälfte einer FISH-Sonde deletiert sein muss, um aus der Differenz der Signalgröße der homologen Chromosomenregionen auf eine Deletion schließen zu können. Darüber hinaus sind die Einschränkungen bedingt durch die teilweise vorliegende Distanz zwischen den eingesetzten FISH- und den MAPH-Sonden, die zwischen 100 und 500kb betrug. Die gegebene Genauigkeit der Verifizierungsexperimente wurde für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit als ausreichend angesehen, da die bisher beschriebenen Subtelomeraberrationen bis auf seltene Ausnahmen größer als 500kb sind (Knight et al., 1999; Rossi et al., 2001; Hélias-Rodezewicz et al., 2002) und somit sowohl durch MAPH als auch durch FISH nachgewiesen worden wären.

### Ergebnisse der MAPH-Verifizierungsexperimente bei potentiell aberranten Regionen

Sechs der durch MAPH detektierten potentiellen Subtelomeraberrationen (fünf Duplikationen, eine Deletion) wurden mit den Ergebnissen der am LUMC durchgeführten MAPH-Analysen verglichen. Unter Verwendung von Sonden, welche auch bei den eigenen MAPH-Analysen zum Einsatz kamen, waren keine Kopienzahlveränderungen der betreffenden Subtelomere nachgewiesen worden. Somit wurden die eigenen auffälligen MAPH-Ergebnisse als falsch-positiv eingestuft.

In den Verifizierungsexperimenten wurde gezeigt, dass es sich bei sämtlichen durch MAPH detektierten Aberrationen um falsch-positive Ergebnisse handelte. Der tatsächliche Anteil

falsch-positiver MAPH-Ergebnisse lag damit bei eng gewählten Schwellenwerten (2SD) bei 1,01%, bei weiten Schwellenwerten (3SD) bei 0,05%. Die Verwendung enger Schwellenwerte bedingt eine Steigerung der Falsch-Positiv-Rate den Faktor 20.

#### Verifizierung der Ergebnisinterpretationen

Wie in 4.2.2.3 erläutert, wurden die Ergebniskombinationen „o.B. / auff.“ sowie „o.B. / n.a.“ als unauffällig interpretiert. Eine Absicherung dieser Bewertung war durch das unauffällige Ergebnis der FISH-Analysen sämtlicher Subtelomerregionen der hier beschriebenen Fälle gegeben. Teilweise einschränkend sind jedoch auch hier die Auflösungsgrenze der FISH sowie die Distanz zwischen den verwendeten FISH-Sonden und den MAPH-Sonden zu berücksichtigen. Wie bereits erläutert, ist diese Einschränkung angesichts der Größe der bisher beobachteten Subtelomeraberrationen als gering einzuschätzen.

Die Richtigkeit der Ergebnisinterpretationen wurde zusätzlich durch Vergleich mit den Ergebnissen der am LUMC durchgeführten MAPH-Analysen überprüft. Für 66 (25,98%) der 254 Subtelomerregionen der Ergebniskombination „o.B. / auff.“ sowie für 36 (31,30%) der 115 Subtelomerregionen der Kombination „o.B. / n.a.“ (Schwelle jeweils 2SD) lagen Ergebnisse der externen Untersuchungen vor. Diese waren für alle betreffenden Subtelomerregionen unauffällig. Die experimentell erhobenen Daten unterstützen damit die Richtigkeit der Ergebnisinterpretationen.

#### **4.2.4 MAPH-Ergebnisse der Fälle mit bekannten Aberrationen (Positivkontrollen)**

Es wurden sieben Fälle mit bekannten Subtelomeraberrationen retrospektiv durch Subtelomer-MAPH analysiert. Anhand dieser Positivkontrollen wurde geprüft, ob die einzelnen bekannten Aberrationen durch Subtelomer-MAPH zu erfassen waren und welche Schwellenwerte als Auswertungskriterien für einen eindeutigen Nachweis notwendig waren. Wie bei den retrospektiv untersuchten Fällen wurden jeweils die Ergebnisse zweier MAPH-Experimente kombiniert, wobei zum einen die 2SD, zum anderen die 3SD als Schwelle zwischen normal und auffällig verwendet wurde.

##### **4.2.4.1 Falldarstellungen**

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse aus jeweils zwei MAPH-Experimenten für jede Subtelomerregion eines Patienten mit bekannter Subtelomeraberration (grau unterlegt) dargestellt. Die Abkürzung „o.B.“ steht für ein unauffälliges Gesamtergebnis der jeweiligen Subtelomerregion. „++“ symbolisiert eine potentielle Duplikation bei 2SD, „+++“ bei 3SD. Der Schrägstrich trennt die Ergebnisse zweier MAPH-Experimente. „-“ bzw. „-“ symbolisieren die entsprechende Situation bei Vorliegen einer potentiellen Deletion. „n.a.“ bedeutet, dass die betreffende Region in einem Experiment nicht analysierbar war. Im Folgenden werden

die MAPH-Resultate der einzelnen Fälle erläutert. Auf die Fälle 2 und 4 wird aufgrund ihrer Sonderstellung zuletzt eingegangen.

Subtelomer-region	Fall 1 TCI	Fall 2 MM	Fall 3 JG	Fall 4 JH	Fall 5 KA*	Fall 6 GW	Fall 7 SL
16p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	(---/---)	o.B.	o.B.
11p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.
13q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
14q	(---/---)	o.B.	(++/n.a.)	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
2q	o.B.	(---/---)	(---/---)	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
9p	o.B.	(+++//++)	(+++//+++)	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
3q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
9q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
8p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
3p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
4p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
11q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
12q(a)	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.
6p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
19p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
12p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
20q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
7p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
6q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
18q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
18p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
17p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
5q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.
21q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
19q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.
17q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.
15q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
8q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	(+++//n.a.)
10p	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
4q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
2p	o.B.	o.B.	o.B.	(--//n.a.)	o.B.	o.B.	o.B.
10q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
7q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
1q	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
XqYq	o.B.	(+++//++)	o.B.	o.B.	o.B.	(---/---)	o.B.
Xq	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
Yp	o.B.	o.B.	o.B. <sup>xx</sup>	o.B.	o.B. <sup>xx</sup>	o.B.	o.B. <sup>xx</sup>
Summen							
o.B. ( $X_M \pm 2SD$ )	36	34	34	36	31	36	36
o.B. ( $X_M \pm 3SD$ )	36	36	35	37	31	36	36
auff. ( $X_M \pm 2SD$ )	1	3	3	1	1	1	1
auff. ( $X_M \pm 3SD$ )	1	1	2	0	1	1	1

Tabelle 18: Ergebnisse aus jeweils zwei MAPH-Experimenten je Patient und Subtelomerregion für die Fälle mit bekannten Aberrationen (sortiert nach Sondenlängen). Symbolerläuterung im Text. grau unterlegt: bekannte Aberration; \*Analyse unter Verwendung des Sondensets A; <sup>xx</sup> weibliche Patienten, Ergebnis entspricht Gonosomenkonstellation XX.

### Fall 1: Karyotyp : 46, XY, del(14q)(q32.31)

Für den Fall 1 (TCI) war durch FISH mit dem ToTelVysion Probe Panel eine Deletion der Subtelomerregion 14q nachgewiesen und der Bruchpunkt auf die Chromosomenbande 14q32.31 festgelegt worden.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse eines MAPH-Experimentes für jede untersuchte Subtelomerregion dieses Falles in einem Säulendiagramm dargestellt. Jede Säule entspricht einer Sonde des Sondensets, die Höhe der Säulen gibt die Werte der normalisierten relativen Peakhöhen an. Die Schwellenwerte der 2SD und 3SD vom Median sind durch horizontale Linien markiert. Es handelt sich um einen männlichen Patienten, die Sonde Xq ist durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor normiert (vgl. 3.4.3.1). Der Erwartungswert für den hemizygoten Normalzustand dieses X-chromosomalen Locus lag nach Normalisierung somit bei 1,0.

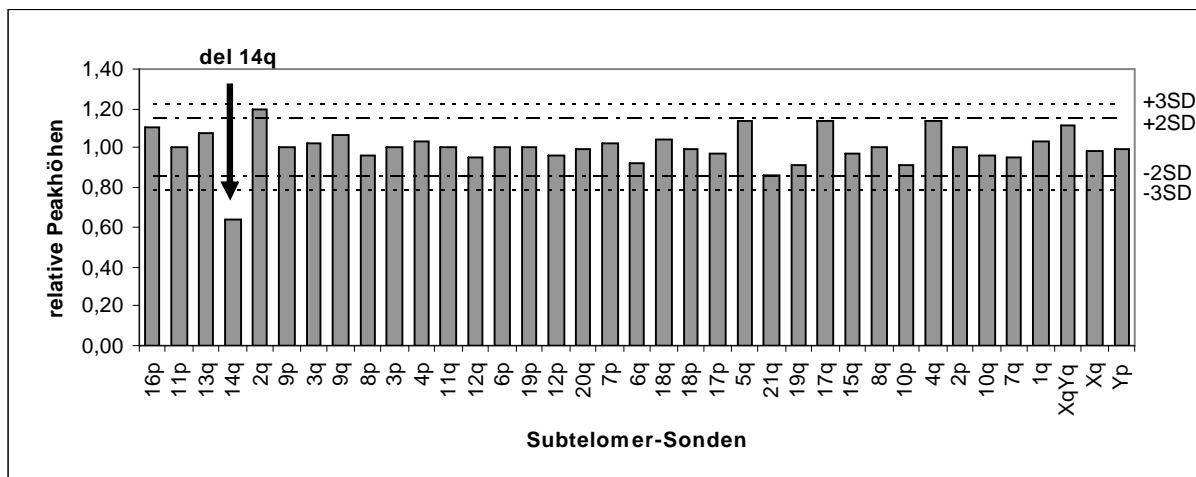


Abbildung 16: MAPH-Ergebnisse eines Experimentes für den Fall 1: Deletion des Subtelomerregion 14q (Auftragung nach Sondenlänge).

Die normalisierten relativen Peakhöhen aller untersuchten Sonden lagen mit Ausnahme derjenigen für die Sonden 14q und 2q innerhalb des als unauffällig bewerteten Intervalls der 2SD um den Median. Die relative Peakhöhe der Sonde 14q lag dagegen um mehr als 3SD unter dem Median (vgl. Tabelle 18, Symbol „---“ und Tabelle 19). Dieses Ergebnis deutete gemäß der in 4.2.2.1 beschriebenen Definition auf eine Deletion der betreffenden Region im Testgenom hin. Das zweite MAPH-Experiment lieferte ein entsprechend auffälliges Ergebnis. Damit war die bekannte Deletion 14q sowohl nach den strengen Kriterien der 2SD als auch nach den weniger strengen Kriterien der 3SD eindeutig durch MAPH nachweisbar.

Das MAPH-Ergebnis der Sonde 2q lag in dem in Abbildung 16 dargestellten Experiment um mehr als 2SD über dem Median und wurde damit bei engen Schwellenwerten für dieses Experiment als auffällig bewertet. Dieses Resultat bestätigte sich im zweiten MAPH-Experiment nicht. Anhand der Kombination der Einzelergebnisse („auff. / o.B.“) wurde die

Region 2q für diesen Patienten als unauffällig („o.B.“) bewertet (vgl. Tabelle 18; Erläuterung in 4.2.2.3).

Beim hier beschriebenen Fall wie auch bei mehreren anderen Positivkontrollen fiel auf, dass die zusätzlich zur tatsächlichen Aberration detektierten potentiellen Kopienzahlveränderungen solche Regionen betrafen, deren Sonden bei Erhebung der MAPH-Daten direkt benachbart waren. Bei Vorliegen einer Deletion wurden für die Nachbarsonden, wie im hier vorliegenden Fall, Abweichungen der relativen Peakhöhen nach oben beobachtet (vgl. Peakhöhe der Sonde 2q), bei Vorliegen einer Duplikation Abweichungen nach unten. Bei der Normalisierung der MAPH-Daten (vgl. 3.4.3) wurden die ermittelten Peakhöhen durch Division durch ihre vier Nachbarwerte zueinander in Relation gesetzt. Weist eine dieser Peakhöhen einen besonders niedrigen oder besonders hohen Wert auf, so nimmt dies bei der Normalisierung Einfluss auf die benachbarten Werte. Die Vermutung liegt nahe, dass durch dieses Verfahren der Datenerhebung falsch-positive Ergebnisse generiert werden.

### Fall 3: Karyotyp: 46, XX, del(2)(q37.3)

Für den Fall 3 (JG) war sowohl mit dem kommerziellen ToTelVysion-System, als auch durch S-COBRA-FISH eine Deletion der Subtelomerregion 2q nachgewiesen worden. Der Bruchpunkt war auf die Bande 2q37.3 festgelegt worden.

Die MAPH-Analysen ergaben unter Berücksichtigung der 37 zuverlässigen Sonden bei 2SD für 34 Subtelomerregionen ein unauffälliges Ergebnis (vgl. Tabelle 18). Drei Regionen (14q, 2q, 9p) wurden nach Kombination der Ergebnisse aus zwei Experimenten als auffällig bewertet. Während die beiden Regionen 9p und 2q auch unter dem weniger strengen Kriterium der 3SD auffällig waren, wurde die Region 14q unter diesem Kriterium als unauffällig interpretiert. Die Ergebnisse eines MAPH-Experimentes dieses Falles sind in Abbildung 17 veranschaulicht.

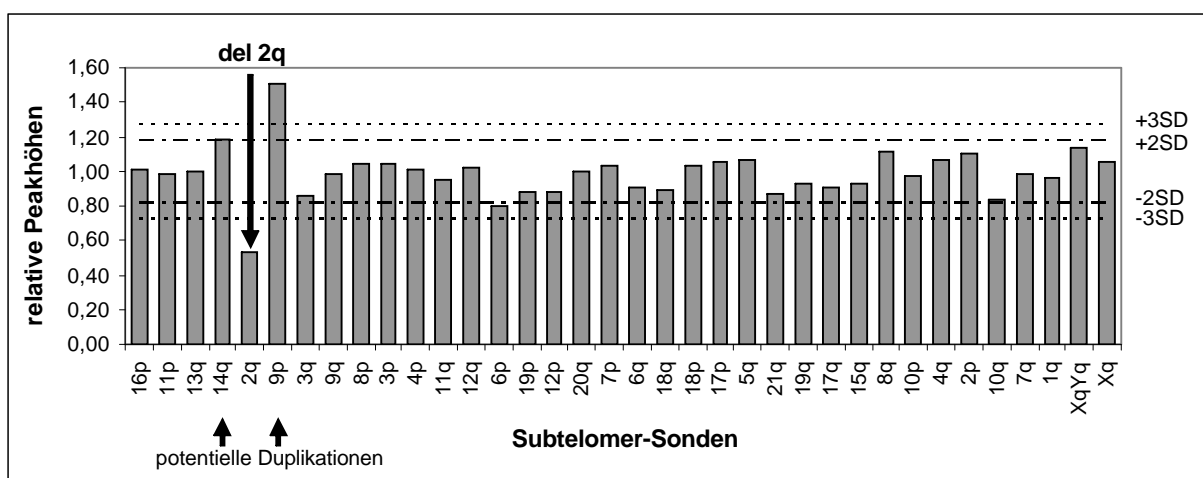


Abbildung 17: MAPH-Ergebnisse eines Experimentes für den Fall 3: Deletion der Subtelomerregion 2q. Die potentiellen Duplikationen der Regionen 14q und 9p wurden in beiden Experimenten beobachtet und daher in Verifizierungsanalysen überprüft.

Die bekannte Deletion 2q konnte sowohl bei engen als auch bei weiten Schwellenwerten eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 19). Die darüber hinaus durch MAPH detektierten potentiellen Kopienzahlveränderungen der Regionen 9p und 14q wurden in FISH-Verifizierungsexperimenten überprüft. Dabei konnte keine dieser potentiellen Aberrationen bestätigt werden. Wie für den Fall 1 beschrieben, lagen die auffälligen Sonden 9p und 14q in direkter Nachbarschaft zur Sonde 2q, deren zugehörige Subtelomerregion tatsächlich deletiert war. Auch hier ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den zusätzlich auffälligen Ergebnissen um Berechnungsartefakte handelt.

Fall 5: Karyotyp: 46, XX, del(16)(p13.3)

Für Fall 5 (KA) war durch FISH mit dem ToTelVysion-System eine Deletion der Subtelomerregion 16p detektiert worden, der exakte Bruchpunkt war in der Chromosomenbande 16p13.3 lokalisiert.

Beide MAPH-Experimente wurden unter Verwendung des Sondensets A durchgeführt. Mit den 32 zuverlässigen Sonden wurden 31 Subtelomerregionen als unauffällig bewertet. Die normalisierten relativen Peakhöhen der Sonde 16p lagen in beiden MAPH-Experimenten um mehr als 3SD unter dem Median (Tabelle 18, Symbol „---/---“ und Tabelle 19). Die bekannte Deletion 16p wurde eindeutig durch MAPH erfasst.

Fall 6: Karyotyp: 46, XY, del(Y)(q12) (Polymorphismus)

Für Fall 6 (GW) war durch Sechs-Farben-FISH eine Deletion der Subtelomerregion Yq nachgewiesen worden. FISH-Analysen beim Vater hatten gezeigt, dass es sich dabei um eine paternal ererbte Deletion in Yq12 handelte.

Beide durchgeführten MAPH-Experimente lieferten für die Sonde XqYq, welche spezifisch für die Subtelomerregionen Xq und Yq war, sowohl bei engen als auch bei weiten Schwellenwerten ein auffälliges Ergebnis (Tabelle 18, Symbol „---/---“ und Tabelle 19). Eine Kopienzahlveränderung der Subtelomerregion Xq war aufgrund des unauffälligen Ergebnisses der Sonde Xq auszuschließen. Damit war die bekannte Deletion Yq12 eindeutig durch MAPH zu erfassen. Die übrigen 36 analysierten Subtelomerregionen wurden anhand der Kombination der Ergebnisse aus zwei MAPH-Experimenten als unauffällig bewertet (vgl. Tabelle 18).

Fall 7: Karyotyp: 46, XX, dup(8)(q24.3)(Polymorphismus)

Für den Fall 7 (SL) war durch Subtelomer-MAPH (LUMC, Leiden) eine Duplikation der Subtelomerregion 8q detektiert worden. MAPH-Analysen bei der Mutter der Patientin hatten gezeigt, dass es sich dabei um eine Deletion in einer polymorphen Region in 8q handelte.

In den eigenen MAPH-Analysen lag die ermittelte relative Peakhöhe der Sonde 8q in einem Experiment um mehr als 3SD unter dem Median (vgl. Tabelle 18, Symbol „+++/n.a.“ und Tabelle 19). Im zweiten Experiment konnte die entsprechende Region nicht analysiert

werden. Die Sonde 8q wurde aufgrund einer Standardabweichung über 0,15 in diesem Experiment als nicht informativ angesehen. Die Kombination aus einem auffälligen und einem nicht auswertbaren Ergebnis wurde nach den in 4.2.2.3 beschriebenen Kriterien als auffällig bewertet und wäre damit in Verifizierungsexperimenten näher zu charakterisieren. Für die übrigen 36 durch MAPH analysierten Subtelomerregionen ergab sich jeweils ein unauffälliges Resultat (vgl. Tabelle 18).

Die bekannte Duplikation 8q konnte durch MAPH sowohl bei engen als auch bei weiten Schwellenwerten eindeutig nachgewiesen werden.

#### Fall 2: Karyotyp: 46, XY, der(2)t(2;5)(q37.3;p15)

Für den Fall 2 (MM) war durch Sechs-Farben-FISH eine Translokation zwischen den Subtelomerregionen 2q und 5p mit einer Deletion 2q und einer Duplikation 5p nachgewiesen worden. Die Bruchpunkte lagen in 2q37.3 bzw. 5p15.

Die Deletion der Subtelomerregion 2q konnte durch MAPH eindeutig nachgewiesen werden. In beiden durchgeführten Experimenten lagen die normalisierten relativen Peakhöhen der Sonde 2q mehr als 3SD über dem Median (Tabelle 18, Symbol „---/---“, und Tabelle 19, Abbildung 18). Zusätzlich wurden bei engen Schwellenwerten potentielle Aberrationen der Regionen 9p und XqYq detektiert. Keine dieser potentiellen Aberrationen wurde durch FISH-Analysen mit Sonden, welche die als MAPH-Sonden verwendeten Sequenzen beinhalteten, bestätigt. Die Regionen 11p und 14q waren nur im dargestellten Experiment potentiell aberrant und waren damit letztlich als unauffällig zu bewerten (vgl. 4.2.3.2).

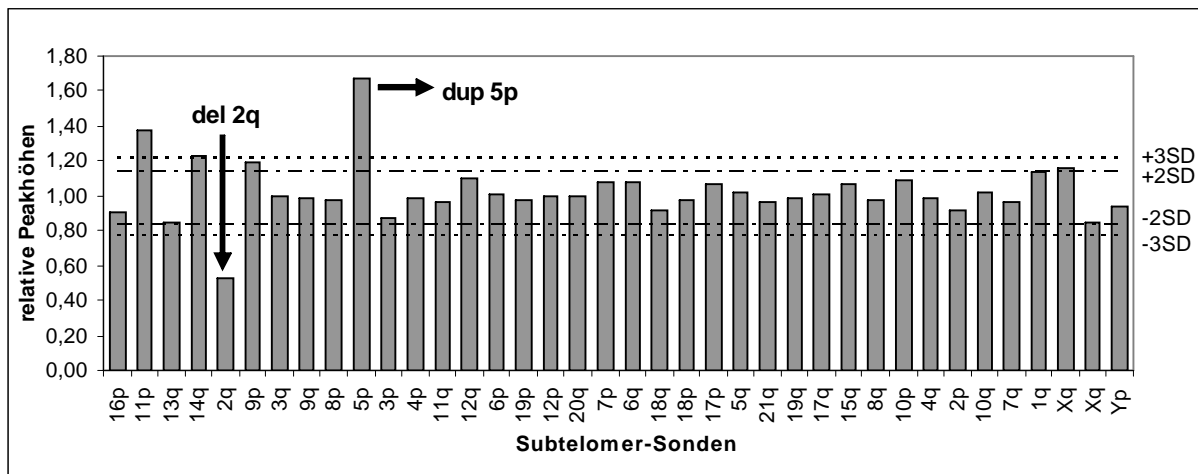


Abbildung 18: MAPH-Ergebnisse eines Experimentes für den Fall 2: Deletion der Subtelomerregion 2q, Duplikation der Region 5p (Sonde 5p war als unzuverlässig bewertet). Die potentiellen Duplikationen 11p und 14q wurden nur im dargestellten Experiment beobachtet und galten damit als unauffällig.

