

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DAS FRAGILE-X-SYNDROM UND ANDERE
URSACHEN MENTALER RETARDIERUNG:
ANALYSEN ZUR OPTIMIERUNG DER KLINISCHEN
UND MOLEKULAREN DIFFERENTIALDIAGNOSTIK**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
MARA HESSE
aus Bremen

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Siebert, Institut für Humangenetik

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Stephani, Klinik für Neuropädiatrie

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2010

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 06.10.2010

Gezeichnet Prof. Dr. Dr. Cascorbi

Für Luca

- die noch so viele Träume hatte -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Mentale Retardierung	1
1.1.1 Chromosomale Aberrationen	2
1.1.2 Submikroskopische Aberrationen	3
1.1.3 X-chromosomale mentale Retardierung	3
1.2 Das Fragile-X-Syndrom	4
1.2.1 Geschichte	4
1.2.2 Pathogenese und Erbgang	5
1.2.3 Diagnostik	6
1.2.4 Epidemiologie	6
1.2.5 Klinische Symptomatik und Score-Systeme	6
1.3 Ausgewählte Differentialdiagnosen zum Fragilen-X-Syndrom	8
1.3.1 Das Prader-Willi-Syndrom	8
1.3.2 Mikrodeletionssyndrome	10
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Patientenkollektiv	13
2.1.1 Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung	13
2.1.2 Ärztefragebogen	14
2.2 Statistische Analysen	14
2.3 Labormethoden – Materialien	15
2.3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.3.2 Kits	16
2.3.3 Lösungen und Puffer.....	16
2.3.4 FISH-Sonden	18
2.3.5 Geräte	19
2.3.6 Software	19
2.4 Labormethoden – Prinzip und Durchführung.....	20
2.4.1 Array basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH).....	20

2.4.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	24
2.4.3	Methylierungsanalyse des <i>SNRPN</i> -Gens	29
3	Ergebnisse	35
3.1	Statistische Analyse der Patientendaten	35
3.1.1	Vergleichbarkeit der Kollektive in Bezug auf das Alter	35
3.1.2	Vergleich der Kollektive	36
3.1.3	Auswertung der Ärztefragebögen	37
3.1.4	Eigene Score-Systeme	39
3.1.5	Kopfumfang	41
3.2	Laborergebnisse	42
3.2.1	Array basierte vergleichende genomische Hybridisierung	42
3.2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	44
3.2.3	Methylierungsanalyse	46
3.2.4	Zusammenfassung der Laborergebnisse	47
4	Diskussion	48
4.1	Screening bei Verdacht auf das Fragile-X-Syndrom	48
4.1.1	Screeningmodelle und Score-Systeme aus der Literatur	48
4.1.2	Eigene Scores	50
4.1.3	Labortests als Alternative.....	53
4.1.4	Bedeutung der frühzeitigen Diagnosestellung	55
4.2	Labordiagnostik bei Verdacht auf das Fragile-X-Syndrom	56
4.2.1	Southern-Blot und PCR	56
4.2.2	Array basierte vergleichende genomische Hybridisierung	56
4.2.3	Typischer Fragiles-X-Phänotyp ohne Repeatexpansion.....	59
4.2.4	Fragiles-X-Syndrom mit zusätzlichen chromosomalen Aberrationen	61
4.3	Differentialdiagnosen zum Fragilen-X-Syndrom.....	62
4.3.1	Mikrodeletionssyndrome als Differentialdiagnose.....	62
4.3.2	Atypisches Prader-Willi-Syndrom als Differentialdiagnose	65
4.4	Diagnostisches Vorgehen bei mentaler Retardierung	66
4.5	Fazit und Ausblick	68
5	Zusammenfassung	69
6	Abstract	71

Literaturverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XIV
Anhang	XV
A1: Gegenüberstellung einiger Score-Systeme	XV
A2: Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung	XVI
A3: Ärztefragebogen	XVII
A4: Das Patientenkollektiv	XVIII
A5: Ausgewählte Fälle	XX
1. Patient 99: männlich, 7 Jahre, Mikrodeletion 16p11.2	XX
2. Patient 36: männlich, 16 Jahre, Mikrodeletion 16p11.2	XXI
A6: Ergebnisse FISH	XXIII
Danksagung	XXV
Lebenslauf	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden werden die verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Allgemein übliche Abkürzungen wie ZNS und IQ werden nicht erwähnt. Von den in der Arbeit vorkommenden Genen werden nur die häufig genannten berücksichtigt.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
AGRE	<i>Autism Genetic Resource Exchange</i>
AS	Angelman-Syndrom
AUTS	Erkrankungen des autistischen Spektrums (<i>autism susceptibility</i>)
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CGH	vergleichende genomische Hybridisierung (<i>comparative genomic hybridisation</i>)
CNV	Genkopiezahlvarianten (<i>copy number variations</i>)
DEL	Deletion (Verlust von Genmaterial)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelsignal
DS	Down-Syndrom
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DUP	Duplikation (Zugewinn von Genmaterial)
FA	Familienanamnese
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FMR1	Gen, in dessen Bereich eine Repeatexpansion, Deletion oder Punktmutation zum FraX führt (<i>fragile X mental retardation 1</i>)
FMRP	Fragiles-X-mentales-Retardierungs-Protein
FraX	Fragiles-X-Syndrom
FXTAS	Fragiles-X-assoziiertes Tremor-Ataxie-Syndrom
G	Guanin

IGE	idiopathische generalisierte Epilepsie
kb	Kilobasen, entsprechen 1.000 Basen
M	Molar
Mb	Megabasen, entsprechen 1.000.000 Basen
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MLPA	Methode zur relativen, quantitativen Darstellung von bis zu 50 Nukleinsäurefragmenten in nur einem Ansatz (<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
MR	mentale Retardierung
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MSP	Methylierungsspezifische PCR
n	Stichprobe; Zahl der Patienten, die einer Gruppe zugeordnet wurden
NaCl	Natriumchlorid
OMIM	genetische Datenbank (<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)
P	Perzentile
p	kurzer Chromosomenarm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHA	Phytohämagglutinin
POF	vorzeitige Ovarialinsuffizienz (<i>premature ovarian failure</i>)
PWS	Prader-Willi-Syndrom
q	langer Chromosomenarm
SB	Southern-Blot
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEV	Sprachentwicklungsverzögerung
Sgr	grüne Fluoreszenz (<i>spectrum green</i>)
SNRPN	Gen das bei Verlust der väterlichen Kopie zum PWS führt (<i>small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N</i>)
So	rote Fluoreszenz (<i>spectrum orange</i>)
SPSS	Statistiksoftware (<i>Superior Performing Software System</i>)
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
UKS-H	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UPD	uniparentale Disomie
U/min	Umdrehungen pro Minute
XLMR	X-chromosomale Gendefekte mit MR (<i>X-linked mental retardation</i>)

1 Einleitung

1.1 Mentale Retardierung

Mentale Retardierung (MR) ist ein Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten [1].

Nach dem *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM)-IV, das die American Psychiatric Association publiziert, wird mentale Retardierung wie folgt definiert (alle drei Kriterien müssen vorliegen):

- IQ < 70
- Dysfunktion oder Einschränkungen in > 2 der folgenden Gebiete: Selbstversorgung und selbstständiges Leben, soziale/interpersonelle Fähigkeiten, Leben in der Gesellschaft, Selbstbestimmtheit, funktionale akademische Fähigkeiten, Arbeit, Gesundheit, Sicherheit und Freizeit
- Beginn in der Kindheit

Aufgrund der Prävalenz (ca. 2%), der bisher geringen therapeutischen Möglichkeiten und der daraus resultierenden lebenslangen Beeinträchtigung für Betroffene und Pflegende ist die mentale Retardierung ein bedeutendes Gesundheitsproblem [2].

Anhand des IQ kann mentale Retardierung in vier Schweregrade eingeteilt werden. Hierbei gilt:

- | | | |
|-----------------|----|-----------------|
| • Mild | IQ | 50-55 bis 70 |
| • Mittel | IQ | 35-40 bis 50-55 |
| • Schwer | IQ | 20-25 bis 35-40 |
| • Tief greifend | IQ | < 20-25 |

Milde Formen sind mit einer Prävalenz von ca. 1,5-3% häufiger als mittelschwere und schwere Formen (Prävalenz 0,4%). In Deutschland leben etwa 2 Millionen geistig mild retardierte und ca. 400.000 schwer retardierte Personen. Angehörige sozial benachteiligter Gruppen sind häufiger von einer milden MR betroffen als sozial besser gestellte Personen. Das Auftreten schwerer MR ist hingegen gleichmäßiger über die sozialen Gruppen verteilt [3].