Die MAPH-Sonde 5p wurde wegen Überschreitung des Schwellenwertes der Standardabweichung (0,15) allgemein als unzuverlässig erachtet und damit aus der Bewertung aller durchgeführten MAPH-Experimente ausgeschlossen (vgl. 4.2.1). Trotz der großen



Variabilität der mit dieser Sonde erhobenen Daten war die Duplikation der Subtelomerregion 5p beim Patienten eindeutig nachweisbar (Abbildung 18). Die relativen Peakhöhen dieser Sonde lagen in beiden durchgeführten Experimenten mehr als 3SD über dem Median und waren damit als Kopienzahlveränderung zu interpretieren (vgl. Tabelle 19).

Fall 4: Karyotyp: 46, XY, der(22)t(7;22)(q36.3;q13.33)

Für den Fall 4 (JH) war durch FISH mit dem ToTelVysion-System eine Translokation zwischen den Subtelomerregionen 7q und 22q mit Duplikation 7q und Deletion 22q detektiert worden. Durch FISH mit Locus-spezifischen Sonden waren die Bruchpunkte auf die Chromosomenbanden 7q36.3 bzw. 22q13.33 festgelegt worden.

Entsprechend der Sonde 5p war die MAPH-Sonde 22q aufgrund einer Standardabweichung über 0,15 aus der Bewertung aller Experimente ausgeschlossen worden. Dennoch konnte mit dieser Sonde die Deletion der Subtelomerregion 22q beim Patienten eindeutig nachgewiesen werden. In den MAPH-Experimenten lagen die relativen Peakhöhen um mehr als 3SD unter dem Median (vgl. Tabelle 19).

Die bekannte Duplikation der Subtelomerregion 7q konnte dagegen durch MAPH nicht erfasst werden. In beiden durchgeführten Experimenten lag die relative Peakhöhe dieser Sonde innerhalb des Intervalls der 2SD um den Median (vgl. Tabelle 18, „o.B.“ und Tabelle 19). Dieses Ergebnis war gemäß der Definition als unauffällig zu werten, es gab keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Kopienzahlveränderung der Region 7q.

Für dieses Resultat gab es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen konnte es sich um ein falsch-negatives Ergebnis handeln, wobei die Aberration beispielsweise aufgrund zu weit gewählter Schwellenwerte nicht detektiert wurde. Zum anderen konnte aber auch eine Lokalisation der verwendeten MAPH-Sonde außerhalb des duplizierten Bereiches die Ursache für den fehlenden Nachweis darstellen. Durch *in silico*-Analysen wurde die exakte Lokalisation der verwendeten MAPH-Sonde relativ zur FISH-Sonde bzw. relativ zum Bruchpunkt in 7q bestimmt. Die Sondenlokalisationen wurden mithilfe der UCSC- und NCBI-Genome-Browser ermittelt (<http://www.genome.cse.ucsc.edu>, freeze Juli 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>). Danach war die MAPH-Sonde mit einer Distanz von 2,65Mb proximal zur FISH-Sonde bzw. mit einer Distanz von 2,36Mb proximal zum vorliegenden Bruchpunkt lokalisiert (Abbildung 19). Diese Sonde war damit für den Nachweis der vorliegenden Duplikation ungeeignet. Das beobachtete MAPH-Resultat konnte dementsprechend auf eine zu proximale Position der Sonde 7q zurückgeführt werden. Da jedoch die verwendete MAPH-Sonde für die detektierte Region korrekterweise eine Disomie ergab, handelte es sich nicht um ein falsch-negatives Ergebnis.

Als Folge des fehlenden Nachweises der Subtelomeraberration 7q wurde die Lokalisation sämtlicher MAPH- und FISH-Sonden durch *in silico*-Analysen bestimmt (vgl. 4.3).

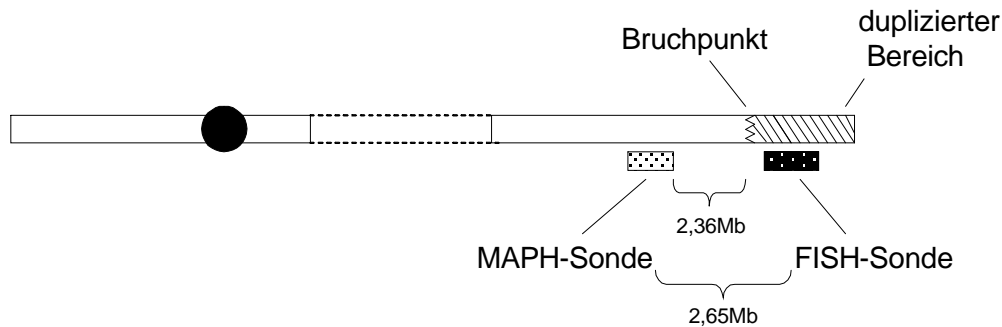


Abbildung 19: Lokalisation der verwendeten MAPH-Sonde 7q in Relation zur FISH-Sonde bzw. zum Bruchpunkt 7q36.3 der partiellen Duplikation 7q (Fall 4).

#### 4.2.4.2 Falsch-Negativ-Rate der MAPH bei 2SD und 3SD

Anhand der sieben Fälle mit bekannten Subtelomeraberrationen wurde der sich unter den beiden verschiedenen strengen Auswertungskriterien (2SD und 3SD) ergebende Anteil falsch-negativer MAPH-Ergebnisse, also derjenige Anteil, mit dem eine tatsächliche Aberration nicht durch MAPH detektiert wurde, bestimmt. Es konnten acht der neun bekannten Subtelomeraberrationen (partielle Deletion 2q (zweimal), 14q, 16p, 22q, Yq; partielle Duplikation 5p, 8q) durch MAPH nachgewiesen werden. In Tabelle 19 sind die MAPH-Ergebnisse aus je zwei Experimenten für die aberranten Subtelomerregionen der Positivkontrollen zusammengestellt. Es sind jeweils die zugehörigen Schwellenwerte (2SD und 3SD), die als Grenze zwischen normal und auffällig definiert wurden und deren Unter- bzw. Überschreitung als potentielle Kopienzahlveränderung gewertet wurde, angegeben. Der unter- bzw. überschrittene Schwellenwert ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die relativen Peakhöhen waren deutlich in Richtung der Erwartungswerte für Deletionen (0,5) bzw. Duplikationen (1,5) verschoben, sie lagen in allen Fällen um mehr als 3SD unter (bei Deletionen) bzw. über (bei Duplikationen) dem Median ( $X_M$ ). Eine der bekannten Aberrationen (partielle Duplikation 7q) konnte nicht durch MAPH detektiert werden, da die verwendete Sonde proximal zum Bruchpunkt der betreffenden Aberration lokalisiert war (vgl. Abbildung 19). Dieses Resultat war daher nicht als falsch-negatives Ergebnis zu werten. Für zwei aberrante Subtelomerregionen (5p, 22q) war die verwendete Sonde als unzuverlässig bewertet worden. Dennoch war ein eindeutiger Nachweis der betreffenden Aberrationen durch MAPH gegeben.

Im Rahmen der Erfassungsgenauigkeit der Sonden des zur Verfügung stehenden MAPH-Sondensets blieb sowohl bei eng gesetzten Schwellenwerten (2SD) als auch bei weiten Schwellenwerten (3SD) keine der bekannten Aberrationen undetektiert. Dabei lag eine Sonde (7q) nicht im Duplikationsbereich. Die Falsch-Negativ-Rate der MAPH-Technik lag unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Auswertungskriterien bei 0% (0/8).

Fall	Sonde	relative Peak-höhe	<sup>1</sup> X <sub>M</sub>	obere Schwelle X <sub>M</sub> +2SD / X <sub>M</sub> +3SD	untere Schwelle X <sub>M</sub> -2SD / X <sub>M</sub> -3SD	Erwartungswert	Beurteilung
1 (del (14q))	14q	<b>0,65</b>	1,00	1,15 / 1,22	0,85 / <b>0,78</b>	0,50	Monosomie
		<b>0,62</b>	1,00	1,12 / 1,18	0,89 / <b>0,82</b>		
2 (del (2q))	2q	<b>0,53</b>	0,99	1,14 / 1,21	0,84 / <b>0,77</b>	0,50	Monosomie
		<b>0,51</b>	1,00	1,12 / 1,19	0,87 / <b>0,80</b>		
2 (dup (5p))	5p	<b>1,67</b>	0,99	1,14 / <b>1,21</b>	0,84 / 0,77	1,50	Trisomie
		<b>1,35</b>	1,00	1,12 / <b>1,19</b>	0,87 / 0,80		
3 (del (2q))	2q	<b>0,53</b>	0,99	1,17 / 1,26	0,81 / <b>0,72</b>	0,50	Monosomie
		<b>0,58</b>	1,00	1,21 / 1,31	0,79 / <b>0,69</b>		
4 (dup (7q))	7q	1,00	1,01	1,16 / 1,24	0,86 / 0,79	1,00	Disomie
		1,00	1,00	1,14 / 1,22	0,87 / 0,80		
4 (del (22q))	22q	<b>0,53</b>	1,01	1,16 / 1,24	0,86 / <b>0,79</b>	0,50	Monosomie
		<b>0,69</b>	1,00	1,14 / 1,20	0,87 / <b>0,80</b>		
5 (del (16q))	16q	<b>0,51</b>	1,00	1,13 / 1,19	0,88 / <b>0,81</b>	0,50	Monosomie
		<b>0,71</b>	1,00	1,14 / 1,21	0,86 / <b>0,76</b>		
6 (del (Yq))	XqYq	<b>0,57</b>	0,99	1,15 / 1,23	0,83 / <b>0,76</b>	0,50	Monosomie
		<b>0,62</b>	0,99	1,16 / 1,24	0,83 / <b>0,74</b>		
7 (dup (8q))	8q	<b>1,54</b>	0,99	1,15 / <b>1,22</b>	0,84 / 0,76	1,50	Trisomie
		<b>n.a.</b>	1,00	1,21 / 1,31	0,80 / 0,70		

Tabelle 19: Ergebnisse aus je zwei MAPH-Experimenten für die Regionen mit bekannten Aberrationen und zugehörige Schwellenwerte (2SD und 3SD). <sup>1</sup>Median über alle Sonden (Intervall 0,8-1,2) dieses Patienten im entsprechenden Experiment, Fall 4: nicht durch MAPH-Sonde detektierbar, *kursiv*: Sonde nicht zuverlässig.

#### Falsch-Positiv-Rate der MAPH bei 2SD und 3SD

Unter Berücksichtigung der zuverlässigen Sonden wurden 254 Subtelomerregionen der sieben Positivkontrollen analysiert (Tabelle 20). Unter dem strengen Kriterium der 2SD ergab sich dabei eine Falsch-Positiv-Rate von 1,97% (5/254), bei weiten Schwellenwerten eine um den Faktor fünf geringere Rate von 0,40% (1/254). Die Falsch-Negativ-Rate lag in beiden Fällen, wie oben beschrieben, bei 0%.

	Schwelle 2SD	Schwelle 3SD
Falsch-Positiv-Rate	1,97% (5/254)	0,40% (1/254)
Falsch-Negativ-Rate	0,00% (0/6)	0% (0/8)

Tabelle 20: Falsch-Positiv- und Falsch-Negativ-Raten bei 2SD und 3SD. MAPH-Ergebnisse der sieben Positivkontrollen.

Das Kriterium der 3SD bedingte eine Verringerung des Anteils falsch-positiver MAPH-Ergebnisse, d.h. die Spezifität der Technik wurde erhöht. Die Sensitivität für die Detektion der Subtelomeraberrationen war unter diesem Kriterium dennoch in jedem Fall ausreichend.

#### **4.2.4.3 Spezifität der MAPH-Sonden**

Die korrekte Lokalisation der MAPH-Sonden sowie ihre Einzigartigkeit im Genom wurden durch die Analyse der Positivkontrollen überprüft. In den eigenen Arbeiten wurde dies für acht Sonden (2q, 5p, 7q, 8q, 14q, 16p, 22q, XqYq) durchgeführt. Mit Ausnahme der

Duplikation 7q konnten sämtliche Aberrationen der Positivkontrollen unter Verwendung dieser Sonden nachgewiesen werden. Damit war die Spezifität der genannten Sonden bewiesen. Zur Sonde 7q konnte keine Aussage gemacht werden, sie war proximal zur duplizierten Region lokalisiert.

Die Charakterisierung neun weiterer Sonden des Sondensets B (1p, 6p, 6q, 7p, 15q, 18p, 18q, 20q, Xq) erfolgte am LUMC in Leiden. Die Spezifität dieser Sonden wurde dort bestätigt (vgl. 3.4.1.2). Damit wurde für 15 der 37 zuverlässigen Sonden des Sondensets B die korrekte Lokalisation sowie die Einzigartigkeit im Genom verifiziert.

#### 4.2.5 MAPH-Ergebnisse der prospektiv analysierten Fälle

Nach der Etablierungsphase anhand retrospektiv analysierter Fälle (Negativ- und Positivkontrollen) wurde die MAPH auf zehn Fälle des MR-Kollektivs angewandt, für die keine Absicherungen durch eine unabhängige Subtelomeranalyse vorlagen (prospektiv untersuchte Fälle). Mit der Zielsetzung einer möglichst niedrigen Falsch-Negativ-Rate wurde in dieser ersten Anwendungsphase der MAPH vorsichtshalber auch das strenge Kriterium der 2SD für die Auswertung zugrunde gelegt. Wie für die retrospektiv analysierten Fälle beschrieben, wurden jeweils die Ergebnisse zweier MAPH-Experimente kombiniert. Bei zwei Fällen wurde für das erste Experiment das Sondenset A, für das zweite Experiment das Set B verwendet. Bei acht Fällen kam für beide MAPH-Experimente das Set B zum Einsatz. Unter Berücksichtigung der 32 zuverlässigen Sonden des Sets A und 37 zuverlässigen Sonden des Sets B waren insgesamt 370 Subtelomerregionen zu analysieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Schwelle	o.B./o.B.	o.B./auff.	o.B./n.a.	auff./auff.	auff./n.a.	n.a./n.a.
<b>X<sub>M</sub>±2SD</b>	n=293 79,19%	n=56 15,14%	n=18 4,86%	n=0 0%	n=2 0,54%	n=1 0,27%
	unauffällig: n=367 (99,19%)			auffällig: n=2 (0,54%)		n.a.: n=1 (0,27%)
<b>X<sub>M</sub>±3SD</b>	n=339 91,62%	n=12 3,24%	n=19 5,14%	n=0 0%	n=0 0%	n=0 0%
	unauffällig n=370 (100%)			auffällig: n=0 (0%)		n.a.: n=0 (0%)

Tabelle 21: Häufigkeiten der MAPH-Ergebniskombinationen für das prospektiv untersuchte Kollektiv bei engen (2SD) und weiten (3SD) Schwellenwerten (zehn Patienten, insgesamt 370 Subtelomerregionen).

Bei eng gewählten Schwellenwerten wurden 367 Subtelomerregionen (99,19%) als unauffällig bewertet, eine Region (0,27%) war nicht analysierbar. Für zwei Regionen (0,54%) wurden durch MAPH potentielle Deletionen detektiert. Die Überprüfung dieser möglichen Aberrationen erfolgte durch FISH und ergab für die fraglichen Subtelomerregionen jeweils ein unauffälliges Resultat. Unter dem Maßstab der 3SD ergab sich für alle analysierten Subtelomerregionen der zehn prospektiv untersuchten Fälle ein unauffälliges Ergebnis, so dass keine Zusatzanalysen erforderlich waren.

#### 4.2.6 Effizienz der MAPH

Die wichtigsten Faktoren bei der Beurteilung der Effizienz der MAPH sind der zeitliche Aufwand, der für eine Subtelomeranalyse erforderlich ist, sowie der Anteil falsch-positiver MAPH-Ergebnisse, welche in FISH-Experimenten überprüft werden müssen. Die Durchführung und die Auswertung eines MAPH-Experimentes, bei dem zwölf Patienten gleichzeitig untersucht wurden, erforderten inklusive Inkubationszeiten und Gellaufzeiten etwa drei Arbeitstage. Für die Beurteilung der Subtelomerregionen waren jeweils die Ergebnisse zweier unabhängiger MAPH-Experimente notwendig. In Kapitel 4.2 wurde gezeigt, dass für etwa jeden fünften Patienten eines der beiden Experimente im ersten Versuchsansatz nicht auswertbar war, so dass ein weiteres Experiment durchgeführt werden musste. Somit waren in der vorliegenden Arbeit pro Patient durchschnittlich etwa 2,2 Experimente erforderlich. Für eine vollständige MAPH-Analyse ergibt sich daraus pro Patient ein zeitlicher Aufwand von durchschnittlich einem halben Arbeitstag (ca. 4,5h).

Unter Verwendung der 2SD als Schwellenwert wurde für das Kollektiv von Patienten ohne Subtelomeraberrationen (Negativkontrollen) eine Falsch-Positiv-Rate von 1,01% bestimmt. 0,32% aller betrachteten Regionen waren nicht auswertbar. Bezogen auf die 37 der insgesamt 43 Subtelomerregionen, welche mit dem zur Verfügung stehenden Sondenset analysiert werden konnten, wären demnach pro Patient rechnerisch 0,49 Subtelomerregionen in Verifizierungsexperimenten (FISH) zu überprüfen gewesen (vgl. 4.2.3.1), wenn keine Befunde aus FISH-Analysen vorgelegen hätten. Das bedeutet, dass bei etwa jedem zweiten Fall eine Hybridisierung erforderlich gewesen wäre. Unter Verwendung der 3SD, deren Sensitivität für einen eindeutigen Nachweis von Subtelomeraberrationen ausreichte (vgl. 4.2.4.2), lag sowohl die Falsch-Positiv-Rate als auch der Anteil nicht analysierbarer Regionen bei 0,05%, so dass pro Patient rechnerisch 0,04 Subtelomerregionen in Verifizierungsexperimenten zu charakterisieren gewesen wären (vgl. 4.2.3.2). Das bedeutet es wäre eine Hybridisierung bei jedem 25. Patienten notwendig gewesen. Für eine vollständige Analyse aller 43 relevanten Subtelomere wären unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit generell sechs Regionen, für die noch keine zuverlässigen Sonden im Set enthalten waren (1p, 5p, 16q, 20p, 22q, Xp), durch FISH zu untersuchen. Hätten keine Befunde aus FISH-Analysen vorgelegen, so wären damit nach MAPH-Analyse pro Patient insgesamt 6,49 (2SD) bzw. 6,04 (3SD) zusätzliche Hybridisierungen erforderlich gewesen. Es ist zu erwarten, dass sich die Anzahl nötiger FISH-Untersuchungen nach Vervollständigung des MAPH-Sondensets deutlich verringern würde.

#### 4.3 Lokalisationen der Sonden: Ergebnisse der *in silico*-Analysen

Als Folge des fehlenden MAPH-Nachweises der partiellen Duplikation 7q, welche auf eine zu proximale Lage der MAPH-Sonde 7q zurückzuführen war (vgl. 4.2.4.1), wurden für sämtliche

verwendete Subtelomersonden die Entfernungen vom Telomer durch *in silico*-Analysen ermittelt. Zudem wurden die zwischen den einzelnen MAPH- und FISH-Sonden vorliegenden Distanzen berechnet. So sollte die Sensitivität der verwendeten Sondensets bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen abgeschätzt und die Aussagekraft der MAPH zur Voranalyse der Subtelomere beurteilt werden. Die Sensitivität von Subtelomersonden ist umso größer, je geringer ihre Entfernung vom Chromosomenende ist. Wegen der zum Telomer hin steigenden Häufigkeit von repetitiven Sequenzen und der damit steigenden Wahrscheinlichkeit von Kreuzhybridisierungen sowie wegen fehlender Sequenzdaten der Subtelomerregionen ist jedoch oft keine beliebig distale Lokalisation möglich.

Die Lage der MAPH-Sonden wurde durch Vergleich der Sondensequenzen und der Sequenz des menschlichen Genoms mittels der UCSC- und NCBI-Genome Browser ermittelt (vgl. Tabelle 26 im Anhang) (<http://www.genome.cse.ucsc.edu>, freeze Juli 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>).

Zur Abschätzung der Positionen der FISH-Sonden wurde jeweils ein in der Sondensequenz enthaltener Marker (z.B. STS) verwendet, dessen Lokalisation im Genom ebenfalls durch Sequenzvergleich bestimmt wurde (vgl. Tabelle 22 und Tabelle 23 im Anhang). Für das eigene Sondenset wurden die entsprechenden Marker und deren Primersequenzen der Publikation des „optimized set of human telomere clones“, Knight et al. (2000) entnommen. War der laut Autorenangaben in der Sondensequenz enthaltene Marker nicht in den Bezugsdatenbanken zu finden, so wurde die von Knight et al. (2000) angegebene Lokalisation übernommen (in Tabelle 23 besonders gekennzeichnet). Beim ToTelVysion Probe Panel wurden die vom Hersteller (Fa. Vysis) angegebenen Marker und deren Synonyme zur Bestimmung der Sondenlokalisationen verwendet (Tabelle 22 im Anhang; online einsehbar unter <http://www.vysis.com>).

Die Sonden des eigenen Sondensets waren durchschnittlich 320kb vom jeweiligen Chromosomenende entfernt lokalisiert, der Median lag bei 186kb. Dabei wiesen vier Sonden Distanzen von über 500kb vom Telomer auf (3q: 901kb, 9p: 600kb, 11q: 3,3Mb, 17q: 828kb), für zwei Sonden war die Lokalisation unbekannt (5p, 12p). Die übrigen 35 Sonden lagen weniger als 500kb vom Telomer entfernt.

Bei neun der 41 Subtelomersonden des ToTelVysion Probe Panels war keine Angabe zur Sondenlokalisation möglich, da die vom Hersteller angegebenen Marker und deren Synonyme nicht in den Bezugsdatenbanken zu finden waren. Die übrigen Sonden dieses Sets wiesen im Durchschnitt eine Distanz von 263kb vom Telomer auf, der Median lag bei 200kb. Dabei war die distalste Sonde etwa 7kb (7q), die proximalste Sonde 910kb (3q) vom Telomer entfernt.

Die MAPH-Sonden wiesen mit durchschnittlich 1,6Mb einen deutlich größeren Abstand vom Telomer auf als die verwendeten FISH-Sonden, der Median betrug 1,1Mb. 21 Sonden lagen weniger als 1,0Mb, 13 davon sogar weniger als 500kb vom zugehörigen Chromosomenende

entfernt. Die übrigen 22 Sonden besaßen Distanzen zwischen 1,0Mb und 8,0Mb vom Telomer.

Die Entfernungen der einzelnen MAPH- und FISH-Sonden vom jeweiligen Chromosomenende sowie deren Abstände zueinander sind in Tabelle 27 zusammengestellt. Für die Gonosomen-spezifischen MAPH-Sonden Xp, Yp und Xq wurden jeweils die Entfernungen zu den FISH-Sonden XpYp bzw. XqYq bestimmt. Etwa 86% der MAPH-Sonden waren proximal zu den jeweiligen FISH-Sonden lokalisiert, wobei der Abstand zwischen den Sonden im Durchschnitt bei 1,4Mb lag. Für den größten Teil der MAPH-Sonden war damit die Sensitivität bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen geringer einzustufen als diejenige der FISH-Sonden.

## 5 Diskussion

Kryptische und damit konventionell-cytogenetisch nicht erfassbare Chromosomenaberrationen haben in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung für die cytogenetische Diagnostik gewonnen. Die bekanntesten Beispiele für solche Aberrationen sind Mikrodeletionen wie das Williams-Beuren-Syndrom (del 7q11.23) oder das DiGeorge-Syndrom (del 22q11.2). Bisher wurden kryptische Aberrationen meist nur dann nachgewiesen, wenn eine balanciert erscheinende Translokation oder Inversion im Bruchpunkt zur Disruption und damit zum Ausfall eines Gens führte oder wenn aufgrund eines klinischen Anfangsverdachts gezielt bestimmte Chromosomenregionen durch molekular-cytogenetische oder molekulargenetische Techniken untersucht wurden. Bei der Suche nach Bereichen gehäufte kryptischer Chromosomenstörungen gelten vor allem die Subtelomerregionen als viel versprechende Kandidatenregionen. Diese Regionen liegen proximal im Anschluss an die eigentliche Telomer-DNA und weisen eine extrem hohe meiotische Rekombinationsrate auf (Hultén et al., 1989). Ihre repetitive Struktur mit zahlreichen Homologien im Genom begünstigt Fehlpaarungen, was in Kombination mit der hohen Rekombinationsrate eine erhöhte Aberrationsfrequenz erwarten lässt. Da die Subtelomere die genreichsten Regionen des menschlichen Genoms darstellen (Saccone et al., 1992), ist bei Aberrationen dieser Bereiche mit deutlichen phänotypischen Konsequenzen zu rechnen. Die hohe klinische Relevanz solcher Störungen wurde vor allem bei Patienten mit mentaler Retardierung aufgezeigt, die etwa 2-3% der Bevölkerung ausmachen (Birch et al., 1970; Knight et al., 1999). In einer ersten systematischen Untersuchung von 99 Patienten mit MR unbekannter Ursache und unauffälligem Karyotyp wurden bei etwa 5% der Patienten Subtelomeraberrationen nachgewiesen (Flint et al., 1995). Seitdem sind zahlreiche Studien zur Analyse der Subtelomerregionen bei Patienten mit MR publiziert worden, welche sich zum einen in der Größe und Zusammenstellung der Kollektive, zum anderen in den jeweils angewandten Untersuchungsmethoden unterscheiden. Xu et al. (2003) geben nach Zusammenfassung der Daten aus 21 Veröffentlichungen, in denen insgesamt 2490 Patienten mit MR analysiert wurden, für die Häufigkeit subtelomerischer Chromosomenaberrationen einen Durchschnittswert von 4,6% an, wobei die Detektionsraten der Einzelstudien zwischen 0% und 29,4% schwanken. Es ist zu erwarten, dass eine systematische Untersuchung der Subtelomerregionen bei einer Vielzahl von Betroffenen mit MR zur Diagnosestellung beitragen wird.

Die vollständige Analyse aller relevanten Subtelomere umfasst insgesamt 43 Regionen. Diese große Anzahl zu analysierender Chromosomenabschnitte sowie die hohe Zahl potentieller Träger kryptischer Subtelomeraberrationen machen den Einsatz hocheffizienter Techniken wünschenswert. Es wurden zahlreiche Methoden für die Analyse der Subtelomer-



regionen entwickelt und angewandt. Einen molekulargenetischen Ansatz stellte das so genannte *Mikrosatelliten-Typing* dar (Flint et al., 1995; Slavotinek et al., 1999), dessen Vorteile in einer hohen Effizienz und der Möglichkeit der Automatisierung liegen (Colleaux et al. 2001; Rio et al., 2002). Außerdem erlaubt diese Technik neben der Detektion von Duplikationen und Deletionen auch den Nachweis uniparentaler Disomien und lässt Aussagen bezüglich der elterlichen Herkunft chromosomaler Störungen zu. Nachteilig sind dagegen zum einen die Notwendigkeit elterlichen Untersuchungsmaterials und zum anderen die eingeschränkte Informativität, welche durch die geringe Anzahl validierter Mikrosatelliten in den subtelomerischen Chromosomenregionen bedingt ist. Selbst bei einer Heterozygotenfrequenz von 80% sind nur 70% aller Monosomien und 50% aller Trisomien mit dieser Methode nachweisbar (Knight und Flint, 2000). Eine weitere Methode, welche zur Analyse der Subtelomerregionen angewandt wurde, ist die von Ghaffari et al. (1998) beschriebene modifizierte *vergleichende genomische Hybridisierung/CGH*. Neben der Notwendigkeit einer spezifischen Mikroskop- und Computerausstattung weist sie vor allem den Nachteil einer geringen Auflösung auf, und selbst eine hochauflösende CGH kann nur Aberrationen bis zu einer Größe von 3-10Mb erfassen (Kirchhoff et al., 2001). Aufgrund der gegebenen Nachteile setzte sich keine der genannten Methoden gegen die *Fluoreszenz in situ-Hybridisierung/FISH* durch, welche bis heute den Goldstandard in der Diagnostik subtelomerischer Aberrationen darstellt. Die Grundlage für die zunehmende Anwendung der FISH bildete die Entwicklung und Optimierung eines vollständigen Sets gut charakterisierter, Locus-spezifischer FISH-Sonden für sämtliche relevanten Subtelomerregionen des menschlichen Karyotyps (National Institute of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration 1996; Knight et al., 2000). Dieses Sondenset wurde unter anderem für die Herstellung kommerziell erhältlicher FISH-Systeme (Chromoprobe Multiprobe T-System, Cytocell; ToTelVysion Multi-Colour Probe Panel, Vysis) verwendet, welche bei der Mehrzahl bisher publizierter Subtelomer-Studien zum Einsatz kamen (z.B. Riegel et al., 2001; Anderlid et al., 2002; Clarkson et al., 2002). Die FISH stellt damit die am häufigsten angewandte und am besten validierte Methode zur Analyse der Subtelomere dar, welche in vielen cytogenetischen Labors etabliert ist. Sie bietet im Unterschied zu den molekulargenetischen Methoden die Möglichkeit, balancierte Aberrationen zu detektieren und die Lokalisation aberranter Regionen festzulegen. Zudem ist bei Verwendung von Sonden bekannter Lokalisation die Sensitivität zur Detektion subtelomerischer Aberrationen genau bestimmbar.

Für die vorliegende Arbeit wurde ebenfalls die FISH zur Analyse der Subtelomere ausgewählt. Mit der S-COBRA-FISH wurde dabei zunächst eine neue Methode zur gleichzeitigen Untersuchung aller Subtelomere in nur zwei Hybridisierungen entwickelt. Diese wurde anschließend mit zwei weiteren FISH-Techniken, dem kommerziell erhältlichen ToTelVysion-System und der ebenfalls selbst erarbeiteten Subtelomer-Sechs-Farben-FISH

hinsichtlich ihrer Sensitivität, Anwendbarkeit und Effizienz bei der Analyse der Subtelomerregionen verglichen. Auf diese Weise sollte die am besten geeignete und effizienteste Methode bestimmt werden. Zudem sollte ermittelt werden, ob eine methodische Weiterentwicklung der Multi-Colour-FISH durch Erhöhung der Anzahl gleichzeitig dargestellter Sonden zu einer Steigerung der Untersuchungseffizienz führte.

Aufgrund des hohen zeitlichen und methodischen Aufwandes, der für die vollständige FISH-Analyse aller Subtelomere eines Patienten erforderlich ist, eignet sich dieses Verfahren bisher nur bedingt für eine schnelle Untersuchung großer Kollektive. Ergänzende Methoden für eine weitere Steigerung der Untersuchungseffizienz bei größeren Patientenzahlen stellen Techniken zur direkten Bestimmung von Kopienzahlen spezifischer genomischer Loci dar. Beispiele für solche *high-throughput*-Verfahren sind die *array*- oder Matrix-CGH und die *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation/MAPH*, deren Eignung zur Detektion subtelomerischer Imbalancen in ersten Studien demonstriert wurde (Sismani et al., 2001; Hollox et al., 2002b; Veltman et al., 2002; Kriek et al., 2004). Da eine diagnostisch wünschenswerte Detektionsrate von annähernd 100% bisher jedoch nicht in klinischen Untersuchungen nachgewiesen wurde, können diese Methoden noch nicht ohne eine Bestätigung durch FISH-Analysen eingesetzt werden. Die Kombination einer *high-throughput*-Methode mit FISH als Verifizierung stellt dementsprechend den nächsten notwendigen Schritt zur Diagnostik subtelomerischer Chromosomenaberrationen in größerem Maßstab dar, um anschließend die FISH zumindest teilweise ersetzen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde die MAPH als Verfahren für die *high-throughput*-Analyse ausgewählt und anhand der retrospektiven Untersuchung eines Kollektivs von Patienten mit MR etabliert. Dieses Kollektiv wurde auch für die Entwicklung und den Vergleich der FISH-Methoden herangezogen. Es war im Rahmen des Forschungsprojektes „Untersuchung von Patienten mit mentaler Retardierung auf kryptische subtelomerische Chromosomenaberrationen durch COBRA-Multi-Colour-FISH“ (DFG, PR131/19-1) rekrutiert und diesem Zusammenhang klinisch gut charakterisiert worden. Bekannte Ursachen der MR wie konventionell diagnostizierbare Chromosomenaberrationen und das FraX-Syndrom waren weitgehend ausgeschlossen. Wie oben erläutert, ist bei etwa 4,6% der Patienten mit MR mit einer Aberration der Subtelomere zu rechnen, so dass dieses Kollektiv eine sinnvolle Basis für die Entwicklung und Erprobung von Methoden zur Untersuchung der Subtelomere darstellte. Von großem Vorteil für die Etablierung der MAPH am Institut für Humangenetik in Bonn war vor allem, dass von 66 Patienten bereits das Ergebnis einer unabhängigen Subtelomeranalyse vorlag, wobei 94% der Patienten durch FISH und 6% durch MAPH, die am LUMC in Leiden durchgeführt worden war, abgeklärt waren. Diese Absicherung ermöglichte es, verschiedene Auswertungsparameter für die MAPH auszutesten, ohne das Risiko, bei einem Patienten eine Aberration zu übersehen. Da von nahezu jedem Patienten des MR-Kollektivs sowohl Metaphasepräparationen als auch extrahierte DNA-Proben

vorlagen, bestand die Möglichkeit, auch prospektiv durch MAPH analysierte Patienten mittels FISH zu überprüfen.

## 5.1 Fluoreszenz in situ-Hybridisierung

### 5.1.1 Vergleich der angewandten FISH-Techniken

Für die Bewertung und den methodischen Vergleich der drei verwendeten FISH-Techniken werden im Folgenden die Aussagekraft des jeweils verwendeten Sondensets sowie die Anwendbarkeit und Effizienz der FISH-Methoden betrachtet. Es wird das ToTelVysion Probe Panel der Firma Vysis dem eigenen Sondenset, welches in der vorliegenden Arbeit entwickelt und sowohl für die Sechs-Farben-FISH als auch für die S-COBRA-FISH eingesetzt wurde, gegenübergestellt. Anschließend soll ein Vergleich mit anderen in der Literatur beschriebenen FISH-Techniken erfolgen (vgl. 5.1.2).

#### Aussagekraft der FISH-Sonden

Ein wichtiger Faktor für die Aussagekraft von FISH-Sonden ist ihre Sensitivität zur Detektion subtelomerischer Aberrationen. Diese wird maßgeblich durch die Lokalisation der Sonden, d.h. durch ihre Entfernung vom jeweiligen Telomer, bestimmt. Dabei nimmt die Sensitivität der Subtelomersonden mit abnehmender Distanz vom Chromosomenende zu. Eine beliebige telomernahe Lokalisation ist jedoch aufgrund der zum Telomer hin zunehmenden Häufigkeit von repetitiven Sequenzen und der damit steigenden Wahrscheinlichkeit von Kreuzhybridisierungen, welche die Spezifität der Sonden herabsetzen, nicht möglich. Des Weiteren sind die Sequenzdaten der Subtelomerregionen häufig noch unvollständig in den Datenbanken repräsentiert. In der Praxis wird durch die Auswahl der möglichst distalsten, spezifischen und bekannten Sequenzen als Sonden ein Kompromiss zwischen der Spezifität und der Sensitivität getroffen (Knight und Flint, 2000).

In der vorliegenden Arbeit fanden zwei verschiedene Sets subtelomerischer Sonden Anwendung: Für das ToTelVysion-System wurde das ToTelVysion Probe Panel der Firma Vysis verwendet, für die Sechs-Farben-FISH und die S-COBRA-FISH wurde ein eigenes Subtelomer-Sondenset zusammengestellt. Mit Ausnahme der Sonde 19p wurden für dieses Set alle Sonden aus dem „optimized set of human telomere clones“ nach Knight et al. (2000) ausgewählt. In der genannten Publikation war für jede Sonde die maximale physikalische Distanz vom zugehörigen Chromosomenende angegeben, welche aus der Kombination der Ergebnisse aus Fiber-FISH-Analysen, Interphase-FISH, Sequenzanalysen und *Radiation Hybrid-Mapping* abgeschätzt worden waren. Darüber hinaus lagen Informationen über die in den Sondensequenzen enthaltenen Mikrosatelliten und Marker (z.B. STS) sowie deren Primersequenzen vor. Für die Sonden des ToTelVysion Probe Panels standen ebenfalls

Angaben über entsprechende Marker und deren Synonyme zur Verfügung (<http://www.vysis.com>), wobei jede Sonde laut Herstellerangaben einen Marker enthalten sollte, dessen Distanz vom Telomer maximal 300kb betrug. Detailliertere Informationen über die Lokalisationen der einzelnen Sonden lagen jedoch nicht vor. Allgemein müssen solche Distanzangaben mit Vorsicht bewertet werden, da in den zur Verfügung stehenden Sequenzdatenbanken des menschlichen Genoms vor allem die Subtelomerregionen wegen ihrer hohen Sequenzähnlichkeit (90% bis >99,5%) zwischen homologen Regionen noch immer lückenhaft repräsentiert werden. Teilweise sind die Angaben jedoch auch fehlerhaft, so dass infolge zunehmender Sequenzaufklärungen mit weiteren Veränderungen dieser Daten zu rechnen ist (Riethman et al., 2004). Da 15 Sonden des Vysis-Sets auch aus dem „optimized set of human telomere clones“ stammten, konnten für sie die von Knight et al. (2000) angegebenen Lokalisationen übernommen werden.

Um jedoch alle verwendeten Sonden zum einen untereinander, zum anderen aber auch mit den Sequenzdaten der Telomerregionen vergleichbar zu machen, wurden für die eigene Arbeit die aktuell gültigen Sonden- bzw. Markerpositionen durch *in silico*-Analysen bestimmt. Als Bezugsdatenbanken wurden die UCSC- und NCBI-Datenbanken verwendet (<http://www.genome.cse.ucsc.edu>, freeze Juli 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>). Da hier im Unterschied zum Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/Homo-sapiens/>) verschiedene Datenbankversionen auch nach Überarbeitung infolge weiterer Sequenzaufklärungen des menschlichen Genoms zugänglich bleiben, können Veränderungen auch in Zukunft nachvollzogen und auf die in der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegten Distanzangaben übertragen werden. Für 28 der insgesamt 41 Sonden des eigenen Sets konnten auf diese Weise die Markerpositionen und damit die jeweiligen Entfernungen vom Telomer abgeschätzt werden. Für 13 Sonden waren die angegebenen Marker nicht in den Bezugsdatenbanken zu finden, so dass für diese die von Knight et al. angegebene Entfernung übernommen wurde. Für zwei dieser Sonden (5p, 12p) lagen jedoch auch hier keine Angaben über die jeweilige Lokalisation vor. Für die Sonden des eigenen Sets wurde so eine durchschnittliche Telomerdistanz von 320kb bestimmt. Während 35 Sonden weniger als 500kb vom Telomer entfernt lagen, wiesen drei Sonden eine Telomerdistanz von über 500kb auf (3q: 901kb, 9p: 600kb, 17q: 828kb), eine Sonde (11q) lag sogar mehr als 3,3Mb vom Telomer entfernt. Da mit dieser Sonde nur Aberrationen ab einer Größe von 3,3Mb nachweisbar sind, ist ihre Sensitivität bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen eingeschränkt. Für die oben erwähnten zwei Sonden (5p, 12p) war die Lokalisation unbekannt.

Bei dem ToTelVysion Probe Panel konnte für 24 Sonden durch *in silico*-Analysen die entsprechende Distanz vom Telomer ermittelt werden, für sieben Sonden wurden aufgrund fehlender Datenbankinformationen die von Knight et al. angegebenen Distanzen übernommen, für eine Sonde lagen auch hier keine Informationen vor (5p). Für neun Sonden

dieses Sets war keine Angabe zur Sondenlokalisierung möglich, da die vom Hersteller angegebenen Marker und deren Synonyme nicht in den Bezugsdatenbanken zu finden waren. Die Sonden bekannter Lokalisation (n=31) besaßen im Mittel eine Distanz von 263kb vom Telomer, wobei drei Sonden Distanzen von über 500kb aufwiesen (3q: 910kb; 4q: 839kb; 17q: 828kb), die übrigen 28 Sonden lagen weniger als 500kb vom Chromosomenende entfernt.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Subtelomeraberrationen sind bis auf seltene Ausnahmen größer als 500kb (Knight et al., 1999; Rossi et al., 2001; Hélias-Rodezewicz et al., 2002), und die Sensitivität der Sonden bekannter Lokalisation wird bei beiden verwendeten SONDENSETS im Allgemeinen als ausreichend angesehen. Die Eignung des ToTelVysion Probe Panels sowie der Sonden des „optimized set“ für den Nachweis subtelomerischer Chromosomenaberrationen ist in der Literatur vielfach belegt (Anderlid et al., 2002; Baker et al., 2002; Jalal et al., 2003) und konnte auch in der eigenen Arbeit durch die Detektion von sieben subtelomerischen Veränderungen (drei unbalancierte Translokationen, drei Deletionen, ein Polymorphismus) im untersuchten Kollektiv von Patienten mit MR (n=66) bestätigt werden. Fünf Aberrationen wurden durch das ToTelVysion Probe Panel detektiert und mit den Sonden des eigenen Sets verifiziert, zwei Veränderungen wurden durch das eigene Set detektiert, wobei eine Bestätigung unabhängig von den eigenen Untersuchungen im Rahmen einer Bruchpunktanalyse erfolgte. Es wäre jedoch eine weitere Annäherung der Sonden an die entsprechenden Telomere wünschenswert, um eventuell vorhandene kleinere Aberrationen nachzuweisen.

Trotz der anscheinend vergleichbaren Sensitivität der Sonden lässt das ToTelVysion Probe Panel einen deutlichen Nachteil gegenüber dem eigenen SONDENSET erkennen. Da für etwa 25% der Sonden dieses Sets die vom Hersteller angegebenen Marker nicht in den Bezugsdatenbanken zu finden waren, ist ihre Lokalisation nicht zu ermitteln und die Sensitivität letztlich nicht zu beurteilen. Ein zusätzlicher Nachteil wird vor allem nach der Detektion subtelomerischer Aberrationen deutlich, welche ohne Lokalisationsangabe und damit ohne Bezugspunkt zur Telomersequenz weder exakt bestimmt noch näher charakterisiert werden können. In solchen Fällen sind Nachuntersuchungen mit Sonden bekannter Position erforderlich, anhand derer genauere Angaben zur Größe der diagnostizierten Aberrationen gemacht werden und gegebenenfalls weitere Locus-spezifische FISH-Sonden für eine Bruchpunktanalyse ausgewählt werden können. In den eigenen Untersuchungen waren bei vier der fünf mit dem ToTelVysion Probe Panel detektierten Aberrationen erst durch den Nachweis mit den gut beschriebenen Sonden des eigenen Sets nähere Charakterisierungen der aberranten Regionen möglich.

Es bleibt festzuhalten, dass sich das ToTelVysion Probe Panel zwar aufgrund relativ telomernaher Lokalisation der enthaltenen Sonden für die Subtelomeranalyse gut eignet, jedoch wegen fehlender Bezugsdaten für einige Sonden keine ausreichende Aussagekraft

liefert. Für Fragestellungen, bei denen die Genauigkeit der Angaben von zentraler Bedeutung ist, sollte das gut charakterisierte eigene Sondenset, für das die meisten Sonden in den Datenbanken lokalisiert waren, für die Analysen bevorzugt werden.