Mentale Retardierung kann durch genetische und nichtgenetische Faktoren verursacht werden (Tabelle 1). Nichtgenetische Ursachen können zum Beispiel Infektionen oder Intoxikationen während der Schwangerschaft, Geburtskomplikationen, postnatale Infektionen oder Traumata sein [4]. Bis heute sind etwa 1.200 Krankheitsbilder beschrieben worden, die mit einer mentalen Retardierung assoziiert sind [5].

Tabelle 1: Ursachen mentaler Retardierung

Ursache	%
Chromosomale Anomalien	4-28
Erkennbare Dysmorphie-Syndrome	3-7
Bekannte monogene Erkrankungen	3-9
Strukturelle ZNS-Fehlbildungen	7-17
Komplikationen bei Frühgeburt	2-10
Kulturell-familiäre Ursachen	3-12
Metabolische/endokrinologische Ursachen	1-5
Unbekannt	30-50

Verteilung der Ursachen bei angeborener mentaler Retardierung (modifiziert nach Curry et al. [6])

Bei über 50% der Patienten mit einer mittelschweren oder schweren MR liegen genetische Ursachen vor [7]. Die häufigste ist das Down-Syndrom (4-28% der Fälle). Andere häufige genetische Ursachen sind das Fragile-X-Syndrom (2-6%) und ZNS-Fehlbildungen (7-17%) [6]. Die Betroffenen benötigen lebenslang Unterstützung und viele haben spezielle gesundheitliche Probleme, die die Lebenserwartung einschränken.

Mildere Formen beruhen wesentlich seltener ausschließlich auf genetischen Ursachen, sondern sind meist auf ein Zusammenspiel von genetischen Anlagen und Umweltfaktoren zurückzuführen. Häufigste genetische Ursachen einer milden MR sind das Down-Syndrom (5,7% der Fälle) und das Fragile-X-Syndrom (4,6%). Bei 70-80% bleibt die Ursache unbekannt [8].

1.1.1 Chromosomale Aberrationen

Bei ca. 15% aller Patienten mit MR liegen lichtmikroskopisch erkennbare Chromosomenaberrationen vor [9]. Darunter nimmt die Trisomie 21, die klinisch in einem Down-Syndrom resultiert, mit einer Prävalenz von 1:700-1:1000 den größten Anteil ein. Weitere häufige Ursachen einer MR sind Zugewinne (Duplikationen, DUP) und Verluste (Deletionen, DEL) von Chromosomenmaterial.

Größere Chromosomenaberrationen führen, wenn sie in unbalancierter Form vorliegen, fast immer zu mentaler Beeinträchtigung. Ausnahmen bilden numerische Aberrationen der Ge-

schlechtschromosomen (Gonosomen), wie zum Beispiel das Turner-Syndrom (XO, d.h. fehlendes zweites Gonosom) oder das Klinefelter-Syndrom (XXY).

1.1.2 Submikroskopische Aberrationen

Eine weitere wichtige Ursache mentaler Retardierung sind strukturelle Chromosomenveränderungen, die unterhalb der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze von ca. 5-10 Mb liegen und daher „submikroskopische Aberrationen“ oder auch „Mikrodeletionen“ bzw. „Mikroduplikationen“ genannt werden. Solche Veränderungen können heute mittels gezielter molekularzytogenetischer Diagnostik (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, FISH) nachgewiesen werden und liegen bei schwerer MR in ca. 7,4% der Fälle vor [10]. Treten neben der mentalen Retardierung Fehlbildungen oder Dismorphiezeichen auf, können diese häufig wegweisend für eine gezielte Diagnostik sein. Oft liegt in einem solchen Fall eine Deletion im Bereich der Chromosomenenden (Telomeren) und der angrenzenden genetisch aktiven (euchromatischen) Subtelomerregionen vor. Die Untersuchung der Telomerregionen aller Chromosomen mit speziellen Sonden, das so genannte Subtelomer-Screening, war die erste chromosomenweite Untersuchungsmethode, um das Genom auf submikroskopische Veränderungen zu untersuchen. Es wird vor allem bei mental retardierten Patienten eingesetzt, bei denen wegweisende äußere Merkmale fehlen. Mit dieser Methode können bei 2-5% der mental retardierten Patienten Veränderungen in Subtelomerbereichen nachgewiesen werden [11, 12].