Das Auftreten polymorpher Sequenzen in den Subtelomerregionen spielt eine wichtige Rolle für die Auswahl und die Aussagekraft von Sonden sowie bei der Bewertung von FISH-Ergebnissen. Polymorphismen in den Subtelomerregionen resultieren aus der variablen Länge genomischer Sequenzen und haben keinen Krankheitswert. Sonden, deren Zielsequenz eine variable Größe aufweist, liefern unterschiedlich starke Hybridisierungssignale, die bei kurzen Zielsequenzen häufig nur schwer oder nicht zu erkennen sind und somit fälschlicherweise auf eine Deletion hinzuweisen scheinen (Knight und Flint, 2000). Deletionspolymorphismen sind vor allem für kleine Sonden wie die 35-40kb umfassenden cosmid-Sonden des Subtelomer-Sondensets der ersten Generation beschrieben (National Institute of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration 1996). Bei ohnehin kleinen Signalen, wie sie bei diesen Sonden vorliegen, führt schon eine geringe Größenveränderung der Zielregion zu einem Verlust der Sichtbarkeit des Hybridisierungssignals. Beispiele für solche polymorphen Sonden sind die cosmid-Klone 2112b2 für die Subtelomerregion 2q (Macina et al., 1994; Knight et al., 2000), CY29 für die Region XpYp (Ballif et al., 2000) und 2111a5 für die Region 17p (Martin et al., 2002). Auch nach Austausch der cosmid-Sonden durch die größeren PAC- und BAC-Sonden (100-200kb) im „optimized set“ der zweiten Generation (Knight et al., 2000) wurden für mehrere Sonden Polymorphismen beschrieben. Der am häufigsten beobachtete Polymorphismus liegt in der Subtelomerregion 2q (Sonden: PAC 1011O17; P1 210E14) und tritt bei etwa 6% der Patienten mit MR auf (Fan et al., 2001). Weitere Sonden, für die Deletionsvarianten detektiert wurden, sind die Sonden BAC 839D20 für XpYp (Jalal et al., 2003), PAC 163C9 für 1q (Shaffer et al., 1999) und PAC 43N6 für 9p (Ballif et al., 2000). Das Auftreten von Polymorphismen in den subtelomerischen Chromosomenregionen erfordert bei auffälligen Patientenbefunden, auch die Chromosomen der Eltern mit denselben Sonden vergleichend zu untersuchen (Shaffer et al., 1999). Nur so lässt sich feststellen, ob es sich bei einer diagnostizierten Auffälligkeit tatsächlich um eine Phänotyp-Verursachende Störung oder um eine familiäre Variante handelt. Neben einer sorgfältigen FISH-Analyse der elterlichen Chromosomen empfehlen Jalal et al. (2003) zusätzlich eine gründliche ärztliche Untersuchung der Eltern mit Dokumentation des Phänotyps. Falls ein Elternteil zusätzlich zu der entsprechenden genotypischen Veränderung auch einige phänotypische Auffälligkeiten aufweist, die auch beim Kind beobachtet werden, ist es möglich, dass der stärkere Phänotyp des Kindes durch eine größere Deletion hervorgerufen ist. Diese Hypothese wäre durch weitere FISH-Untersuchungen mit Locus-spezifischen Sonden aus benachbarten Regionen oder durch Analyse polymorpher Marker zu überprüfen. Segmentale Imprinting-Effekte

stellen einen weiteren Faktor dar, der bei gleichem Genotyp einen unterschiedlichen Phänotyp hervorrufen kann und damit bei der Bewertung der FISH-Befunde berücksichtigt werden muss (Jalal et al., 2003). Wird die beobachtete Aberration nur beim Kind, nicht aber bei den Eltern nachgewiesen, so kann es sich hierbei dennoch um einen de novo entstandenen Polymorphismus und damit nicht um eine Phänotyp-Verursachende Störung handeln. Hier können weitere FISH-Analysen mit Sonden aus den auffälligen Regionen und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zur sicheren Unterscheidung zwischen Polymorphismen und Krankheits-Verursachenden Aberrationen beitragen und damit Fehleinschätzungen der klinischen Relevanz der beobachteten Aberrationen vermieden werden (Riegel et al., 2001). Im Gegensatz zu einigen publizierten Studien zur Analyse der subtelomeren Chromosomenregionen bei Patienten mit MR wurden in den eigenen Arbeiten bei auffälligen FISH-Befunden stets Untersuchungen der elterlichen Chromosomen angeschlossen, um eine sichere Unterscheidung zwischen benignen Varianten und tatsächlichen Aberrationen zu gewährleisten. Zur Erhöhung der Aussagekraft der Analysen wurden bei der Zusammenstellung und Überarbeitung des eigenen Sonden-Sets Sonden mit bekannten Polymorphismen weitgehend durch nicht polymorphe Sonden ersetzt. So wurde durch die gute Vorauswahl der Sonden lediglich bei einem Patienten mit MR eine Deletionsvariante nachgewiesen: durch Sechs-Farben-FISH wurde mit der BAC-Sonde 225F6 für die Region XqYq eine Deletion am langen Arm des Y-Chromosoms detektiert. Da beim gesunden Vater des Patienten unter Verwendung der entsprechenden Sonde die gleiche Yq-Deletion beobachtet wurde, handelte es sich bei dieser Aberration mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Polymorphismus. Eine Deletion der pseudoautosomalen Region 2 (PAR 2), in der auch die eigene Sonde hybridisiert, wurde bereits von Kuhl et al. (2001) als phänotypisch nicht relevant beschrieben.

Kreuzhybridisierungen, welche durch Homologien zwischen der Sondensequenz und anderen Regionen im Genom hervorgerufen werden, stellen einen weiteren Faktor dar, der die Eindeutigkeit von FISH-Ergebnissen und die Effizienz der Auswertung stark einschränkt. Knight et al. (2000) stellten eine Liste von elf Sonden des „optimized set“ zusammen, für welche Kreuzhybridisierungen in einer oder in mehreren Chromosomenregionen beobachtet wurden. Beispiele sind unerwünschte Hybridisierungen der PAC-Sonde 112N13 für 9q in den Chromosomenregionen 10p, 16p, 18p, Xq und Yq oder der PAC-Sonde 362K4 für 17q in den Regionen 1p und 6q. Mit Ausnahme der Kreuzhybridisierungen der Sonde 112N13 für 9q in der Region 16q sind nach Knight et al. (2000) alle unerwünschten Signale in den homologen Regionen deutlich schwächer als die eigentlichen Subtelomersignale, so dass in der Regel eine eindeutige Identifikation und Zuordnung der Signale gewährleistet ist. Auch für die kommerziell erhältlichen Sonden-Sets der Firmen Cytocell und Vysis, welche sich zum Teil aus den Sonden des „optimized set“ zusammensetzen, wurden nach klinischer Anwendung

für einige Sonden Kreuzhybridisierungen beschrieben (Harwood et al., 2001; Jalal et al., 2003). Während von Cytocell potentielle Kreuzhybridisierungen für zehn Subtelomersonden angegeben werden, liegt eine entsprechende Liste von der Firma Vysis nicht vor. Für dieses Sondenset wurden von Harwood et al. (2001) Kreuzhybridisierungen der Sonden 3q, 8p, 8q und 9q in Abhängigkeit von den jeweils gewählten Stringenzbedingungen beobachtet. Unerwünschte Hybridisierungen stellten in der vorliegenden Arbeit weder für das eigene Sondenset noch für das ToTelVysion Probe Panel ein Problem dar. Durch die sorgfältige Vorauswahl der Sonden und die optimale Anpassung der Stringenzbedingungen bei der Hybridisierung und den anschließenden Waschschrritten konnten diese weitgehend minimiert werden. In beiden Sondensets wurden zwar für jeweils eine Sonde Kreuzhybridisierungen beobachtet, diese ließen sich jedoch aufgrund ihrer interstitiellen Lokalisation sowie ihrer Signalgröße und -morphologie eindeutig von den tatsächlichen Subtelomersignalen unterscheiden.

Es ist anzunehmen, dass mit der vermehrten Anwendung der Sonden des „optimized set“ zukünftig weitere seltene Polymorphismen und Kreuzhybridisierungen aufgedeckt werden. Damit werden die einzelnen Sonden zunehmend besser charakterisiert, so dass ihre Anwendbarkeit und deren Einschränkungen bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen zukünftig näher definiert werden kann.

#### Anwendbarkeit und Effizienz der FISH-Techniken

Zur Bewertung der Anwendbarkeit und der Effizienz der drei FISH-Techniken wurden die folgenden Parameter betrachtet: Für jede Methode wurden jeweils die quantitativen und qualitativen Anforderungen an das Untersuchungsmaterial abgeschätzt und der zeitliche und praktische Arbeitsaufwand für die Vorbereitung, die Durchführung und die Auswertung einer vollständigen Subtelomeranalyse bestimmt. Darüber hinaus stellte die Anzahl notwendiger Nachhybridisierungen ein Maß für die Effizienz und damit ein wichtiges Vergleichskriterium dar.

Die drei Multi-Colour-FISH-Methoden unterschieden sich in erster Linie in ihren Multiplizitäten und damit in der Anzahl der für eine Analyse aller 43 relevanten Subtelomerregionen notwendigen Hybridisierungen. Beim ToTelVysion-System, bei dem Multiplizitäten von maximal drei erreicht wurden, waren pro Patient insgesamt 15 Hybridisierungen erforderlich, wobei die Größe der hybridisierbaren Regionen wegen der geringen Volumina der Hybridisierungslösungen sehr eingeschränkt war. Eine erfolgreiche Analyse mit diesem System setzte somit eine große Menge Zellmaterial mit einer hohen Anzahl und Dichte analysierbarer Metaphasen voraus. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Anzahl notwendiger Hybridisierungen bei der Sechs-Farben-FISH aufgrund der Multiplizitäten von fünf bzw. sechs auf insgesamt sieben. Bei der S-COBRA-FISH waren durch eine Erhöhung der Multiplizitäten auf 20 bzw. 21 für eine komplette Subtelomer-



untersuchung sogar nur zwei Hybridisierungen erforderlich. Für die beiden letztgenannten Techniken konnte aufgrund höherer Volumina der Hybridisierungslösung eine im Vergleich zur erstgenannten Methode wesentlich größere Hybridisierungsregion gewählt werden.

Die Notwendigkeit der hohen Zahl und Dichte analysierbarer Metaphasen ließ eine Anwendung des ToTelVysion-Systems nur bei etwa 86% der Patienten zu, wohingegen die Sechs-Farben-FISH und die S-COBRA-FISH bei jedem Patienten des untersuchten Kollektivs hätten eingesetzt werden können. Darüber hinaus war die Herstellung und Beurteilung geeigneter Hybridisierungsregionen beim ToTelVysion-System mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden. Eine deutliche Zeitersparnis gegenüber der Sechs-Farben-FISH und der S-COBRA-FISH ergab sich dagegen bei der Herstellung der Sonden. Während die Sonden des ToTelVysion Probe Panels bereits gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung vorlagen, mussten sie bei den beiden anderen Methoden zunächst markiert und in den einzelnen Hybridisierungsansätzen zusammengestellt werden. Vor allem bei der S-COBRA-FISH erwiesen sich diese Vorarbeiten wegen der hohen Anzahl gleichzeitig in einem Ansatz eingesetzter Sonden als äußerst komplex und zeitaufwendig.

Weil sich die unterschiedlichen Vorteile hinsichtlich der Vorbereitung bei den drei Methoden gegenseitig größtenteils aufwiegen, war der zeitliche Aufwand für die praktische Durchführung bei allen drei Techniken ähnlich. Dagegen war jedoch die Hybridisierungszeit bei der Sechs-Farben-FISH und der S-COBRA-FISH mit 48h mehr als doppelt so lang wie beim ToTelVysion-System. Je nach diagnostischer Situation kann dieser Zeitaufwand einen bedeutenden Nachteil darstellen. Um z.B. für eine gezielte Fragestellung aus der molekulargenetischen Routinediagnostik in kurzer Zeit ein Ergebnis zu erhalten, wäre die Anwendung des ToTelVysion-Systems vorteilhaft. Spielt der Zeitfaktor dagegen eher eine untergeordnete Rolle, wie es beispielsweise bei einer rein wissenschaftlichen Untersuchung in einer Screening-Situation der Fall wäre, so kann die Hybridisierungszeit optimal für die Vorbereitung weiterer Untersuchungen genutzt werden und wäre damit nicht als Zeitverlust zu werten.

Bei der Auswertung der Subtelomeranalysen ergaben sich klare Unterschiede zwischen den drei Techniken, welche zum einen in der Anzahl Metaphasen, zum anderen in der Dauer und der Komplexität der Auswertung deutlich wurden. Für eine vollständige Subtelomeruntersuchung durch S-COBRA-FISH mussten pro Patient durchschnittlich nur 18 Metaphasen ausgewertet werden, wohingegen bei der Sechs-Farben-FISH etwa die doppelte, beim ToTelVysion-System sogar die vierfache Menge an Metaphasen betrachtet werden musste. Diese Unterschiede ergaben sich einerseits aus der verschiedenen Anzahl auszuwertender Hybridisierungen, andererseits bestimmte die Auswertbarkeit der Sonden darüber, wie viele Metaphasen jeweils für eine eindeutige Aussage notwendig waren. Die Gesamtdauer der Auswertung korrelierte nicht immer mit der Zahl analysierter Metaphasen, da die Betrachtung einer einzelnen Zelle je nach Komplexität der FISH-Technik

unterschiedlich lange dauerte. Die visuelle Unterscheidung von 20 bzw. 21 Sonden in einer einzelnen Metaphase, wie es bei der S-COBRA-FISH erforderlich war, beanspruchte deutlich mehr Zeit als die gleichzeitige Differenzierung von maximal drei Sonden beim ToTelVysion-System und von maximal sechs Sonden bei der Sechs-Farben-FISH. Des Weiteren reichte eine rein visuelle Auswertung bei der S-COBRA-FISH nicht zur eindeutigen Identifizierung sämtlicher Sonden einer Hybridisierung aus, so dass hier ein zusätzliches Auswertungsverfahren angewandt werden musste. Damit war die Anzahl zu beurteilender Metaphasen bei der S-COBRA-FISH zwar vergleichsweise gering, die Intensität, mit der jede einzelne Metaphase betrachtet werden musste, ließ die Auswertung allerdings komplex und zeitaufwendig werden.

Zur abschließenden Beurteilung der Subtelomerregionen waren bei allen drei FISH-Techniken Nachhybridisierungen erforderlich, wobei bei der Sechs-Farben-FISH mit 3,5 Nachhybridisierungen pro Patienten mehr als doppelt so viele Zusatzanalysen notwendig waren wie bei den beiden anderen Techniken. Die Ursache für die Nachhybridisierungen lag bei der Sechs-Farben-FISH und der S-COBRA-FISH überwiegend in einer geringeren Unterscheidbarkeit der Vielzahl gleichzeitig dargestellter Sonden, während beim ToTelVysion-System eher die Signalschwäche der Sonden und damit eine ungünstige *signal-to-noise-ratio* im Vordergrund stand. Auffällig war, dass bestimmte Sonden dieses Sets gehäuft keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, was teilweise auf eine geringe Größe dieser Sonden zurückzuführen war. Auch eine ungünstige Kombination starker und schwacher Sonden, wie sie in einigen Hybridisierungsansätzen beobachtet wurde, führte zu nicht eindeutigen Resultaten. Bei der Sechs-Farben-FISH und der S-COBRA-FISH, für die jeweils das eigene Sondenset verwendet wurde, gab es dagegen keine Sonden, die signifikant häufiger als andere nachuntersucht werden mussten, weil Sonden mit einer geringen Signalstärke von vornherein in höheren Konzentrationen eingesetzt wurden. Die hohe Flexibilität, welche durch die beliebige Markierung und Kombinierbarkeit dieser Sonden gewährleistet war, erwies sich auch für die Durchführung der Nachhybridisierungen als vorteilhaft. Je nach Notwendigkeit konnten die Sonden einzeln oder in frei wählbarer Zusammenstellung eingesetzt werden, so dass eine effiziente Nutzung von vorhandenem Zellmaterial und Sonden gewährleistet war. Diese Flexibilität war beim ToTelVysion Probe Panel nicht gegeben, da die Sonden hier als fertig markierte und gemischte Hybridisierungsansätze vorlagen. Wäre man ausschließlich auf dieses Set angewiesen, so müssten die Nachhybridisierungen auch bei gezielter Fragestellung stets mit der kompletten vorgefertigten Sondenkombination durchgeführt werden. Der überflüssige Verbrauch und die damit verbundenen zusätzlichen Kosten lassen dies als unrentabel erscheinen. Zwar werden von der Firma Vysis sämtliche Sonden des Subtelomer-Probe-Panels einzeln angeboten, jedoch ist der Erwerb dieser Einzelsonden ebenfalls mit zusätzlichen Kosten verbunden.

Wie oben erwähnt war der Anteil notwendiger Nachhybridisierungen nach Sechs-Farben-FISH gegenüber den beiden anderen Techniken hoch. Bei der Bewertung dieses Vergleichskriteriums muss allerdings folgendes berücksichtigt werden: Da die Subtelomeranalysen nicht ausschließlich für den methodischen Vergleich der drei FISH-Techniken, sondern im Rahmen eines Projektes zur Untersuchung von Patienten mit MR durchgeführt worden waren, konnten nicht für jede Untersuchung exakt die gleichen Ausgangsbedingungen zugrunde gelegt werden. Die Sechs-Farben-FISH wurde im Rahmen dieser Analysen wiederholt auf schlechteres Zellmaterial angewandt, welches den qualitativen und quantitativen Anforderungen des ToTelVysion-Systems nicht gerecht wurde. Es ist anzunehmen, dass die Qualität und die Auswertbarkeit der Hybridisierungen und damit die Notwendigkeit von Nachuntersuchungen ohne eine solche Vorauswahl des Untersuchungsmaterials für diese Methode geringer ausgefallen wären. Die Effizienz dieser Technik würde sich bei Verwendung von qualitativ gutem Zellsediment vermutlich deutlich erhöhen. Eine zusätzliche Effizienzsteigerung ergibt sich durch die Möglichkeit, mehrere Hybridisierungsansätze gleichzeitig zu markieren und dann in einem Durchgang mehrere Patienten (bis zu vier) parallel zu untersuchen.

### Fazit

Mit allen drei Multi-Colour-FISH-Techniken zur Analyse der subtelomerischen Chromosomenregionen konnten in der vorliegenden Arbeit zuverlässige Ergebnisse erzielt werden. Der umfassende methodische Vergleich zeigte jedoch, dass keine der drei Techniken universell in jeder Anwendungssituation mit konstanter Effizienz eingesetzt werden konnte. Vielmehr erschien eine kombinierte Anwendung der Methoden in Abhängigkeit von der jeweiligen diagnostischen Situation sowie der Menge und Qualität des verfügbaren Untersuchungsmaterials sinnvoll. Damit wurde deutlich, dass durch eine Erhöhung der Anzahl gleichzeitig dargestellter Sonden die Untersuchungseffizienz nicht generell gesteigert werden kann.

Mit der am Institut für Humangenetik in Bonn etablierten S-COBRA-FISH wurde eine neue Methode bereitgestellt, die eine simultane Untersuchung aller 43 relevanten Subtelomerregionen in nur zwei Hybridisierungen gewährleistet (ungeachtet eventuell notwendiger Nachhybridisierungen). Durch die große Multiplizität werden dabei sämtliche Subtelomersonden spezifisch markiert und somit neben Translokationen und Deletionen auch Inversionen sicher nachgewiesen. Wegen der geringen Anzahl notwendiger Hybridisierungen ist auch die Untersuchung von Zellmaterial mit geringem Mitoseindex oder kleinen Sedimentmengen, wie es z.B. häufig bei Blutproben von Neugeborenen der Fall ist, möglich. Damit stellt die S-COBRA-FISH eine wichtige Ergänzung des Methodenspektrums zum Nachweis subtelomerischer Chromosomenaberrationen dar und trägt allgemein zu einer Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten Locus-spezifischer Sonden bei. Dennoch ist sie

wegen des erheblichen Zeitaufwandes und der hohen Komplexität, die in der Sondenvorbereitung, vor allem aber in der Auswertung der Hybridisierungen begründet sind, im Vergleich zu den beiden anderen Techniken, dem ToTelVysion-System und der Sechs-Farben-FISH, nur bedingt für eine routinemäßige Anwendung geeignet und dient eher der Analyse von Spezialfällen. Hinzu kommt eine lange Einarbeitungszeit, die für einen routinierten und effizienten Einsatz der Methode erforderlich ist. Ein in seiner Anwendung weitaus einfacheres und zeitlich effizienteres Verfahren ist dagegen das ToTelVysion-System. Dieses kommerziell erhältliche FISH-System ermöglicht unter Voraussetzung einer ausreichenden Menge analysierbaren Zellmaterials vor allem bei Fragestellungen, die eine kurzfristige Untersuchung mit schneller Verfügbarkeit der Ergebnisse fordern, eine effiziente Subtelomeranalyse. Das fertig markierte und kombinierte Sonden-Panel ist in seiner Handhabung außerordentlich einfach und erlaubt nach Vorbereitung der Präparate eine direkte Hybridisierung, deren Ergebnisse schon am nachfolgenden Tag vorliegen können. Die geringe Komplexität, die in der niedrigen Anzahl gleichzeitig dargestellter Sonden begründet liegt, ermöglicht eine relativ einfache Auswertung, die auch für ungeübte Anwender problemlos durchführbar ist. Als Nachteil dieser Methode stellt sich die Notwendigkeit einer extrem hohen Anzahl und Dichte analysierbarer Metaphasen heraus, weswegen sie nicht universell auf jeden Patienten anwendbar ist. Einen sinnvollen Kompromiss zwischen den extrem hohen Materialanforderungen des ToTelVysion-Systems einerseits und der hohen methodischen Komplexität der S-COBRA-FISH andererseits bietet dagegen die Sechs-Farben-FISH. Die Anzahl notwendiger Hybridisierungen und der damit verbundene Verbrauch an Untersuchungsmaterial lassen sich hier deutlich reduzieren. Weiterhin bedingt die kleinere Zahl gleichzeitig dargestellter Sonden im Vergleich zur S-COBRA-FISH eine geringere Komplexität, was eine schnellere Erlernbarkeit der Methode zulässt. Die Zeitersparnis, die sich gegenüber dem ToTelVysion-System bei der Vorbereitung der Präparate und bei der Auswertung der Hybridisierungen ergibt, wird durch den Zeitaufwand bei der Markierung der Sonden annähernd ausgeglichen, so dass sich diese beiden Methoden in der Dauer der praktischen Arbeit kaum unterscheiden. Die Auswahl der günstigsten Methode zur Analyse der Subtelomerregionen ist daher in erster Linie abhängig von der jeweils vorliegenden diagnostischen Situation. Bei dringenden Fragestellungen, bei denen in möglichst kurzer Zeit ein Ergebnis erforderlich ist, ist das Vysis-System wegen seiner unmittelbaren Anwendbarkeit und den kürzeren Inkubationszeiten vorzuziehen. Reicht dagegen die Menge und Qualität des Untersuchungsmaterials nicht für eine Analyse durch das kommerzielle System aus, so bietet die Sechs-Farben-FISH deutliche methodische Vorteile und ist als Analyseverfahren zu bevorzugen. Unter idealen Voraussetzungen, ohne limitierenden Faktor in der Qualität und Quantität des Untersuchungsmaterials, können für ein Routinescreening, bei dem die Dauer jeder einzelnen Untersuchung eher eine untergeordnete Rolle spielt, beide Methoden mit etwa

gleicher Effizienz angewendet werden. Sofern die gegebenen Laborbedingungen beide Techniken gleichermaßen ermöglichen, ist wegen der höheren Aussagekraft und der guten Charakterisierung des eigenen Sondensets in einer solchen Situation die die Sechs-Farben-FISH zu wählen. Die S-COBRA-FISH dient dagegen eher der Bearbeitung von Spezialfällen.

### 5.1.2 Vergleich der angewandten FISH-Methoden mit Angaben aus der Literatur

Die für die vorliegende Arbeit ausgewählten FISH-Techniken repräsentieren mit ihren unterschiedlichen Anzahlen gleichzeitig darstellbarer Sonden das gesamte Spektrum möglicher FISH-Ansätze. Dabei war die S-COBRA-FISH ein Beispiel für die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Multi-Colour-FISH-Techniken mit hohen Multiplizitäten. In ersten publizierten Studien wurde das Multi-Colour-FISH Prinzip auf Sonden angewandt, welche die differentielle Darstellung ganzer Chromosomen (wcp-Sonden) oder spezifischer Chromosomenregionen (pcp-Sonden) ermöglichten. Durch die binäre Kombination von fünf Fluorochromen wurden auf diese Weise bei der so genannten M-FISH (Speicher et al., 1996) bis zu 27 Sonden differentiell dargestellt (Tanke et al., 1999). 24 Farben wurden auch unter Verwendung spektroskopischer Methoden durch *Spectral Karyotyping/SKY* erfolgreich visualisiert (Schröck et al., 1996). Wegen der Unterrepräsentation der subtelomerischen Regionen in den verwendeten wcp-Sonden war die Auflösung für eine sichere Analyse dieser Chromosomenbereiche jedoch zu gering (Fauth und Speicher, 2001; Lee et al., 2001). Erste Techniken, in denen das Multi-Colour-Prinzip auf Locus-spezifische Sonden insbesondere der Subtelomere übertragen wurde, waren die M-TEL-Technik und die Telomeric-Multiplex-FISH (TM-FISH) (Granzow et al., 2000; Brown et al., 2001; Henegariu et al., 2001). Basierend auf der kombinatorischen Markierungsstrategie ermöglichten diese Verfahren mit vier bis fünf Fluorochromen die simultane Darstellung der Subtelomere von acht, zwölf oder 23 Chromosomen, so dass für eine vollständige Subtelomeranalyse drei, zwei oder nur eine Hybridisierung erforderlich waren. Auf diese Weise wurde zwar teilweise eine Beschleunigung der Untersuchung durch Verringerung der Anzahl notwendiger Hybridisierungen ermöglicht, jedoch war eine Unterscheidung der Langarm- und Kurzarm-Subtelomerregionen und damit ein Nachweis perizentrischer Inversionen mit subtelomerischen Bruchpunkten bei keiner dieser Techniken gewährleistet (Fauth et al., 2001). Da dieser Typ von kryptischen Störungen jedoch sowohl als konstitutive Chromosomenaberration als auch in der Tumor-Cytogenetik mehrfach beschrieben wurde (Wlodarska et al., 1998; Baker et al., 2002; Clarkson et al., 2002; Popp et al., 2002), ist eine differentielle Darstellung der p- und q-Arme der Chromosomen für eine umfassende Analyse wünschenswert. Nur eine der bislang publizierten Multi-Colour-FISH-Techniken ermöglichte, wie die in der eigenen Arbeit etablierte S-COBRA-FISH, in zwei Hybridisierungen eine Differenzierung der Chromosomenarme und damit auch den Nachweis perizentrischer

Inversionen mit Bruchpunkten in den Subtelomerbereichen. Bei diesem von Fauth et al. (2001) entwickelten zweistufigen Analyseverfahren wurden zunächst 5-10Mb große mikrodissesezierte Sonden zur Detektion interchromosomaler Aberrationen eingesetzt. Auf der Basis des kombinatorischen Markierungsverfahrens wurden dabei mit sieben Fluorochromen alle Chromosomen spezifisch markiert, wobei beide Subtelomere eines Chromosoms jeweils in der gleichen Farbe dargestellt wurden. Die Unterscheidung von p- und q-Armen erfolgte in einer zweiten Hybridisierung unter Verwendung Subtelomer-spezifischer BAC, PAC und P1-Klone, in der alle p- und q-Subtelomere jeweils in einer Farbe markiert wurden. Damit war die Auflösungsgrenze bei Translokationen zwischen jeweils zwei p- bzw. zwei q-terminalen Regionen aufgrund ihrer identischen Markierung in der zweiten Hybridisierung durch die bis zu 10Mb großen Sonden der ersten Hybridisierung bestimmt. Kleine Aberrationen von 50, 100 oder 130kb, wie sie für subtelomerische Chromosomenstörungen beschrieben wurden (Flint et al., 1995; Wong et al., 1997), könnten, wenn sie jeweils zwei p- oder zwei q-Arme betreffen, mit dieser Methode unentdeckt bleiben (Engels et al., 2003). Die S-COBRA-FISH gewährleistet dagegen durch den ausschließlichen Einsatz von BAC- und PAC-Klonen, deren Distanz vom Telomer durchschnittlich 320kb beträgt, auch einen zuverlässigen Nachweis kleiner Aberrationen, wobei durch Verknüpfung von kombinatorischer- und *ratio*-Markierung alle Subtelomere in nur zwei Hybridisierungen differentiell markiert werden. Sie stellt damit die derzeit umfassendste Multi-Colour-FISH-Methode zur Diagnostik sämtlicher Arten balancierter und unbalancierter Störungen der Subtelomerregionen beim Menschen dar.

Die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH nimmt hinsichtlich der Anzahl gleichzeitig darstellbarer Sonden sowie ihrer Komplexität eine Zwischenposition zwischen der S-COBRA-FISH mit ihren Multiplizitäten von 20 bzw. 21 und dem ToTelVysion-System mit Multiplizitäten von maximal drei ein. Basierend auf dem kombinatorischen Markierungs-Prinzip werden mit drei Fluorochromen fünf bzw. sechs Sonden differentiell markiert, was eine vollständige Subtelomeranalyse in sieben Hybridisierungen ermöglicht. Eine mit der Sechs-Farben-FISH vergleichbare Methode, die ebenfalls eine Unterscheidung zwischen p- und q-terminalen Regionen gewährleistet, ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die Vor- und Nachteile der Technik wurden in 5.1.1. erläutert.

Stellvertretend für die beiden kommerziell erhältlichen FISH-Systeme zur Analyse der Subtelomere, das Chromoprobe Multiprobe T-System der Firma Cytocell und das ToTelVysion-System der Firma Vysis, wurde für die vorliegenden Untersuchungen das ToTelVysion-System ausgewählt. Mit zwei Fluorochromen werden hier pro Hybridisierung bis zu drei Subtelomere differentiell dargestellt, was eine komplette Analyse in 15 Hybridisierungen erlaubt. Als Nachteile dieser Technik wurden insbesondere die Notwendigkeit einer großen Menge Zellmaterial mit hoher Metaphasedichte sowie die geringe Flexibilität in der Zusammenstellung der Sonden herausgestellt, welche bei

Nachhybridisierungen (1,5 pro Patient) eine Verschwendung von Sonden und damit einen zusätzlichen Kostenaufwand zur Folge hatte (vgl. 5.1.1). In einem von Harwood et al. (2001) publizierten technischen Vergleich der beiden kommerziellen FISH-Verfahren wurde für das Cytocell-System ein gegenüber dem Vysis-System noch höherer Bedarf an Zellmaterial sowie eine noch geringere Flexibilität beschrieben. Bei dieser Technik sind die Subtelomersonden auf einen in 24 Hybridisierungsareale eingeteilten Glasträger gebunden, wobei ein Areal jeweils die p- und q-Arm-spezifischen Sonden für eines der 23 Chromosomen enthält (p- und q-Arme der Gonosomen werden durch je eine gemeinsame Sonde -XpYp und XqYq- abgedeckt). Für Nachuntersuchungen, welche laut Harwood et al. für etwa 6% der Sonden erforderlich sind, muss jeweils ein neuer Glasträger verwendet werden, was im Vergleich zum unnötigen Verbrauch einzelner Sondenkombinationen beim Vysis-System noch unrentabler erscheint. Mittlerweile werden von der Firma Cytocell zwar auch flüssige Sonden für jedes Chromosomenende angeboten, deren Erwerb ist jedoch mit zusätzlichen Kosten verbunden. Mit 24 Hybridisierungsregionen, deren Ausmaß durch das vorgegebene Areal begrenzt wird, ist die Anzahl und Dichte notwendiger Metaphasen gegenüber dem Vysis-System vergrößert, so dass neben einem erheblichen Zeitaufwand für die Vorbereitung der Präparate wegen der hohen Materialanforderungen mit einer eingeschränkten Anwendbarkeit des Cytocell-Systems zu rechnen ist. Die in der vorliegenden Arbeit durch Vergleich zwischen kommerziellen und selbst entwickelten FISH-Techniken aufgezeigten Nachteile sind demnach für beide kommerziell erhältlichen Methoden zutreffend.

## 5.2 Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dargelegt wurde, stellen die meisten Multi-Colour-FISH-Methoden geeignete Analysetechniken zur Detektion subtelomerischer Aberrationen dar. Diese Verfahren sind jedoch wegen des hohen zeitlichen und praktischen Aufwandes, welcher unter anderem in der Zellkultur und in der Herstellung von Metaphasepräparaten liegt, nur bedingt für ein Screening größerer Kollektive geeignet. Als Methoden mit Hochdurchsatzpotential gelten dagegen DNA-basierte Techniken zur direkten Bestimmung von Kopienzahlen genomischer Loci wie die *array-CGH*, die *Multiplex Ligation Dependant Probe Amplification/MLPA* und die MAPH (Armour et al., 2000; Schouten et al., 2002; Veltman et al., 2002). Allerdings lassen solche Techniken keine Aussagen über die Lokalisation detektierter Aberrationen zu, so dass sie nicht ohne Bestätigung durch FISH-Analysen eingesetzt werden können. Weiterhin ist ein Nachweis balancierter Chromosomenaberrationen nicht möglich, was ihre Aussagekraft gegenüber der FISH ebenfalls einschränkt. Bei der *array-CGH* werden Patienten- und Kontroll-DNA auf eine Matrix definierter Klone, die auf Objektträgern immobilisiert sind, vergleichend hybridisiert. Die

Eignung der *array*-CGH zur Detektion subtelomerischer Imbalancen wurde von Veltman et al. (2002) und Harada et al. (2004) demonstriert, sie wird jedoch unter anderem wegen des großen apparativen Aufwandes derzeit nur in relativ wenigen spezialisierten Zentren angewandt. Die MLPA ist generell zwar für die Detektion von Kopienzahlveränderungen subtelomerischer Loci geeignet, jedoch existieren bislang keine Daten über ihre Anwendung auf die Subtelomerregionen (Hollox et al., 2002b). Die Nutzbarkeit der MAPH zur Analyse der Subtelomere wurde in ersten Studien bewiesen (Sismani et al., 2001, Hollox et al., 2002b; Kriek et al., 2004), und auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur *high-throughput*-Untersuchung ausgewählt. Sie ermöglicht bei einem relativ geringen apparativen Aufwand je nach Kapazität des verwendeten Analysegerätes (gel- oder kapillarbasiertes Sequenziergerät) die parallele Untersuchung sämtlicher Subtelomere bei bis zu 96 Patienten gleichzeitig (Hollox et al., 2002a; Kriek et al., 2004).

Im Rahmen der eigenen Arbeit wurde die MAPH für die simultane Untersuchung von zwölf Patienten hinsichtlich subtelomerischer Aberrationen etabliert. Für die ersten MAPH-Experimente wurde ein vorläufiges Set aus 36 subtelomerisch lokalisierten Sonden eingesetzt, welches im Verlauf der Untersuchungen durch ein vervollständigtes und verbessertes Set aus 43 Sonden ersetzt wurde. Da sich einige Sonden als unzuverlässig oder nicht informativ erwiesen, konnten mit diesem Set letztlich nur 37 der 43 relevanten Chromosomenenden eines Patienten analysiert werden. Zum Verständnis nachfolgender Betrachtungen soll an dieser Stelle kurz auf die Unterschiede zwischen den jeweils verwendeten Gonosomen-spezifischen MAPH- und FISH-Sonden eingegangen werden, welche die verschiedene Anzahl der in einer MAPH- bzw. FISH-Untersuchung betrachteten Regionen erklären. Wie im Theorieteil der Arbeit beschrieben, umfasst die vollständige Analyse aller relevanten menschlichen Subtelomere 43 Regionen: die kurzen (p) und langen (q) Arme aller 23 Chromosomen abgesehen von den fünf p-Armen der akrozentrischen Chromosomen. Bei der FISH wurden wegen der Sequenzhomologien zwischen den pseudoautosomalen Regionen der Gonosomen die Regionen Xpter und Ypter bzw. Xqter und Yqter jeweils durch eine Sonde abgedeckt, so dass hier für eine vollständige Subtelomeranalyse aller 43 Regionen 41 Sonden zum Einsatz kamen. Im MAPH-Sondenset waren dagegen vier Sonden für die gonosomalen Regionen Xp, Yp, Xq und XqYq enthalten, weshalb durch diese Methode bei Vollständigkeit des verwendeten Sondensets 43 Regionen mit ebenso vielen Sonden zu analysieren sind.

Zur Beurteilung der Subtelomere wurden bei der MAPH jeweils die Ergebnisse zweier unabhängig durchgeführter Experimente miteinander kombiniert und gemeinsam interpretiert. Da bei etwa jedem fünften Patienten eines der beiden Experimente im ersten Ansatz nicht ausgewertet werden konnte und wiederholt werden musste, waren pro Patient durchschnittlich 2,2 Experimente erforderlich. Die gewählten Kriterien zur Interpretation der sechs möglichen Ergebniskombinationen, welche sich aus auffälligen, unauffälligen oder



nicht auswertbaren Resultaten ergaben und deren Richtigkeit in Verifizierungsexperimenten durch FISH oder zusätzliche MAPH-Analysen bestätigt wurde (vgl. 4.2.3.4), sind im Ergebnisteil der Arbeit (vgl. 4.2.2) erläutert. Die zweifache Untersuchung eines jeden Patienten mit anschließender Zusammenfassung der Resultate diente der Minimierung der falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse und damit unter anderem der Verringerung der Anzahl notwendiger Verifizierungsexperimente zur Überprüfung auffälliger MAPH-Ergebnisse. Eine Wiederholung von MAPH-Experimenten wurde wegen des niedrigen Aufwandes und der geringen Kosten der Methode nach Hollox et al. (2002a) und White et al. (2003) bereits als optimales Verfahren zur Reduzierung von Falsch-Positiv- und Falsch-Negativ-Raten beschrieben.

Für die Bewertung von MAPH-Ergebnissen und die eindeutige Unterscheidung zwischen normalen Kopienzahlen, deren Erwartungswert nach Normalisierung der MAPH-Daten bei 1,0 liegt, und potentiellen Kopienzahlveränderungen mit Erwartungswerten von 0,5 für Deletionen und 1,5 für Duplikationen, wurden in verschiedenen publizierten Studien unterschiedliche Verfahren angewandt. So wurden die Peakmuster von Patienten und Normalpersonen zur Detektion auffälliger Ergebnisse rein visuell verglichen (Duponchel et al., 2001) oder es wurden Schwellenwerte von 0,75 und 1,25 bestimmt, deren Unter- bzw. Überschreitung als Auffälligkeit gewertet wurde (Sismani et al., 2001). Hollox et al. (2002b) verwendeten dagegen zur Bestimmung auffälliger Resultate eine bivariate statistische Analyse nach doppelt durchgeführten MAPH-Experimenten. In einer Studie von Kriek et al. (2004) zur Bestimmung der Kopienzahlen von 162 genomischen Loci bei Patienten mit Entwicklungsverzögerung wurde die dreifache Standardabweichung (3SD) vom Median als Schwellenwert für einen eindeutigen Nachweis aberranter Regionen zugrunde gelegt. In den eigenen Untersuchungen wurden parallel sowohl die zweifache als auch die dreifache Standardabweichung (2SD und 3SD) als Schwellenwerte gewählt, um so den Einfluss verschiedener Bewertungskriterien auf die Spezifität und die Sensitivität der Methode zu ermitteln und für unterschiedliche Fragestellungen die günstigsten Kriterien festzulegen.

Durch die Analyse von sieben Fällen mit bekannten Aberrationen (Positivkontrollen), bei denen es sich um vier Deletionen, zwei unbalancierte Translokationen und eine Duplikation handelte, konnte gezeigt werden, dass die gewählten Schwellenwerte (2SD und 3SD) eine klare Unterscheidung zwischen normalen und aberranten Kopienzahlen gewährleisteten. In allen Fällen wichen die Werte aberranter Loci um mehr als drei Standardabweichungen vom Median ab, so dass dieses Kriterium für einen sicheren Nachweis der Subtelomerstörungen ausreichte. Eine der bekannten Aberrationen konnte dennoch nicht durch MAPH erfasst werden, was jedoch nicht auf eine zu geringe Strenge der gewählten Bewertungskriterien, sondern vielmehr auf eine zu proximale Lokalisation der verwendeten Sonde zurückzuführen war. Diese Beobachtung wird in einem nachfolgenden Diskussionspunkt erneut aufgegriffen.

Anhand der Untersuchung von 51 Negativkontrollen, bei denen eine Subtelomeraberration durch unabhängige FISH-Analysen ausgeschlossen worden war, wurde der Anteil falsch-positiver MAPH-Ergebnisse unter Berücksichtigung der beiden gewählten Schwellenwerte (2SD und 3SD) bestimmt. Zusammen mit dem Anteil nicht auswertbarer MAPH-Resultate wurde daraus die Zahl der pro Patient notwendigen Verifizierungsexperimente ermittelt, die ohne vorherige Subtelomerbefunde aus FISH-Untersuchungen nötig gewesen wären. Bei der zweifachen Standardabweichung ergab sich eine Falsch-Positiv-Rate von 1,01%, der Anteil nicht auswertbarer Regionen betrug 0,32%. Bei der dreifachen Standardabweichung lag dagegen sowohl die Falsch-Positiv-Rate als auch der Anteil nicht auswertbarer Regionen bei 0,05%. Diese Daten wurden unter Verwendung des noch unvollständigen Sondensets, welches zuverlässige Sonden für 37 der 43 Chromosomenenden enthielt, ermittelt. Nach Extrapolation auf ein vollständiges Set mit 43 Sonden wären nach den vorliegenden Ergebnissen unter den Bedingungen der zweifachen Standardabweichung pro Patient rechnerisch 0,57 Subtelomerregionen in Verifizierungsexperimenten zu überprüfen, was etwa einer Hybridisierung bei jedem zweiten Fall entspricht. Bei der dreifachen Standardabweichung, deren Sensitivität ebenfalls für einen eindeutigen Nachweis von Subtelomeraberrationen ausreichte, wären dagegen pro Patient rechnerisch nur 0,04 Subtelomerregionen in Zusatzanalysen zu charakterisieren, so dass lediglich bei jedem 25. Patienten eine Hybridisierung notwendig wäre. Diese Daten wurden anhand der Analyse eines „bekannten“ Kollektivs von Patienten ohne Subtelomeraberrationen erhoben.

Für ein „unbekanntes“ Kollektiv, in dem bei einem bestimmten Anteil Patienten tatsächlich mit einer Aberration der Subtelomere zu rechnen ist, berechnet sich die Anzahl notwendiger Nachuntersuchungen dagegen folgendermaßen: Neben den methodisch bedingten Zusatzanalysen (falsch-positive und nicht auswertbare MAPH-Ergebnisse) sind sämtliche tatsächlichen Aberrationen als auffällige MAPH-Ergebnisse ebenfalls in Nachhybridisierungen zu überprüfen. Die erwartete Häufigkeit von Trägern subtelomerischer Aberrationen unter Patienten mit MR unklarer Genese liegt ungefähr bei 4,6% (Xu et al., 2003). Bei der Hälfte dieser Aberrationen handelt es sich um Deletionen oder Duplikationen, bei denen jeweils nur eine Subtelomerregion betroffen ist, bei der anderen Hälfte um Translokationen mit jeweils zwei betroffenen Regionen. Demnach sind gemittelt etwa 0,07 aberrante Subtelomerregionen je Patient mit MR unklarer Genese zu erwarten, welche als „richtig-positive“ MAPH-Ergebnisse in Verifizierungsexperimenten zu bestätigen sind. Zusammen mit dem Anteil methodisch bedingter Nachhybridisierungen sind damit bei der zweifachen Standardabweichung pro Patient rechnerisch  $0,57+0,07=0,64$ , bei der dreifachen Standardabweichung  $0,04+0,07=0,11$  Subtelomerregionen je Patient in zusätzlichen Experimenten zu analysieren. Statt einer vollständigen FISH-Untersuchung mit 41 Sonden wäre somit nach MAPH-Analyse bei einem Schwellenwert von zwei Standardabweichungen deutlich weniger als eine gezielte Hybridisierung pro Patient notwendig. Bei der dreifachen

Standardabweichung wäre sogar nur bei jedem neunten Patienten eine gezielte Hybridisierung erforderlich. Damit ist gezeigt, dass die MAPH als *high-throughput*-Methode zur Voruntersuchung der Subtelomere den Aufwand der FISH-Analysen, welche nur noch für Regionen mit auffälligen MAPH-Befunden durchzuführen sind, um mehr als 98% bei der zweifachen und sogar um mehr als 99% bei der dreifachen Standardabweichung verringern kann. Da eine vollständige MAPH-Untersuchung pro Patient etwa 4,5h dauert, während bei einer FISH-Untersuchung allein die Auswertung mindestens 6h beansprucht, kann durch kombinierte Anwendung der beiden Methoden ein deutlicher Zeitgewinn erzielt werden. Zusammen mit der hohen Zahl gleichzeitig analysierbarer Patienten kann so die Untersuchungseffizienz in großen Kollektiven deutlich verbessert werden.

Um zu prüfen, ob im retrospektiv untersuchten Kollektiv das Vorwissen über die jeweiligen Subtelomerbefunde die Bewertung der MAPH-Resultate beeinflusst hatte, wurden zusätzlich zehn Patienten mit MR prospektiv durch MAPH analysiert. Da die Raten potentiell aberranter Subtelomerregionen und damit die Anzahl notwendiger Verifizierungsexperimente in diesem Kollektiv niedriger lagen als bei den retrospektiv analysierten Fällen, war eine solche subjektive Komponente bei der Auswertung auszuschließen.