Eine neue Methode, die Array-CGH (*array* = Raster, CGH = *comparative genomic hybridization*), ermöglicht den Nachweis sehr kleiner unbalancierter Aberrationen im gesamten Genom. Inzwischen wird mit dieser Methode eine Auflösung von weniger als 100 kb erreicht [13, 14]. Studien zeigen, dass sich mittels Array-CGH bei ca. 10% der Patienten mit idiopathischer MR und unauffälligem Chromosomensatz in der zytogenetischen Analyse Veränderungen im Erbgut nachweisen lassen [15].

1.1.3 X-chromosomale mentale Retardierung

Männliche Patienten sind wesentlich häufiger von mentaler Retardierung betroffen als weibliche. Das Geschlechterverhältnis männlich:weiblich liegt für schwere MR bei 1,4:1 und für leichte MR bei 1,9:1 [16]. Ursächlich dafür ist das Vorliegen X-chromosomaler Defekte (XLMR). Aktuell geht man davon aus, dass bei ca. 10% aller mental retardierten männlichen Patienten ein solcher Defekt vorliegt [17]. Die häufigste bekannte X-chromosomale Form der MR ist das Fragile-X-Syndrom.

1.2 Das Fragile-X-Syndrom

Das Fragile-X-Syndrom (OMIM 309550 [18]) nimmt eine Schlüsselstellung in der Differentialdiagnose der mentalen Retardierung ein.

1.2.1 Geschichte

Erstmals wurde das Fragile-X-Syndrom (FraX) 1943 von *Martin* und *Bell* beschrieben [19]. Daher stammt auch das Synonym „Martin-Bell-Syndrom“. In der Arbeit wird über 11 mental retardierte, miteinander verwandte Männer berichtet, die allesamt schwerer betroffen waren als die weiblichen Familienangehörigen. Aufgrund dieser Beobachtung vermuteten Martin und Bell schon damals eine geschlechtsgebundene Vererbung.

Im Jahr 1968 stellte *Lehrke* die Hypothese auf, dass es Gene auf dem X-Chromosom gibt, die eine wesentliche Rolle für intellektuelle Funktionen spielen und deren Mutation zu einer geistigen Behinderung führt [20].

Von *Lubs* wurde 1969 erstmals der Name „Marker-X-Syndrom“ als Synonym des FraX gebraucht. Er beschrieb bei einem Bruderpaar mit geistiger Behinderung eine auffällige Stelle an einem metazentrischen Chromosom, das er als X-Chromosom klassifizierte. Er nannte dieses Chromosom mit der brüchigen Stelle „Marker-X-Chromosom“ [21].

Erst 1977 konnte diese brüchige Stelle durch *Sutherland* erneut nachgewiesen werden. Er zeigte, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums für ihr Auftreten entscheidend ist. Sie wird nur unter relativem Folsäuremangel sichtbar [22]. Seitdem wurde das Syndrom als FraX bezeichnet und Reihenuntersuchungen in betroffenen Familien konnten beginnen. Lange Zeit war die zytogenetische Darstellung die einzige Möglichkeit das FraX nachzuweisen. Die Nachteile dieser Methode waren allerdings ihre hohe Störanfälligkeit und die unsicheren Resultate bei der Frage nach einer Anlageträgerschaft (Prämutationen) [23].

Drei unabhängigen Arbeitsgruppen [24-26] gelang es, im Jahre 1991 das verantwortliche *FMR1*-Gen in Xq27.3 zu identifizieren. Sie entdeckten eine vollkommen neue Art der Mutation in Form einer Vermehrung von CGG-Trinukleotid-Repeats in der 5'-untranslatierten Region des *FMR1*-Gens. Bei Überschreiten einer kritischen Länge erfolgt eine Methylierung der Promotorregion des Gens, dessen Transkription dadurch unterdrückt wird. Das Krankheitsbild konnte nun durch den Nachweis der CGG-Expansion sicher molekulargenetisch diagnostiziert werden.