Mit dem ersten veröffentlichten MAPH-Sondenset für sämtliche Subtelomere wurde in einer Studie von Hollox et al. (2002b) eine im Vergleich zur eigenen Falsch-Positiv-Rate von 1,01% (2SD) bzw. 0,05% (3SD) deutlich höhere Rate von 4% erzielt. Die Autoren betonen die hohe Effizienz der Methode, wobei sich die Anzahl notwendiger FISH-Untersuchungen nach ihren Ergebnissen nur um 96% verringern würde. Gleichzeitig geben sie für die Falsch-Negativ-Rate einen Wert von 2% an. Ausgehend von einer Mutationsrate der Subtelomere bei Patienten mit MR von etwa 6% ergibt sich daraus laut der Autoren für circa 0,012% der MR-Patienten fälschlicherweise ein unauffälliges MAPH-Ergebnis. Die Bewertung solcher falsch-negativer Resultate ist unter anderem abhängig von der Zielsetzung der durchgeführten Untersuchung (Kriek et al., 2004). Bei einer diagnostischen Fragestellung ist eine extrem geringe Rate falsch-negativer MAPH-Ergebnisse von zentralem Interesse, während diese in einer Screening-Situation eine untergeordnetere Bedeutung besitzt. In den eigenen Untersuchungen wurde bei beiden Standardabweichungen eine Falsch-Negativ-Rate von 0% bestimmt, was die hohe Sensitivität der Analysen verdeutlicht. Die bei einer diagnostischen Zielsetzung notwendige Sicherheit wird jedoch eher durch die Auswahl des Kriteriums der zweifachen Standardabweichung gewährleistet. Allerdings ist unter diesen Bedingungen der Anteil potentieller Aberrationen höher, so dass zur Unterscheidung wirklicher Aberrationen von falsch-positiven MAPH-Ergebnissen mehr aufwendige Verifizierungsexperimente erforderlich sind. Die dreifache Standardabweichung ist durch ihre niedrigere Falsch-Positiv-Rate eher für ein Hochdurchsatz-Screening, in dem möglichst schnell viele Aberrationen detektiert werden sollen, einzusetzen, wobei gleichzeitig aber eine potentiell höhere Falsch-Negativ-Rate akzeptiert werden muss.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die hohe Effizienz der MAPH zur *high-throughput*-Voranalyse der Subtelomerregionen aufgezeigt. Damit steht eine einfache und kostengünstige Methode zur zuverlässigen Detektion von Kopienzahlveränderungen der Subtelomerregionen bei zwölf Patienten gleichzeitig zur Verfügung, welche unter Verwendung eines kapillarbasierten Elektrophoresesystems sogar auf eine parallele Untersuchung von 96 Patienten erhöht werden kann. Da für die MAPH eine Geräte- und Software-Ausstattung verwendet wird, welche auch für normale Sequenzierungen und Fragmentanalysen zum Einsatz kommt, kann sie im Gegensatz zu vielen anderen Techniken problemlos in vielen diagnostischen Standardlabors implementiert werden. Neben einer Beschleunigung und Vereinfachung der Untersuchungen bietet die MAPH weitere Vorteile gegenüber der FISH. Durch die geringe Größe der MAPH-Sonden, welche in der Regel zwischen 100 und 600bp liegt, können durch diese Methode deutlich kleinere Aberrationen detektiert werden als durch die FISH, bei der in der Regel Cosmid-, BAC- oder PAC-Sonden mit einer zur Signalerkennung notwendigen Größe von mindestens 35 bis circa 200kb zum Einsatz kommen. Des Weiteren ermöglicht die MAPH auch den Nachweis von Duplikationen, die durch FISH nur dann detektierbar sind, wenn sie zu einer Vergrößerung oder zu einer Aufspaltung von Hybridisierungssignalen führt. Beispiele für krankheitsverursachende Duplikationen, welche durch FISH nur bedingt oder gar nicht nachgewiesen werden können, sind die für Charcot-Marie-Tooth Typ1A verantwortliche Duplikation des PMP22-Gens oder die deutlich kleineren Duplikationen einzelner Exons im DMD-Gen bei der Muskeldystrophie Duchenne/Becker oder im BRCA1-Gen bei Brustkrebs (Hollox et al., 2002a; White et al., 2002; Akrami et al., 2003). Es ist möglich, dass mit vermehrter Anwendung der MAPH weitere krankheitsverursachende Duplikationen auch in den subtelomerischen Chromosomenregionen gefunden werden, welche bislang wegen des in dieser Hinsicht geringeren Auflösungsvermögens der FISH unentdeckt blieben.

Die MAPH wies jedoch neben den oben genannten Vorteilen bei dem derzeitigen methodischen Entwicklungsstatus einige Nachteile bezüglich des Sondensets auf. Zum einen konnten mit diesem Set nur 37 der 43 Chromosomenenden zuverlässig analysiert werden. Zum anderen waren die verwendeten MAPH-Sonden mit durchschnittlich 1,6Mb deutlich weiter von den jeweiligen Chromosomenenden entfernt als die verwendeten FISH-Sonden, deren mittleren Distanzen bei 320kb (eigenes Set) bzw. 263kb (ToTelVysion Probe Panel) lagen. 20 der 37 zuverlässigen MAPH-Sonden waren mehr als 1Mb, fünf davon sogar mehr als 3Mb vom zugehörigen Telomer entfernt lokalisiert. Damit war die Sensitivität der MAPH-Sonden zur Detektion subtelomerischer Aberrationen im Vergleich zu den FISH-Sonden deutlich niedriger. Bei der Zusammenstellung des MAPH-Sondensets, welche am LUMC in Leiden durchgeführt wurde, wurde teilweise eine funktionelle Vorauswahl der Sonden getroffen. Es wurden beispielsweise Sequenzen ausgewählt, die im Exonbereich

zentralnervös exprimierter Gene lokalisiert und möglichst nur eine Megabase vom Telomer entfernt liegen sollten (persönliche Mitteilung, Kriek). Ziel der Leidener Arbeitsgruppe war es, bei der Detektion subtelomerischer Aberrationen eventuell direkt Hinweise auf Gene zu erlangen, deren Mutation mit einer mentalen Retardierung in Zusammenhang steht. Zentrales Interesse der eigenen Untersuchungen war dagegen eine möglichst sensitive Analyse der subtelomerischen Chromosomenregionen, deren Voraussetzung in einer telomernahen Lokalisation der Sonden liegt. Die Sensitivität des zur Verfügung stehenden SONDENSETS war jedoch für diese Zielsetzung nur bedingt ausreichend. Dies wurde unter anderem durch den fehlenden Nachweis der partiellen Duplikation 7q, welche auf eine zu proximale Lage der zugehörigen Sonde zurückzuführen war, deutlich (Telomerdistanz 2,6Mb) (vgl. 4.2.4.1). Um für eine zukünftige routinemäßige Anwendung der MAPH zur Voranalyse der Subtelomere die gleiche Sensitivität zu erreichen, wie sie durch die FISH-Analysen gewährleistet wird, ist eine Optimierung durch Verwendung distaler gelegener Sonden und eine Vervollständigung des SONDENSETS unumgänglich.

Eine Möglichkeit, die Sensitivität der MAPH zur Detektion von Kopienzahlveränderungen in den Subtelomerregionen noch weiter zu erhöhen und gleichzeitig nach MR-assoziierten Genen zu suchen, wäre der parallele Einsatz mehrerer Locus-spezifischer Sonden für jedes Chromosomenende. Hier könnten beispielsweise Sonden aus den Exonbereichen denkbarer Kandidatengene mit möglichst telomernahen Sonden kombiniert werden, wodurch das Auflösungsvermögen der MAPH, welches dann durch die Distanz der verwendeten Sonden bestimmt wird, erhöht würde. Gleichzeitig wäre eine Abschätzung der Größe und der Position detektierter Aberrationen möglich (Hollox et al., 2002a). Im Rahmen des Humangenomprojektes werden die teilweise noch fehlenden oder lückenhaften Sequenzdaten der Telomerregionen zunehmend besser aufgeklärt, was die Herstellung weiterer telomernaher single copy-Sonden und damit eine engmaschige Abdeckung der Subtelomerregionen erreichbar macht (Hollox et al., 2002b; Riethman et al., 2004). In einer Studie von Kriek et al. (2004) wurde der hohe diagnostische Nutzen eines parallelen Einsatzes mehrerer verschiedener SONDENSETS bei der Suche nach Regionen beschrieben, deren Veränderungen unter anderem eine MR zur Folge haben. Neben einem Set Subtelomer-spezifischer Sonden (n=43) verwendeten sie Sonden aus interstitiellen Regionen, von denen einige z.B. mit bekannten Mikrodeletions-Syndromen wie dem Williams-, Prader-Willi- oder Wolf-Hirschhorn-Syndrom assoziiert waren (n=27), während andere für 19 Gene des Chromosoms 22 spezifisch waren. Darüber hinaus wurden zwei Sets von Sonden eingesetzt (n=68), welche über das ganze Genom verteilt lokalisiert waren und deren genomischen Zielregionen mit der geistigen Entwicklung in Zusammenhang gebracht werden. Unter 188 Patienten mit ungeklärter Entwicklungsverzögerung fanden sie acht cytogenetisch nicht sichtbare subtelomerische Aberrationen und sieben interstitielle

Mutationen, von denen fünf in den für Mikrodeletionen bekannten und zwei in den potentiell mit einer MR assoziierten Regionen lagen. Neben dem parallelen Einsatz verschiedener Sondensets, wie es in der beschriebenen Studie durchgeführt wurde, kann jedoch auch die Anzahl gleichzeitig in einem MAPH-Ansatz analysierter Regionen und damit die Untersuchungseffizienz der Methode auf verschiedene Weise weiter erhöht werden. In der eigenen Arbeit wie auch in den bislang publizierten Studien wurden jeweils nur zwei der vier verfügbaren Farbkanäle eines Standard-Sequenziergerätes (gel- oder kapillarbasiert) genutzt. Unter Verwendung von bis zu drei Primerpaaren, welche jeweils mit verschiedenen Fluorochromen markiert sind, könnte die Zahl gleichzeitig in einem MAPH-Ansatz analysierter Sonden verdreifacht werden (White et al., 2002). Einen weiteren Ansatz zur Erhöhung der Untersuchungseffizienz bietet ein Mikroarray-basiertes MAPH-Prinzip, das beispielsweise von der Arbeitsgruppe um Hollox in Zusammenarbeit mit der Firma Pamgene BV, Niederlande, entwickelt wird (Hollox et al., 2002a). Nach Hybridisierung und PCR-Amplifikation werden die Sonden nicht durch Gelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese separiert und quantifiziert, sondern auf eine Matrix von MAPH-Sonden rehybridisiert. Ein Überschuss der an die Matrix gekoppelten Sonden gewährleistet dabei eine vollständige Bindung aller vorhandenen PCR-Produkte, so dass diese im Anschluss quantitativ analysiert werden können. Da die Detektion und Quantifizierung der Sonden nicht anhand ihrer Größe, sondern ausschließlich anhand ihrer Sequenz erfolgt, ist die Anzahl gleichzeitig analysierbarer Regionen nur durch die Anzahl der Matrix-gekoppelten Sonden begrenzt. Eine obere Grenze der Sondenzahl ergibt sich jedoch wahrscheinlich durch mögliche Interaktionen zwischen den Sonden sowie durch reaktionskinetische Veränderungen bei der Hybridisierung. Eine Verbesserung der gel- oder kapillarbasierten MAPH-Verfahren zur Detektion von Duplikationen und Deletionen im DMD-Gen zur Bestimmung des Carrier-Status potentieller Träger wurde kürzlich von White et al. (2003) publiziert. Auf der Grundlage eines Chip-basierten Gelelektrophorese-Systems („Lab-on-a-chip“; Agilent, CA) können mit diesem Verfahren zwölf unmarkierte DNA-Proben in kurzer Zeit (30min) analysiert werden, wobei die quantitativen Daten automatisch generiert werden.

Die optimalen methodischen Eigenschaften der MAPH zur zuverlässigen und schnellen Bestimmung von Kopienzahlen genomischer Loci führten zu einer Ausweitung ihres Anwendungsspektrums. Neben Sondensets zur Analyse der Subtelomere wurden Sondensets zur Detektion von Duplikationen und Deletionen im BRCA-1-Gen bei familiärem Brustkrebs, im Dystrophin-Gen bei der Muskeldystrophie Duchenne/Becker, im TBX5-Gen beim Holt-Oram-Syndrom und im MLH1/MLH2-Gen beim hereditären Kolonkarzinom ohne Polyposis (HNPCC) entwickelt und erfolgreich angewandt (Akrami et al., 2001; Hollox et al., 2002a; White et al., 2002). Erst kürzlich wurde der Einsatz der MAPH zum Nachweis von Deletionen und Duplikationen im PMP22-Gen publiziert, dessen Deletion das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom zur Folge hat, während die entsprechende Duplikation zur tumakolösen

Neuropathie (HNPP) führt (Akrami et al., 2003). Es ist davon auszugehen, dass zukünftig weitere Sondensets zur Klärung verschiedenster Fragestellungen aus der klinischen Genetik und auch aus der Tumorgenetik entwickelt werden und sich somit das Anwendungsspektrum der MAPH erweitern wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die gute Anwendbarkeit der FISH zur Diagnostik subtelomerischer Chromosomenaberrationen dargestellt. Der umfassende methodische Vergleich des kommerziell erhältlichen ToTelVysion-Systems mit den selbst entwickelten Techniken, der Subtelomer-Sechs-Farben-FISH und der S-COBRA-FISH, zeigte für jede Methode charakteristische Vor- und Nachteile auf, die eine auf verschiedene diagnostische Situationen abgestimmte, spezifische Anwendung sinnvoll erscheinen lassen. Während das ToTelVysion-System eine schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse gewährleistete und damit optimal zur Klärung dringender Fragestellungen geeignet war, lagen die Vorteile der Sechs-Farben-FISH in einer geringeren Menge des zur Analyse erforderlichen Untersuchungsmaterials, was sie teilweise zur einzig anwendbaren Methode werden ließ. Die S-COBRA-FISH ist wegen ihrer hohen Komplexität eher für die Bearbeitung von Spezialfällen geeignet.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde deutlich, dass die FISH aufgrund ihres hohen zeitlichen und methodischen Aufwandes nur bedingt für ein Screening großer Kollektive geeignet ist. Durch die Kombination mit der MAPH als Methode zur *high-throughput*-Voranalyse der Subtelomere kann jedoch die Untersuchungseffizienz in solchen Kollektiven deutlich gesteigert werden. Je nach Zielsetzung der Untersuchung wurden MAPH-Auswertungskriterien festgelegt, die einen optimalen Kompromiss zwischen der Spezifität und der Sensitivität gewährleisteten. Es wurde belegt, dass eine Voranalyse der Subtelomere durch MAPH den Aufwand der FISH-Untersuchungen, die sich dann nur noch auf Regionen mit auffälligen MAPH-Befunden beschränken, je nach gewählten Auswertungskriterien um mindestens 98% verringern kann. Damit bietet die MAPH einen deutlichen methodischen Fortschritt zur Diagnostik kryptischer subtelomerischer Chromosomenaberrationen bei Patienten mit MR.

Die systematische Untersuchung der Subtelomere bei Betroffenen mit MR stellte wegen der großen Gendichte und der hohen Mutationsrate dieser Regionen einen sinnvollen Anfang für die Suche klinisch relevanter, kryptischer Aberrationen dar. Da die 43 euchromatischen Subtelomere jedoch nur etwa 4-14% des menschlichen Genoms mit seinen 3000Mb repräsentieren, ist zu erwarten, dass durch eine Beschränkung auf die Subtelomere ein großer Teil kryptischer Störungen unerkannt bleiben wird. Die hohe klinische Relevanz interstitieller Aberrationen wird zunehmend deutlicher. Neben bereits bekannten interstitiellen submikroskopischen Störungen als Ursache für verschiedene Mikrodeletions-Syndrome (z.B.

DiGeorge-Syndrom, Williams-Beuren-Syndrom) werden immer mehr krankheitsverursachende Mikrodeletionen und -duplikationen entdeckt, wie beispielsweise die das NSD-1-Gen umfassende Deletion in 5q35 als Ursache für das Sotos-Syndrom (Kurotaki et al., 2002). Damit erscheint eine genomweite Untersuchung von Betroffenen mit MR und weiteren Auffälligkeiten auf Mikrodeletionen- und Duplikationen äußerst sinnvoll. Die derzeit effizienteste Methode für solche umfassenden Untersuchungen ist die 1997 von Solinas-Toldo et al. entwickelte *array*- oder Matrix-CGH, auf deren Grundlage der erste genomweite Mikroarray entwickelt wurde (Snijders et al., 2001). Mit etwa 2400 genomischen Klonen, welche in *array*-Form auf einer Oberfläche immobilisiert vorliegen, wurde nach vergleichender Hybridisierung von Patienten- und Kontroll-DNA eine Auflösung von durchschnittlich 1,4Mb erzielt. DNA-Arrays mit noch höherer Auflösung werden derzeit an verschiedenen Zentren entwickelt, zu ihrer Anwendung liegen bislang jedoch keine Publikationen vor. Ein Beispiel ist der am Sanger Centre, Cambridge, England, zusammengestellte DNA-Array mit circa 3000 gleichmäßig über das Genom verteilten Klonen, mit dem schon jetzt eine Auflösung von ungefähr einer Megabase erzielt werden kann. Für das Chromosom 22 existiert mittlerweile ein DNA-Array, der eine Analyse des vollständigen Chromosoms mit einer Auflösung von durchschnittlich 75kb ermöglicht (Buckley et al., 2002). Eine ähnlich hochauflösende Untersuchung des gesamten menschlichen Genoms soll zukünftig mit dem kürzlich entwickelten Klonset aus circa 32.000 BAC-Klonen (Krzywinski et al., unpublizierte Daten; <http://www.bcgsc.ca/lab/mapping/baccrearray/human/>) erzielt werden: „that provide a contiguous coverage of the human genome“ (Albertson et al., 2003; Mantripragada et al., 2004). Mikroarrays mit einer so hohen Klondichte würden eine genomweite Analyse mit einer durchschnittlichen Auflösung von 50-100kb erlauben und damit die klinisch-cytogenetische und Tumor-cytogenetische Diagnostik signifikant bereichern.



## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und vergleichende Anwendung effizienter molekular-cytogenetischer und molekulargenetischer Techniken zur Erfassung kryptischer Aberrationen in den Subtelomerregionen menschlicher Chromosomen. Mit einer Häufigkeit von durchschnittlich 4,6% wurde dieser Aberrationstyp in den vergangenen Jahren als eine bedeutende genetische Ursache bei idiopathischer mentaler Retardierung (MR), die 1-2% der Bevölkerung betrifft, identifiziert. Die hohe Prävalenz dieser Störungen sowie die große Zahl von 43 relevanten Subtelomeren, die zur vollständigen Analyse zu untersuchen sind, erfordern den Einsatz hocheffizienter Techniken. Die molekular-cytogenetische Methode der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) stellt derzeit wegen ihrer weiten Verbreitung und guten Validierung den Goldstandard bei der Untersuchung der Subtelomerregionen dar.

Die Arbeit gliederte sich in zwei Teile. Im ersten Teil galt es zu prüfen, ob die Effizienz der FISH-Untersuchungen durch Erhöhung der Anzahl gleichzeitig dargestellter Sonden gesteigert werden konnte. Dazu wurden zwei selbst entwickelte Multi-Colour-FISH-Techniken, die Subtelomer-COBRA-FISH (COBRA=*Combined Binary Ratio Labelling*) und die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH, sowohl untereinander als auch mit dem kommerziell erhältlichen ToTelVysion-System der Firma Vysis verglichen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Anwendbarkeit der molekulargenetischen Subtelomer-MAPH (MAPH=*Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation*) als Hochdurchsatzverfahren zur Voruntersuchung der Subtelomerregionen getestet, um so die aufwendigeren FISH-Analysen teilweise zu ersetzen.

Der **methodische Vergleich der drei FISH-Techniken** erfolgte anhand eines gut charakterisierten Kollektivs von 66 Patienten mit MR. Als Vergleichskriterien wurden die Nachweisgenauigkeit der jeweils verwendeten SONDENSETS, die Anwendbarkeit sowie die Effizienz, welche durch den zeitlichen und praktischen Arbeitsaufwand definiert war, herangezogen.

Beim ToTelVysion-System kamen Subtelomersonden zum Einsatz, die mit einer nach Herstellerangaben maximalen Telomerdistanz von 300kb eine gute Sensitivität zur Detektion subtelomerischer Chromosomenaberrationen aufwiesen. Ihre Aussagekraft war jedoch eingeschränkt, da etwa 25% dieser Sonden nicht in den Bezugsdatenbanken aufgeführt waren und damit nicht exakt lokalisiert werden konnten. Bei diesem System wurden durch Kombination zweier Fluorochrome je Hybridisierung bis zu drei Chromosomenenden differentiell dargestellt. Zur Analyse aller 43 Subtelomere waren somit 15 Hybridisierungen notwendig. Neben einem hohen Zeitaufwand zur Herstellung der 15 Hybridisierungsregionen erforderte diese Technik mit 75 Metaphasen je Patient eine große Zahl analysierbarer Zellen. Bei 14% der Fälle konnte sie nicht angewandt werden, da das zur Verfügung stehende

Untersuchungsmaterial den hohen quantitativen und qualitativen Anforderungen nicht genügte. Als Vorteil erwiesen sich die einfache Handhabung des gebrauchsfertig vorliegenden Sondensets sowie die kurze Hybridisierungszeit von 16h. Die Auswertung war wegen der geringen Anzahl gleichzeitig zu unterscheidender Sonden nur wenig komplex. Probleme ergaben sich durch eine geringe Signalstärke einzelner Sonden, die teilweise erst durch Nachuntersuchungen abschließend beurteilt werden konnten.

Für die Subtelomer-Sechs-Farben-FISH wurde ein eigenes Set gut charakterisierter und sensitiver FISH-Sonden benutzt (mittlere Telomerdistanz 320kb), welches sich überwiegend aus Sonden des „optimized set of human telomere clones“ nach Knight et al. (2000) zusammensetzte. Unter Verwendung dreier Fluorochrome, die sowohl in reiner Form als auch kombiniert zur Sondenmarkierung eingesetzt wurden, konnten je Hybridisierung bis zu sechs Subtelomere differentiell visualisiert werden. Die Zahl der Hybridisierungen wurde durch dieses kombinatorische Multi-Colour-FISH-Prinzip auf sieben herabgesetzt und der Verbrauch an Untersuchungsmaterial deutlich reduziert. Somit war diese Methode bei annähernd jedem Patienten problemlos anwendbar. Die geringe Anzahl der Hybridisierungsregionen bedingte im Vergleich zum Vysis-System bei der Präparatherstellung eine Zeitersparnis, die aber durch den Aufwand der erforderlichen Sondenmarkierung ausgeglichen wurde. Zusätzlich erhöhte sich bei der Sechs-Farben-FISH die Hybridisierungszeit auf 48h. Pro Patient waren insgesamt 36 Metaphasen auszuwerten, wobei aufgrund einer zum Teil geringeren visuellen Unterscheidbarkeit der sechs gleichzeitig dargestellten Sonden häufiger Nachhybridisierungen erforderlich waren.

Für die Subtelomer-COBRA-FISH wurde ebenfalls das eigene Sondenset verwendet. Zur Markierung der Sonden wurden hier allerdings drei Fluorochrome sowohl in reiner Form als auch in festgelegten Mischungsverhältnissen (*ratio*-Markierung) eingesetzt und so bis zu elf verschiedene Farben generiert. Um die Anzahl gleichzeitig darstellbarer Sonden weiter zu erhöhen, wurde dieses primäre Set aus *ratio*-Farben mit und ohne Beimischung eines vierten, binären Fluorochroms verwendet, so dass bis zu 21 eindeutig voneinander zu unterscheidende Farben erzeugt werden konnten. Die S-COBRA-FISH gewährleistete damit eine vollständige Subtelomeruntersuchung in nur zwei Hybridisierungen und war wegen des extrem geringen Verbrauchs an Untersuchungsmaterial ebenfalls bei nahezu jedem Patienten anwendbar. Während die Herstellung von nur zwei Hybridisierungsregionen vergleichsweise schnell durchzuführen war, erwies sich die Markierung durch die große Zahl gleichzeitig in einem Ansatz verwendeter Sonden als komplex und zeitaufwendig. Die Dauer der Hybridisierung lag wie bei der Sechs-Farben-FISH bei 48h. Die Anzahl auszuwertender Metaphasen fiel mit insgesamt 18 gering aus, jedoch beanspruchte auch die visuelle Auswertung aufgrund der hohen Komplexität bei der Unterscheidung von bis zu 21 Sonden im Vergleich zu den beiden anderen Methoden deutlich mehr Zeit. Zudem musste sie zur eindeutigen Identifizierung der Sonden häufig durch ein zusätzliches Auswertungsverfahren

(Messung von Fluoreszenzintensitäten) ergänzt werden. Die Zahl notwendiger Nachhybridisierungen konnte durch diese zusätzliche Analyse verringert werden und entsprach derjenigen des Vysis-Systems.

Mit allen drei Multi-Colour-FISH-Techniken konnten sämtliche nachweisbaren Aberrationstypen (Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen) der subtelomerischen Regionen zuverlässig detektiert werden. Der umfassende methodische Vergleich zeigte, dass durch eine Erhöhung der Anzahl gleichzeitig dargestellter Sonden die Untersuchungseffizienz nicht gesteigert werden konnte. Die S-COBRA-FISH zeichnete sich mit der simultanen Visualisierung von 20 bzw. 21 Sonden als die bisher umfassendste Multi-Colour-FISH-Methode zur Untersuchung aller 43 relevanten Subtelomere in nur zwei Hybridisierungen aus. Sie gewährleistete zudem die Detektion perizentrischer Inversionen mit subtelomerischen Bruchpunkten, was bislang nur für eine veröffentlichte Methode mit ähnlich hoher Multiplizität aber geringerer Auflösung beschrieben wurde. Allerdings bedingte die erhöhte Komplexität der S-COBRA-FISH einen großen zeitlichen und praktischen Aufwand, so dass sie für Routineanwendungen weniger geeignet war. Für solche Anwendungen eigneten sich hingegen die beiden anderen FISH-Techniken, wobei ein auf verschiedene diagnostische Situationen abgestimmter, spezifischer Einsatz sinnvoll erschien. Das ToTelVysion-System gewährleistete eine schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse und war damit vor allem zur Klärung dringender diagnostischer Fragestellungen optimal einsetzbar. Die Sechs-Farben-FISH ermöglichte wegen ihres geringen Verbrauchs an Zellmaterial auch die Untersuchung von Proben mit niedriger Metaphasezahl oder kleinen Sedimentmengen, was sie teilweise zur einzig praktikablen Methode werden ließ. War die Voraussetzung für den Einsatz beider Techniken gegeben, wurde die Sechs-Farben-FISH wegen der guten Charakterisierung und höheren Aussagekraft des hier verwendeten eigenen SONDENSETS als Analyseverfahren bevorzugt.

Es wurde deutlich, dass die FISH wegen ihres im Vergleich zu molekulargenetischen Techniken hohen zeitlichen und methodischen Aufwandes nur bedingt für ein Screening großer Kollektive geeignet ist. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die **Subtelomer-MAPH** als Hochdurchsatzverfahren zur direkten Bestimmung von Kopienzahlen subtelomerischer Loci angewandt. Sie ermöglicht im Gegensatz zur FISH zwar keine exakte Bestimmung der chromosomalen Lokalisation der untersuchten Regionen, kann jedoch als Methode zur Voranalyse der Subtelomere einen Teil der FISH ersetzen, die dann nur noch zur Verifizierung einzelner auffälliger MAPH-Befunde durchzuführen wäre. Die Etablierung der Methode erfolgte an einem Kollektiv von 66 Patienten mit MR (59 Negativ- und sieben Positivkontrollen), für die bereits Subtelomerbefunde aus FISH-Analysen vorlagen, sowie an zehn weiteren, noch nicht durch FISH untersuchten Patienten.

Für die ersten MAPH-Experimente wurde ein Set aus 36 subtelomerisch lokalisierten Sonden eingesetzt, welches später durch ein verbessertes Set aus 43 Sonden ersetzt

wurde. Da sich einige Sonden als nicht informativ erwiesen, konnten mit diesem letztlich 37 der 43 relevanten Chromosomenenden eines Patienten analysiert werden. Die verwendeten MAPH-Sonden zeigten mit durchschnittlich 1,6Mb eine im Vergleich zu den FISH-Sonden deutlich größere Distanz vom Telomer und damit eine niedrigere Sensitivität zum Nachweis von Subtelomeraberrationen auf. Um für eine routinemäßige Anwendung der MAPH die gleiche Sensitivität wie bei der FISH zu erreichen, ist neben einer Vervollständigung des Sondensets eine Optimierung durch Einsatz distaler lokalisierter Sonden notwendig.

Zur Analyse der Subtelomere wurden jeweils die Ergebnisse zweier unabhängig durchgeführter MAPH-Experimente kombiniert, wobei je Experiment zwölf Patienten gleichzeitig untersucht wurden. Bei 10% der Fälle war eine Untersuchung durch MAPH nicht möglich. Für die Bewertung der MAPH-Ergebnisse wurden parallel zwei unterschiedlich strenge Kriterien, die zweifache und die dreifache Standardabweichung (2SD und 3SD) vom Median als Schwellenwerte für eine eindeutige Unterscheidung zwischen normalen und potentiell aberranten Kopienzahlen zugrunde gelegt. Durch Analyse von Positivkontrollen mit bekannten Aberrationen konnte gezeigt werden, dass beide Schwellenwerte einen sicheren Nachweis von Subtelomeraberrationen gewährleisten.

Anhand der Untersuchung von Negativkontrollen wurde der Anteil falsch-positiver MAPH-Ergebnisse unter beiden Schwellenwerten bestimmt. Zusammen mit dem Anteil nicht auswertbarer MAPH-Resultate wurde daraus die Anzahl der je Patient erforderlichen Verifizierungsexperimente ermittelt, die ohne vorherige Befunde aus FISH-Untersuchungen notwendig gewesen wären. Bei 2SD ergab sich eine Falsch-Positiv-Rate von 1,01%, der Anteil nicht auswertbarer Regionen betrug 0,32%, bei 3SD lagen diese Werte jeweils bei 0,05%. Werden diese Daten auf ein vollständiges Sondenset mit 43 anstelle von derzeit 37 zuverlässigen Sonden extrapoliert, so wären bei 2SD je Patient rechnerisch 0,57 und bei 3SD 0,04 Subtelomerregionen in Verifizierungsexperimenten zu überprüfen. Dies entspräche einer gezielten Hybridisierung bei jedem zweiten bzw. bei jedem 25. Patienten. Es wurde deutlich, dass die MAPH als Hochdurchsatzverfahren zur Voruntersuchung der Subtelomere den Aufwand der FISH-Analysen, die sich dann nur noch auf Regionen mit auffälligen MAPH-Befunden beschränken würden, um mehr als 98% bei 2SD und sogar um mehr als 99% bei 3SD verringern könnte. Da der zeitliche Aufwand einer kompletten MAPH-Analyse mit 4,5h deutlich niedriger ausfällt als bei der FISH, bei der allein die Auswertung mindestens 6h beansprucht, kann durch kombinierte Anwendung der beiden Methoden ein deutlicher Zeitgewinn erzielt und so die Untersuchungseffizienz in großen Kollektiven erheblich verbessert werden.

Die beiden parallel verwendeten Schwellenwerte zeigten eine gleich hohe Sensitivität beim Nachweis von Subtelomeraberrationen. Dennoch sollte bei einer diagnostischen Zielsetzung, bei der eine extrem geringe Falsch-Negativ-Rate gefordert ist, das vorsichtigeres Kriterium

der 2SD verwendet werden, während sich für ein Hochdurchsatzscreening eher die 3SD eignet.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass das Multi-Colour-FISH-Prinzip optimal auf Locus-spezifische Sonden der Subtelomere anwendbar ist und die Detektion balancierter und unbalancierter kryptischer Subtelomeraberrationen, die durch konventionell-cytogenetische Verfahren nicht nachweisbar sind, gewährleistet. Für unterschiedliche diagnostische Situationen wurde in Abhängigkeit von der Menge und Qualität des vorhandenen Untersuchungsmaterials von den drei verglichenen FISH-Techniken jeweils die am besten geeignete Methode herausgestellt. Es wurde deutlich, dass eine Erhöhung der Anzahl gleichzeitig darstellbarer Sonden bei der FISH nicht zu einer Steigerung der Untersuchungseffizienz führte.

Darüber hinaus wurde belegt, dass die MAPH zur Hochdurchsatz-Voruntersuchung der Subtelomere in Kombination mit der gut validierten FISH die Untersuchungseffizienz in großen Kollektiven deutlich verbessern kann. Dies stellt einen wichtigen methodischen Fortschritt in der Diagnostik kryptischer Aberrationen der Subtelomere dar.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akrami SM, Rowland JS, Taylor GR, Armour JA (2003) Diagnosis of gene dosage alterations at the PMP22 gene using MAPH. *J Med Genet* 40: e123
- Akrami SM, Winter RM, Brook JD, Armour JA (2001) Detection of a large TBX5 deletion in a family with Holt-Oram syndrome. *J Med Genet* 38: E44
- Albertson DG, Pinkel D (2003) Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R145-52
- Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M (2002) Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 107: 275-284
- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28: 605-609
- Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE (2001) Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 11: 1005-1017
- Baker E, Hinton L, Callen DF, Altree 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: 285-293
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000) The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 67: 1356-1359
- Barlow AL, Hulten MA (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4: 562-573
- Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P (1980) A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* 128: 485-490
- Bezrookove V, Hansson K, van der Burg M, van der Smagt JJ, Hilhorst-Hofstee Y, Wiegant J, Beverstock GC, Raap AK, Tanke H, Breuning MH, Rosenberg C (2000) Individuals with abnormal phenotype and normal G-banding karyotype: improvement and limitations in the diagnosis by the use of 24-colour FISH. *Hum Genet* 106: 392-398
- Biesecker LG, Rosenberg M, Dziadzio L, Ledbetter DH, Ning Y, Sarneso C, Rosenbaum K (1995) Detection of a subtle rearrangement of chromosome 22 using molecular techniques. *Am J Med Genet* 58: 389-394
- Birch HG, Richardson SA, Baird D, Horobin D, Iisley R (1970) Mental subnormality in the community: a clinical and epidemiological study. Williams and Wilkins, Baltimore
- Brown J, Jawad M, Twigg SR, Saracoglu K, Sauerbrey A, Thomas AE, Eils R, Harbott J, Kearney L (2002) A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia with apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescence in situ hybridization telomere assay. *Blood* 99: 2526-2531

- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L (2001) Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med* 7: 497-501
- Buckley PG, Mantripragada KK, Benetkiewicz M, Tapia-Paez I, Diaz De Stahl T, Rosenquist M, Ali H, Jarbo C, De Bustos C, Hirvela C, Sinder Wilen B, Fransson I, Thyr C, Johnsson BI, Bruder CE, Menzel U, Hergersberg M, Mandahl N, Blennow E, Wedell A, Beare DM, Collins JE, Dunham I, Albertson D, Pinkel D, Bastian BC, Faruqi AF, Lasken RS, Ichimura K, Collins VP, Dumanski JP (2002) A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet* 11: 3221-3229
- Burn J, Goodship J (1996) Developmental genetics of the heart. *Curr Opin Genet Dev* 6: 322-325
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-222
- Chute I, Le Y, Ashley T, Dobson MJ (1997) The telomere-associated DNA from human chromosome 20p contains a pseudotelomere structure and shares sequences with the subtelomeric regions of 4q and 18p. *Genomics* 46: 51-60
- 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: 267-274
- 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: 319-327
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes. *Hum Genet* 80: 235-246
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26: 447-450
- Duponchel C, Di Rocco C, Cicardi M, Tosi M (2001) Rapid detection by fluorescent multiplex PCR of exon deletions and duplications in the C1 inhibitor gene of hereditary angioedema patients. *Hum Mutat* 17: 61-70
- Engels H, Ehrbrecht A, Zahn S, Bosse K, Vrolijk H, White S, Kalscheuer V, Hoovers JM, Schwanitz G, Propping P, Tanke HJ, Wiegant J, Raap AK (2003) Comprehensive analysis of human subtelomeres with combined binary ratio labelling fluorescence in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 11: 643-651
- Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM (2001) Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 3: 416-421
- Fauth C, Speicher MR (2001) Classifying by colors: FISH-based genome analysis. *Cytogenet Cell Genet* 93: 1-10

- Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L, Speicher MR (2001) A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 109: 576-583
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 6: 1305-1313
- Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dode C, Vignes B, Horsley SW, Kearney L, Buckle VJ, Ayyub H, Higgs DR (1996) Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related Alu elements. *Hum Mol Genet* 5: 1163-1169
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9: 132-40
- Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H (2001) Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3: 433-438
- Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrbass U, Wellems TE, Scherf A (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407: 1018-1022
- Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL, Crow YJ, Trainer AH, Connor JM (1998) A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 35: 225-233
- Granzow M, Popp S, Keller M, Holtgreve-Grez H, Brough M, Schoell B, Rauterberg-Ruland I, Hager HD, Tariverdian G, Jauch A (2000) Multiplex FISH telomere integrity assay identifies an unbalanced cryptic translocation der(5)t(3;5)(q27;p15.3) in a family with three mentally retarded individuals. *Hum Genet* 107: 51-57
- Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Yoshiura K, Niikawa N, Matsumoto N (2004) Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 41: 130-136
- Harwood A, Law M, Anderson M, Jalal SM (2001) Technical comparison and application of two commercially available telomere specific probe sets. *J Assoc Genet Tec* 27: 132-134
- Helias-Rodzewicz Z, Bocian E, Stankiewicz P, Obersztyn E, Kostyk E, Jakubow-Durska K, Kutkowska-Kazmierczak A, Mazurczak T (2002) Subtelomeric rearrangements detected by FISH in three of 33 families with idiopathic mental retardation and minor physical anomalies. *J Med Genet* 39: e53
- Henegariu O, Artan S, Grealley JM, Chen XN, Korenberg JR, Vance GH, Stubbs L, Bray-Ward P, Ward DC (2001) Cryptic translocation identification in human and mouse using several telomeric multiplex fish (TM-FISH) strategies. *Lab Invest* 81: 483-491
- Hoischen A (2003) Diplomarbeit: Untersuchung der Rolle subtelomerischer Chromosomenaberrationen bei der Entstehung von Spontanaborten.
- Hollox EJ, Akrami SM, Armour JA (2002a) DNA copy number analysis by MAPH: molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2: 370-378



- Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA (2002b) High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet* 39: 790-795
- Horsley SW, Knight SJ, Nixon J, Huson S, Fitchett M, Boone RA, Hilton-Jones D, Flint J, Kearney L (1998) Del(18p) shown to be a cryptic translocation using a multiprobe FISH assay for subtelomeric chromosome rearrangements. *J Med Genet* 35: 722-726
- Hulten MA, Goldman AS, Lawrie NM (1989) Subtelomeric breakage and chromosome exchange. *Lancet* 2: 1449
- Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenauer R, Anderson MH, Jr., Michels VV (2003) Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 5: 28-34
- Jin C, Martins C, Jin Y, Wiegant J, Wennerberg J, Dictor M, Gisselsson D, Strombeck B, Fonseca I, Mitelman F, Tanke HJ, Hoglund M, Mertens F (2001) Characterization of chromosome aberrations in salivary gland tumors by FISH, including multicolor COBRA-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 161-167
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-7
- Kingsley K, Wirth J, van der Maarel S, Freier S, Ropers HH, Haaf T (1997) Complex FISH probes for the subtelomeric regions of all human chromosomes: comparative hybridization of CEPH YACs to chromosomes of the Old World monkey *Presbytis cristata* and great apes. *Cytogenet Cell Genet* 78: 12-19
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C (2001) High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38: 740-744
- Knight SJ, Flint J (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37: 401-409
- Knight SJ, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DL, Flint J, Kearney L (1997) Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 5: 1-8
- 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: 320-332
- 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: 1676-1681
- Kriek M (2002) Dissertation: Detection of chromosomal aberrations in patients with mental retardation using Multiplex Amplifiable Probe Hybridization.
- Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwerse H, Hansson K, Nijhuis J, Bakker B, van Ommen GJ, den Dunnen JT, Breuning MH (2004) Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet* 41: 249-255

- 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: 215-222
- 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 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: 365-366
- Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6633-6637
- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC (2001) Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 68: 1043-1047
- Linardopoulou E, Mefford HC, Nguyen O, Friedman C, van den Engh G, Farwell DG, Coltrera M, Trask BJ (2001) Transcriptional activity of multiple copies of a subtelomerically located olfactory receptor gene that is polymorphic in number and location. *Hum Mol Genet* 10: 2373-2383
- Lüdecke H, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1989) Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338: 348-350
- Macina RA, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA, Hu XL, Riethman HC (1994) Sequence organization of the human chromosome 2q telomere. *Hum Mol Genet* 3: 1847-1853
- Mantripragada KK, Buckley PG, de Stahl TD, Dumanski JP (2004) Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet* 20: 87-94
- Martin CL, Wong A, Gross A, Chung J, Fantes JA, Ledbetter DH (2002) The evolutionary origin of human subtelomeric homologies--or where the ends begin. *Am J Hum Genet* 70: 972-984
- Mefford HC, Trask BJ (2002) The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet* 3: 91-102
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215
- Mombaerts P (1999) Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev* 9: 315-320
- National Institute of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration (1996) A complete set of human telomeric probes. *Nature genetics* 14: 86-89
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64: 600-604
- Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H (1986) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 151-157

- Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Brough M, Hager HD, Tariverdian G, Brown J, Kearney L, Jauch A (2002) Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet* 111: 31-39
- Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A (2001) Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109: 286-294
- Riethman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu XL, Mudunuri U, Paul S, Wei J (2004) Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res* 14: 18-28
- 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: 266-270
- Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Dagna Bricarelli F, Bonaglia M, Bedeschi M, Borgatti R (2001) Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38: 417-420
- 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: 4913-4917
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- 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: 1109-1125
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30: e57
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497
- Shaffer LG, Kashork CD, Bacino CA, Benke PJ (1999) Caution: telomere crossing. *Am J Med Genet* 87: 278-280
- 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: 527-532

- Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RH, Flint J, Donnai D, Biesecker L (1999) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* 36: 405-411
- Snijders AM, Nowak N, Seagraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG (2001) Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29: 263-264
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 399-407
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375
- Sumner AT (1990) Chromosome banding. Unwin Hyman Ltd.
- 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
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725
- Tosi S, Giudici G, Rambaldi A, Scherer SW, Bray-Ward P, Dirscherl L, Biondi A, Kearney L (1999) Characterization of the human myeloid leukemia-derived cell line GF-D8 by multiplex fluorescence in situ hybridization, subtelomeric probes, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 213-221
- Trask BJ, Friedman C, Martin-Gallardo A, Rowen L, Akinbami C, Blankenship J, Collins C, Giorgi D, Iadonato S, Johnson F, Kuo WL, Massa H, Morrish T, Naylor S, Nguyen OT, Rouquier S, Smith T, Wong DJ, Youngblom J, van den Engh G (1998) Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 7: 13-26
- van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluiter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM (2002) Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 39: 546-553
- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merx 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: 1269-1276
- Wegener R-D (1999) *Diagnostic Cytogenetics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, Bakker B, van Ommen GJ, Breuning MH, den Dunnen JT (2002) Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet* 71: 365-374

- White SJ, Sterrenburg E, van Ommen G-J, den Dunnen JT, Breuning MH (2003) An alternative to FISH: detecting deletion and duplication carriers within 24 hours. *J Med Genet* 40: e113
- Wiegant J, Bezrookove V, Rosenberg C, Tanke HJ, Raap AK, Zhang H, Bittner M, Trent JM, Meltzer P (2000) Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridization. *Genome Res* 10: 861-865
- Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK (1991) In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* 19: 3237-3241
- Wiegant J, Wiesmeijer CC, Hoovers JM, Schuurin E, d'Azzo A, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK (1993) Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet Cell Genet* 63: 73-76
- Wlodarska I, De Wolf-Peeters C, Falini B, Verhoef G, Morris SW, Hagemeijer A, Van den Berghe H (1998) The cryptic inv(2)(p23q35) defines a new molecular genetic subtype of ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 92: 2688-2695
- Wong AC, Ning Y, Flint J, Clark K, Dumanski JP, Ledbetter DH, McDermid HE (1997) Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *Am J Hum Genet* 60: 113-120
- Xu J, Chen Z (2003) Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet* 117C: 15-24
- Yakut S, Berker-Karauzum S, Simsek M, Zorlu G, Trak B, Luleci G (2002) Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet* 61: 26-31

## Anhang

Zusammenstellung der verwendeten Sonden. Die Distanz der Sonden vom jeweiligen Telomer wurde mittels der UCSC- und NCBI-Genome Browser ermittelt (<http://www.genome.cse.ucsc.edu>, freeze Juli 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>).