1.2.2 Pathogenese und Erbgang

Bei 99% der Patienten mit FraX lässt sich eine CGG-Repeatexpansion im Bereich des *FMR1*-Gens nachweisen. Bei weniger als 1% betrifft die Mutation das Gen selbst (siehe 4.2.3).

In der Durchschnittsbevölkerung besteht das CGG-Repeat aus 6-40 Einheiten (durchschnittlich 30 Einheiten). Bei über 200 Repeats kommt es zum Vollbild der Erkrankung. Verlängerungen von 50-200 Repeats werden als Prämutationen bezeichnet. Diese zeigen die Tendenz, sich in der Meiose weiter zu verlängern und eine Vollmutation auszubilden. Ein Auslösemechanismus für die Repeatverlängerung ist bislang nicht bekannt. Sicher ist aber, dass sie ausschließlich in der weiblichen Meiose stattfindet.

Schon in den ersten Publikationen [19, 20] wird auf das bevorzugte Auftreten des FraX in der männlichen Bevölkerung hingewiesen. Innerhalb betroffener Familien scheinen die Patienten über ihre wesentlich schwächer betroffenen oder asymptomatischen Mütter miteinander verwandt zu sein. Somit wurde auf einen X-chromosomal rezessiven Erbgang geschlossen. Doch schon bald zeigten sich Ausnahmen vom klassischen Vererbungsmuster. Es fanden sich folgende Abweichungen:

- Klinisch gesunde Männer können das Krankheitsbild über ihre Töchter an ihre Enkel vererben [27]. Diese Männer sind Träger von Prämutationen, die bei ca. 20% der Anlageträger vorkommen. Die Manifestationswahrscheinlichkeit (Penetranz) nimmt in den folgenden Generationen zu. In die Literatur ging dieses Phänomen unter dem Namen „Sherman paradox“ ein [28].
- Bei betroffenen Frauen kann die Symptomatik sehr unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Pathophysiologisch wird die mentale Retardierung Betroffener auf den Verlust oder Mangel des *FMR1*-Proteins (FMRP, FraX-mentales-Retardierungs-Protein) zurückgeführt. Das FMRP ist ein RNA-bindendes Protein, das eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Synapsen im Gehirn spielt. Durch Hypermethylierung der Promotorregion bedingtes Fehlen dieses Proteins bei Vollmutationsträgern führt zur Missregulation von mRNA, die für entscheidende Hirnfunktionen verantwortlich ist [29].

An *FMR1*-Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit des Proteins eine erhöhte Aktivität metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR-Gruppe I, Typ 5) vorliegt. Zurzeit befindet sich eine daraus abgeleitete mGluR-Therapie in der Entwicklung. Hierauf basiert die Hoffnung, eine medikamentöse Beeinflussung der kognitiven Defizite zu erreichen [30].

1.2.3 Diagnostik

Goldstandard der Labordiagnostik ist heute der Nachweis der CGG-Repeatexpansion mittels Southern-Blot (SB)-Analyse. Als einzige Technik erlaubt sie den sicheren Nachweis von Vollmutationsallelen, Mosaiken und großen Prämutationsallelen.

Die weniger aufwändige PCR eignet sich vor allem zur Darstellung von kleineren Prämutationsallelen. Vollmutationen und besonders Mosaik können mit dieser Methode jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

1.2.4 Epidemiologie

Es zeigen sich große Unterschiede in den Häufigkeitsangaben. Populationsgenetische Studien gehen heute von einer Prävalenz der Prämutation von 1:246 bis 1:468 für Frauen und 1:1000 für Männer aus. Die Häufigkeit von Vollmutationen liegt zwischen 1:3717 und 1:8918 [31].

1.2.5 Klinische Symptomatik und Score-Systeme

Charakteristische Muster aus körperlichen Zeichen sowie Sprach- und Verhaltensauffälligkeiten machen eine klinische Diagnostik grundsätzlich möglich.

Symptome bei Trägern einer Vollmutation

Kleinkinder fallen vor allem durch leicht erhöhte Geburtsmaße mit relativ großem Kopf auf. Darüber hinaus kann eine leichte Hypotonie bestehen. Bei allen Kleinkindern mit einer Entwicklungsretardierung sollte die Diagnose FraX erwogen werden, vor allem wenn eine Sprachentwicklungsverzögerung (SEV) im Vordergrund steht [32]. Bei Schulkindern wird der Entwicklungsrückstand oft deutlicher.