Ansatz-Nr.	Sonde	Fluorochrom	Marker	Länge (kb)	Distanz vom Telomer (kb) durch <i>in silico</i> -Analysen bestimmt
#1	1p	SG	CEB108/T7	90	200 <sup>1</sup>
	1q	SO	VIJ yRM2123, 1QTEL10 (D1S3738), <b>1QTEL19</b> (D1S3739)	100	164
	XpYp	SG&SO	<b>DXYS129</b>	175	186
	CEP X	SA	X-Centromer		
#2	2p	SG	VIJ yRM1051 (GenBank G31389)	175	200 <sup>1</sup>
	2q	SO	VIJ yRM2112 ( <b>D2S447</b> ), 2QTEL47	60	
	XqYq	SG&SO	EST <b>Cdy 16c07</b>	170	151
	CEP X	SA	X-Centromer		
#3	3p	SG	<b>3PTEL25</b> (D3S4559)	80	131
	3q	SO	<b>3QTEL05</b> (D3S4560)	95	910
	22q	SG&SO	MS607 (GenBank X58044), ACR, <b>22QTEL31</b> (D22S1726)	80	117
	LSI BCR	SA	LSI BCR		
#4	4p	SG	<b>GS10K2/T7</b>	145	101
	4q	SO	AFM A224XH1 ( <b>D4S2930</b> )	130	839
	21q	SG&SO	VIJ yRM2029, S100B3, 21QTEL08, <b>D21S1575</b> , (21QTEL07), D21S1146, HRMTIL	170	83
	LSI AML1	SA	LSI AML1		
#5	5p	SG	C84C11/T3	191	unbekannt <sup>1</sup>
	5q	SO	GS35o8/T7, <b>5QTEL70</b>	105	247
#6	6p	SG	6PTEL48	80	300 <sup>1</sup>
	6q	SO	VIJ yRM2158, <b>6QTEL54</b>	100	119
	13q	SG&SO	VIJ yRM2002 (D13S327)	75	2
	LSI 13	SA	LSI 13		
#7	7p	SG	VIJ yRM1185 (GenBank G31341) <b>7PTEL03</b>	60	252
	7q	SO	VYJ yRM2000 (STS 200H), 7QTEL20, <b>AF027390</b>	95	7
	14q	SG&SO	sts-X58399; SHGC-36156; sts-AA034492, telomeric IGHV segments	160	
	CEP 17	SA	CEP 17		
#8	8p	SG	AFM 197XG5 (D8S508)	135	
	8q	SO	VIJ yRM2053	100	
	17p	SG&SO	282M15/SP6	70	100-200 <sup>1</sup>
	CEP 17	SA	CEP 17		
#9	9p	SG	305J7-T7	115	190 <sup>1</sup>
	9q	SO	VIJ yRM2241 ( <b>D9S325</b> )	95	173
	17q	SG&SO	AFM217yD10 ( <b>D17S928</b> , GenBank Z23646)	160	828
	CEP 17	SA	CEP 17		
#10	10p	SG	<b>10PTEL006</b> (GenBank Z96139)	80	292
	10q	SO	10QTEL24 ( <b>D10S2490</b> )	75	287
	15q	SG&SO	<b>WI-5214</b> (D15S963)	100	419

	LSI PML	SA	LSI PML		
<b>#11</b>	11p	SG	<b>D11S2071</b> (GenBank U12896), 11PTEL03, VIJ yRM2209	110	236
	11q	SO	VIJ yRM2072	160	
	18p	SG&SO	VIJ yRM2102 ( <b>D18S552</b> )	160	212
	CEP 18	SA	CEP 18		
<b>#12</b>	12p	SG	8M16/SP6	100	100 <sup>1</sup>
	12q	SO	VIJ yRM2196 (GenBank 011838)	165	
	18q	SG&SO	VIJ yRM2050, <b>18QTEL11</b> (D18S1390), STSG193, AFM254VD5, STS-F04195, TIGR- A008P37, stSG52963	170	64
	CEP 18	SA	CEP 18		
<b>#13</b>	16p	SG	SHGC-15336, 16PTEL03 (D16S3399), <b>16PTEL05</b> (D16S3400), alpha globin gene cluster (HBZ, HBA2, HBA1, HBQ)	110	
	16q	SO	<b>16QTEL013</b> (GenBank Z96319)	110	215
<b>#14</b>	19p	SG	129F16/SP6	80	250-500 <sup>1</sup>
	19q	SO	D19S238E	160	
<b>#15</b>	20p	SG	<b>20PTEL18</b> (D20S1157)	160	127
	20q	SO	20QTEL14	140	50 <sup>1</sup>

Tabelle 22: ToTelVysion Probe Panel (Vysis); SG=SpectrumGreen, SO=SpectrumOrange, SA=SpectrumAqua; **fett**: Marker, dessen Lokalisation als Bezugspunkt für Distanzangabe diente; <sup>1</sup>Distanz aus Knight et al. (2000) übernommen.

Subtelomer	Klon-ID	Marker	Distanz vom Telomer (kb) durch <i>in silico</i> -Analysen bestimmt
1p	GS-62L8	1PTEL06	200 <sup>1</sup>
1q	CTB-160H23	1QTEL19, RH74669	164
2p	GS-892G20	2PTEL27, RH74671	78
2q	GS1-172I13	VIJ-RM2112	240 <sup>1</sup>
3p	GS-1186B18	3PTEL25, RH74676	131
3q	CTC-196F4	3QTEL06, D3S1272	901
4p	CTC-36P21	4PTEL04, RH74678	206
4q	CTC-963K6	4QTEL11	275-500 <sup>1</sup>
5p	GS-24H17	C84C11/T3	unbekannt <sup>1</sup>
5q	CTC-240G13	5QTEL070	247
6p	GS-196I5	6PTEL48	300 <sup>1</sup>
6q	CTB-57H24	6QTEL54, RH74681	119
7p	CTB-164D18	7PTEL03, AC093614	252
7q	CTB-3K23	7QTEL20, AF027390,	7
8p	GS1-77L23	AFM197XG5	250-450 <sup>1</sup>
8q	CTC-489D14	8QTEL11, D8S1925	165
9p	GS-43N6	9PTEL30	600 <sup>1</sup>
9q	GS1-135I17	D9S325	173
10p	GS-23B11	10PTEL006, Z96139	292
10q	CTB-137E24	D10S2490	287
11p	GS-44H16	11PTEL03, D11S2071	236
11q	GS-770G7	D11S4974, RH74691	3.298
12p	CTC-496A11	12PTEL27	unbekannt <sup>1</sup>
12q	CTC-221K18	12QTEL87, D12S2343	39
13q	GS-163C9	13QTEL56, RH74694	11
14q	GS-200D12	VIJ-YRM2006	235
15q	CTB-154P1	WI-5214, D15S936	419
16p	CTB-121I4	16PTEL05	160 <sup>1</sup>
16q	CTC-240G10	16QTEL48	200 <sup>1</sup>
17p	GS-202L17	7PTEL080, Z96354	48
17q	GS1-50C4	D17S928, AFM217YD10	828
18p	GS-52M11	18PTEL02	57
18q	CTC-964M9	18QTEL11, RH74699	64
19p	CTC-546C11	19PTEL29	250-500 <sup>1</sup>
19q	RP11-420P11	CTD 2623H2	328
20p	GS-1061L1	20PTHY33	180 <sup>1</sup>
20q	CTB-81F12	20QTEL14	50 <sup>1</sup>
21q	CTB-63H24	21QTEL07, D21S1575	83
22q	CTB-99K24	TEL-22Q31, RH74704,	117
XpYp	GS-839D20	DXYS129	186
XqYq	GS1-225F6	CDY16C07, AJ271736	151

Tabelle 23: „eigenes“ Subtelomer-Sondenset, <sup>1</sup>Distanz aus Knight et al. (2000) übernommen.

Chromosom	Region	Klon-ID
13	13q12.11	RP11-408E5, AL139327
14	14q11.2	RP11-98N22, AL163152
15	15q11.2	RP11-307C10
21	21q11.2	RP1-270M7, AF248484
22	22q11.21	RP11-81B03

Tabelle 24: FISH-Sonden zur Identifizierung der akrozentrischen Chromosomen.



Subtelomer	Lokalisation	Gen / Sequenz	Länge (bp)	GC-Gehalt (%)	Distanz vom Telomer (kb) <sup>1</sup>	SD	Beurteilung
<b>1p<sup>2</sup></b>	1p36.33	PRKCZ	364	63	1.985	0,18	unzuverlässig
<b>1q</b>	1q43	EXO1	434	41	7.074	0,09	zuverlässig
<b>2p</b>	2p25.3	SH3YL1	407	56	209	0,13	zuverlässig
<b>2q<sup>2</sup></b>	2q37.3	NEDD5	170	42	1.003	0,08	zuverlässig
<b>3p</b>	3p26.3	sAKB8	218	42			
<b>3q</b>	3q29	NCBP2	185	46	1.354	0,07	zuverlässig
<b>4p</b>	4p16.2	c17	225	68	5.082	0,09	zuverlässig
<b>4q</b>	4q35.1	IRF2	398	43	5.726	0,10	zuverlässig
<b>5p<sup>2</sup></b>	5p15.33	AF086267	210	63	248	0,16	unzuverlässig
<b>5q</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>6p<sup>2</sup></b>	6p25.3	STA 1	250	56			
<b>6q<sup>2</sup></b>	6q27	BC040606	304	48	1.124	0,08	zuverlässig
<b>7p<sup>2</sup></b>	7p22.3	MAFK	299	62	1.315	0,08	zuverlässig
<b>7q</b>	7q36.3	C7orf2	422	55	2.653	0,08	zuverlässig
<b>8p</b>	8p23.3	FBX025	205	38	391	0,07	zuverlässig
<b>8q</b>	8q24.3	NT_007997	355	34	40	0,15	zuverlässig
<b>9p</b>	9p24.3	SMARCA1	175	44	2.152	0,12	zuverlässig
<b>9q</b>	9q34.3	CACNA1B	193	54	161	0,08	zuverlässig
<b>10p</b>	10p15.3	CRFG	360	45	993	0,12	zuverlässig
<b>10q</b>	10q26.2	TOK-1	413	41	7.950	0,11	zuverlässig
<b>11p</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>11q</b>	11q25	AP003025	236	43	3.447	0,08	zuverlässig
<b>12p</b>	12p13.33	NINJ2	282	60	545	0,10	zuverlässig
<b>12q</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>13q</b>	13q34	CDC16	154	51	100	0,08	zuverlässig
<b>14q<sup>2</sup></b>	14q32.33	JAG2	157	48	1.722	0,12	zuverlässig
<b>15q<sup>2</sup></b>	15q26.3	PACE4	350	40	676	0,07	zuverlässig
<b>16p<sup>2</sup></b>	16p13.3	PIGQ	131	46	559	0,09	zuverlässig
<b>16q</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>17p</b>	17p13.3	RPA1	313	53	2.007	0,07	zuverlässig
<b>17q</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>18p<sup>2</sup></b>	18p11.32	ADCYAP1	312	34	900	0,10	zuverlässig
<b>18q<sup>2</sup></b>	18q23	KIAA0863	306	56	120	0,09	zuverlässig
<b>19p</b>	19p13.3	FSTL3	267	57	633	0,12	zuverlässig
<b>19q</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>20p</b>	keine Sonde verfügbar						
<b>20q<sup>2</sup></b>	20q13.3	BIRC7	288	57	1.147	0,10	zuverlässig
<b>21q</b>	21q22.3	HRMT1L1	327	59	35	0,10	zuverlässig
<b>22q<sup>2</sup></b>	22q13.3	ECGF1	177	64	297	0,16	unzuverlässig
<b>Xp</b>	Xp22.33	ARSE	427	53	2.459	0,14	unzuverlässig
<b>Xq<sup>2</sup></b>	Xq28	CLIC2	189	46	706	0,10	zuverlässig
<b>Yp</b>	Yp11.31	SRY	258	44	2.301	0,07	zuverlässig
<b>XqYq<sup>2</sup></b>	Xq28/ Yq12	17H7	160	44	88	0,07	zuverlässig

Tabelle 25. MAPH-Sondenset A. SD=Standardabweichung; Länge: Sondenlänge inklusive MAPH-Primer; Distanz vom Telomer: Distanz zwischen Telomer und Position des jeweils distalen Sondenendes. kursiv: unzuverlässige Sonden (vgl. 4.2.1), <sup>1</sup>durch *in silico*-Analysen bestimmt; <sup>2</sup>Spezifität durch Analyse von Positivkontrollen bewiesen.

Subtelomer	Lokalisation	Gen / Sequenz	Länge (bp)	GC-Gehalt (%)	Distanz vom Telomer (kb) <sup>1</sup>	SD	Beurteilung
1p <sup>2</sup>	1p36.33	PRKCZ	364	63	1.985	0,18	unzuverlässig
1q	1q43	EXO1	434	41	7.074	0,09	zuverlässig
2p	2p25.3	SH3YL1	407	56	209	0,13	zuverlässig
2q <sup>2</sup>	2q37.3	NEDD5	170	42	1.003	0,08	zuverlässig
3p	3p26.3	CHL1	218	42	394	0,07	zuverlässig
3q	3q29	NCBP2	185	46	1.354	0,07	zuverlässig
4p	4p16.2	c17	225	68	5.082	0,09	zuverlässig
4q	4q35.1	IRF2	398	43	5.726	0,10	zuverlässig
5p <sup>2</sup>	5p15.33	AF086267	210	63	248	0,16	unzuverlässig
5q	5q35.3	MAML1	321	56	1.732	0,06	zuverlässig
6p <sup>2</sup>	6p25.3	AK097546	250	56	126	0,09	zuverlässig
6q <sup>2</sup>	6q27	BC040606	304	48	1.124	0,08	zuverlässig
7p <sup>2</sup>	7p22.3	MAFK	299	62	1.315	0,08	zuverlässig
7q	7q36.3	C7orf2	422	55	2.653	0,08	zuverlässig
8p	8p23.3	FBX025	205	38	391	0,07	zuverlässig
8q	8q24.3	NT_007997	355	34	40	0,15	zuverlässig
9p	9p24.3	SMARCA1	175	44	2.152	0,12	zuverlässig
9q	9q34.3	CACNA1B	193	54	161	0,08	zuverlässig
10p	10p15.3	CRFG	360	45	993	0,12	zuverlässig
10q	10q26.2	TOK-1	413	41	7.950	0,11	zuverlässig
11p	11p15.5	HCCA2	147	58	1.459	0,14	zuverlässig
11q	11q25	AP003025	236	43	3.447	0,08	zuverlässig
12p	12p13.33	NINJ2	282	60	545	0,10	zuverlässig
12q (a)	12q24.33	CHFR	240	50	421	0,13	zuverlässig
12q (b)	12q24.33	RAN	261	38	2.364	0,09	zuverlässig
13q	13q34	CDC16	154	51	100	0,08	zuverlässig
14q <sup>2</sup>	14q32.33	JAG2	157	48	1.722	0,12	zuverlässig
15q <sup>2</sup>	15q26.3	PACE4	350	40	676	0,07	zuverlässig
16p <sup>2</sup>	16p13.3	PIGQ	131	46	559	0,09	zuverlässig
16q	keine Sonde verfügbar						
17p	17p13.3	RPA1	313	53	2.007	0,07	zuverlässig
17q	17q25.3	NPTX	337	55	2.717	0,09	zuverlässig
18p <sup>2</sup>	18p11.32	ADCYAP1	312	34	900	0,10	zuverlässig
18q <sup>2</sup>	18q23	KIAA0863	306	56	120	0,09	zuverlässig
19p	19p13.3	FSTL3	267	57	633	0,12	zuverlässig
19q	19q13.43	ZIM2	334	55	1.784	0,06	zuverlässig
20p	20p13	CSNK2A	274	37	459		nicht informativ
20q <sup>2</sup>	20q13.3	BIRC7	288	57	1.147	0,10	zuverlässig
21q	21q22.3	HRMT1L1	327	59	35	0,10	zuverlässig
22q <sup>2</sup>	22q13.3	ECGF1	177	64	297	0,16	unzuverlässig
Xp	Xp22.33	ARSE	427	53	2.459	0,14	unzuverlässig
Xq <sup>2</sup>	Xq28	CLIC2	189	46	706	0,10	zuverlässig
Yp	Yp11.31	SRY	258	44	2.301	0,07	zuverlässig
XqYq <sup>2</sup>	Xq28/ Yq12	17H7	160	44	88	0,07	zuverlässig

Tabelle 26: MAPH-Sondenset B. SD=Standardabweichung; Länge: Sondenlänge inklusive MAPH-Primer; Distanz vom Telomer: Distanz zwischen Telomer und Position des jeweils distalen Sondenendes; *kursiv*: unzuverlässige Sonden (vgl. 4.2.1), <sup>1</sup>durch *in silico*-Analysen bestimmt; <sup>2</sup>Spezifität durch Analyse von Positivkontrollen bewiesen.

Sonde	Distanzen vom Telomer (kb)			Abstände der Sonden zueinander (kb)		
	MAPH-Set	eigenes Set	ToTelVysion Probe Panel	MAPH-Set / eigenes Set	MAPH-Set / ToTelVysion Probe Panel	eigenes Set / ToTelVysion Probe Panel
1p	1.985	200 <sup>1</sup>	200 <sup>1</sup>	1.785	1.785	0
1q	7.074	164	164	6.910	6.910	0
2p	209	78		131		
2q	1.003	240 <sup>1</sup>		763		
3p	394	131	131	263	263	0
3q	1.354	901	910	453	444	9
4p	5.082	206	101	5.076	4.980	-105
4q	5.726	275-500 <sup>1</sup>	839	mind. 5.226	4.887	mind. 339
5p	248	unbekannt <sup>1</sup>	unbekannt <sup>1</sup>			
5q	1.732	247	247	1.485	1.485	0
6p	126	300 <sup>1</sup>	300 <sup>1</sup>	-174	-174	0
6q	1.124	119	119	1.005	1.005	0
7p	1.315	252	252	1.063	1.063	0
7q	2.653	7	7	2.645	2.645	0
8p	391	250-450 <sup>1</sup>		-59		
8q	40	165		-125		
9p	2.152	600 <sup>1</sup>	190 <sup>1</sup>	1.552	1.962	410
9q	161	173	173	-12	-12	0
10p	993	292	292	701	701	0
10q	7.950	287	287	7.663	7.663	0
11p	1.459	236	236	1.223	1.223	0
11q	3.447	3.298		149		
12p	545	unbekannt <sup>1</sup>	100 <sup>1</sup>		445	
12q(a)	421	39		382		
12q(b)	2.364	39		2.325		
13q	100	11	2	89	98	9
14q	1.722	235		1.487		
15q	676	419	419	257	257	0
16p	559	160 <sup>1</sup>		399		
16q	-	200 <sup>1</sup>	215			15
17p	2.007	48	100-200 <sup>1</sup>	1.959	1.907	52
17q	2.717	828	828	1.889	1.889	0
18p	900	57	212	843	688	155
18q	120	64	64	56	56	0
19p	633	250-500 <sup>1</sup>	250-500 <sup>1</sup>	mind.133	mind.133	0
19q	1.784	328		1456		
20p	459	180 <sup>1</sup>	127	279	332	-53
20q	1.147	50 <sup>1</sup>	50 <sup>1</sup>	1.097	1.097	0
21q	35	83	83	-48	-48	0
22q	297	117	117	179	179	0
Xp	2.459	-	-	2.273 (XpYp)	2.273 (XpYp)	-
Xq	706	-	-	555 (XqYq)	555 (XqYq)	-
Yp	2.301	-	-	2.273 (XpYp)	2.273 (XpYp)	-
XpYp	-	186	186	-	-	0
XqYq	88	151	151	63	63	0

Tabelle 27: Entfernungen der MAPH- und FISH-Sonden vom jeweiligen Chromosomenende und deren Abstände zueinander (bestimmt mittels: <http://www.genome.cse.ucsc.edu>, freeze Juli 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>). <sup>1</sup>Distanz aus Knight et al. (2000) übernommen; negatives Vorzeichen und grau unterlegt: MAPH-Sonde ist distal zur Sonde des eigenen Sets bzw. zur Sonde des ToTelVysion Probe Panels lokalisiert.

<b>Subtelomer</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Klon-ID</b>	<b>Länge (kb)</b>	<b>Distanz vom Telomer (kb)</b>	<b>Distanz zur MAPH-Sonde (kb)</b>
<b>1p</b>	1p36.33	RP11-181G12	179	1.941	-
<b>5p</b>	5p15.33	RP11-1050N19	227	242	-
<b>9p</b>	9p24.2	RP11-48M17	160	2.136	-
<b>11p</b>	11p15.5	RP11-371C18	132	1.379	-
<b>12q</b>	12q24.33	RP11-1K22	189	2.339	-
<b>14q</b>	14q32.33	RP11-435F10	199	1.429	92,7
<b>17p</b>	17p13.4	RP11-129M22	135	1.921	-
<b>17q</b>	17q25.3	RP11-1387N21	197	2.666	-
<b>18p</b>	18p11.33	RP11-672L10	170	785	-
<b>Xp</b>	Xp22.33	RP11-418N20	183	2.468	5,5

Tabelle 28: FISH-Sonden zur Überprüfung der MAPH-Ergebnisse (ausgewählt aus: <http://www.genome.ucsc.edu>, freeze Juli 2003).

## DANKSAGUNG

Meinen besonderen Dank richte ich an Frau Prof. Dr. G. Schwanitz für die Überlassung des Themas, die stets engagierte und freundliche Betreuung sowie die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit.

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

Großer Dank gilt Herrn Dr. H. Engels für die intensive und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und kompetente fachliche Unterstützung sowie für seinen Humor.

Im Besonderen möchte ich Antje Ehrbrecht für ihre Freundschaft und die außerordentlich gute und produktive Zusammenarbeit danken. Sie stand mir während meines gesamten Studiums mit uneingeschränkter Hilfsbereitschaft, gutem Rat und viel Humor zur Seite.

Bei Frau Dr. M. Kriek und Herrn S. White möchte ich mich für die Einführung in die Technik der MAPH sowie für die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen bedanken.

Frau Dr. K. Bosse danke ich herzlich für die Zusammenstellung und Verwaltung des MR-Kollektivs und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und besonders den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Cytogenetik sowie der Arbeitsgruppen „Friedl/Mangold“ und „Kubisch“ gilt mein Dank für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und die kompetente Hilfe.

Dem Land Nordrhein-Westfalen danke ich für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Manuela Beyer, Alexander Hoischen, Christian Kurth und Dr. Rüdiger Spitz für die Korrekturlesearbeit. Karsten Lasaar unterstützte mich bei der formalen Gestaltung der Arbeit. Ihm danke ich herzlich für seine Bemühungen.

Bei Philipp Schmahl bedanke ich mich für seine umfassende Unterstützung, seine Geduld und sein Verständnis während der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken. Sie haben mich vom ersten bis zum letzten Tag meines Studiums unterstützt und mir jede erdenkliche Hilfe zukommen lassen.

## **ERKLÄRUNG**

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

Bonn, im März 2004