Folgende Auffälligkeiten sollten außerdem an ein FraX denken lassen:

- Motorische Veränderungen wie breitbasiger Gang
- Sprech- und Sprachstörungen oder Perseveration (beharrliches Wiederholen von Wörtern)
- Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität, Aufmerksamkeitsstörungen und Manierismen (bizarre Bewegungsabläufe), manchmal auch Selbstmutilation (selbst verletzendes Verhalten) und autistische Verhaltenszüge

In der Pubertät kommt es meist zu einer Reduzierung der Hyperaktivität. Körperliche Auffälligkeiten, wie große Ohren und ein längliches Gesicht mit prominentem Kinn, werden deutli-

cher. Auch ein Makroorchidismus (pathologische Vergrößerung der Testes) ist bei älteren Patienten typisch für dieses Krankheitsbild.

Bei erwachsenen Patienten ist eine Blickdiagnose oft durch die folgende Trias möglich [32]:

- langes schmales Gesicht
- große abstehende Ohren
- Makroorchidismus

Behandlungsbedürftige medizinische Probleme oder Fehlbildungen treten bei den Betroffenen in der Regel nicht auf. Gelegentlich besteht eine Neigung zu Otitiden, Sinusitiden oder Weitsichtigkeit. Die hauptsächliche klinische Problematik besteht in den Verhaltensauffälligkeiten und der mehr oder weniger stark ausgeprägten mentalen Retardierung [32, 33].

Bei weiblichen Patientinnen mit einer Vollmutation ist die Diagnostik aufgrund einer größeren Variabilität der klinischen Merkmale wesentlich schwieriger. Das komplette Spektrum von völliger Symptombefreiheit bis hin zu einer mentalen Retardierung ist möglich. Körperliche Besonderheiten fallen bei ihnen eher selten auf. Häufiger kommt es zu Lernbehinderungen, wobei vor allem im mathematischen Bereich oft Defizite auftreten. Bei etwa 70% liegt der IQ unter 85, bei ca. 25% unter 70, d.h. im Bereich einer mentalen Retardierung [34].

Symptome bei Trägern einer Prämutation

Die Prämutationsallele bei Frauen sind unterschiedlich groß. Die Länge der CGG-Repeatexpansion ist entscheidend für das Risiko des Auftretens einer Vollmutation bei den Nachkommen [32, 33]. Bei weniger als 60 Repeats wurde bislang noch nicht beobachtet, dass bereits in der nächsten Generation eine Vollmutation auftrat. Im Bereich zwischen 60 und 100 Repeats steigt das Risiko für Nachkommen mit einer Vollmutation jedoch auf fast 100% an [35].

Trägerinnen einer Prämutation haben meist keine Entwicklungsdefizite oder körperliche Auffälligkeiten. Von besonderer Bedeutung für die Frauen ist das vermehrte Auftreten einer vorzeitigen Ovarialinsuffizienz (POF) mit frühzeitiger Menopause. Eine POF ist bei ca. 33% der Trägerinnen von Prämutationen beschrieben worden [36].

Männer mit Prämutationen zeigen in der Regel keine klinischen Auffälligkeiten. Bei 20% kommt es im 6. Lebensjahrzehnt zu neurologischen Auffälligkeiten wie Intentionstremor und Gangataxie. Dieses Bild wird als „Fragiles-X-assoziiertes Tremor-Ataxie-Syndrom“ (FXTAS) bezeichnet. FXTAS kann manchmal auch bei Frauen beobachtet werden, ist bei ihnen aber wesentlich seltener [37].

Die klinische Manifestation ist also sehr variabel und körperliche Merkmale sind vor allem im Kindesalter oft wenig spezifisch. Daher werden seit einigen Jahren Versuche unternommen, Score-Systeme und Checklisten, basierend auf klinischen Charakteristika, zu etablieren, die die Zuordnung erleichtern sollen [38-41]. Im Anhang (A1) befindet sich eine Gegenüberstellung der vier dieser Arbeit zugrunde liegenden Systeme.

1.3 Ausgewählte Differentialdiagnosen zum Fragilen-X-Syndrom

Wie bereits erwähnt, gibt es viele Differentialdiagnosen zum FraX. Die unspezifische klinische Symptomatik des FraX bei jungen Patienten erschwert oft deren Abgrenzung. Grundsätzlich sollten differentialdiagnostisch ein Sotos-Syndrom, ein Prader-Willi-Syndrom, Autismus oder ein Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom in Betracht gezogen werden. Gegenwärtig gelingt es mittels Array-CGH, neue Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndrome nachzuweisen, die ebenfalls als mögliche Differentialdiagnosen berücksichtigt werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf das Prader-Willi-Syndrom und Mikrodeletionssyndrome gelegt.

1.3.1 Das Prader-Willi-Syndrom

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS), auch Prader-Labhard-Willi-Syndrom genannt, wurde im Jahre 1956 erstmals von den drei Schweizer Pädiatern und Endokrinologen *Prader*, *Labhard* und *Willi* beschrieben [42]. Es tritt mit einer Häufigkeit von 1:15.000 bis 1:20.000 auf.

Das PWS ist eine sehr variable genetische Erkrankung. Es kann durch verschiedene genetische und epigenetische Mechanismen, die den langen Arm (q) von Chromosom 15 betreffen, bedingt sein und stellt ein klassisches Beispiel für eine Störung der genomischen Prägung (Imprinting) dar. In 70% der Fälle ist es durch eine Deletion der väterlichen Chromosomenregion 15q11.2 und in über 20% durch eine maternale uniparentale Disomie (UPD) des Chromosoms 15 verursacht. Bei einer UPD liegen zwei homologe Chromosomen vom gleichen Elternteil vor. Bei der maternalen UPD stammen beide Chromosomen, in diesem Fall beide Chromosomen 15, von der Mutter, während das entsprechende paternale Chromosom fehlt. Bei knapp 1% der Betroffenen finden sich Mutationen im Imprintingcenter [43].

1.3.1.1 Klinik

Das PWS betrifft multiple Körperfunktionen und –organe. Hauptmanifestationen sind eine zentrale Hypotonie, die beim Neugeborenen zu Fütterungsproblemen führen kann, milde bis mittelschwere mentale Retardierung, Hypogonadismus, Wachstumshormonmangel mit Kleinwuchs, Hyperphagie mit Adipositas ab dem Kleinkindalter sowie charakteristische Dysmorphiezeichen und Verhaltensauffälligkeiten [44]. Typische Dysmorphiezeichen, die vor allem im Zusammenhang mit einer Deletion auftreten, sind ein schmaler bifrontaler Kopfdurchmesser, ein schmaler Nasenrücken und eine dünne Oberlippe.

Abgesehen von der MR scheinen Patienten mit PWS und FraX auf den ersten Blick nicht viel gemeinsam zu haben. In der Literatur wird jedoch von diversen Patienten berichtet, die zunächst aufgrund ihres Aussehens auf das PWS getestet wurden, bei denen letztendlich aber ein FraX diagnostiziert wurde [45]. Die beschriebenen Patienten sind extrem adipös, haben ein rundes Gesicht, kleine Hände und Füße und regionale Hyperpigmentierungen der Haut. Im Gegensatz zu typischen Patienten mit einem PWS sind sie jedoch nicht hypoton und die starke Gewichtszunahme scheint nicht mit einer Hyperphagie im Zusammenhang zu stehen. Vielmehr zeigen die Betroffenen FraX-typische Verhaltensweisen wie wenig Augenkontakt, hyperaktives Verhalten mit kurzer Aufmerksamkeitsspanne und SEV.

Bei den von *de Vries* [45] beschriebenen Patienten wurden Vollmutationen im *FMR1*-Gen gefunden, jedoch keine zusätzlichen genetischen Veränderungen, die den atypischen Phänotyp erklärt hätten. Später wurden bei einigen FraX-Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp Deletionen im *FMR1*-Gen nachgewiesen [46] (siehe 4.3.2). Diverse Autoren forderten daraufhin, entsprechende Patienten mit PWS-Phänotyp ohne typische Veränderungen in der Methylierungsanalyse auf das Vorliegen eines FraX zu testen [45, 47].

Zusammenfassend gibt es also Überlappungen zwischen den beiden Syndromen, die bei Ausschluss des einen Syndroms an das Vorliegen des jeweils anderen Syndroms denken lassen.

1.3.1.2 Diagnostik

Der erste Schritt bei Verdacht auf ein PWS ist meist eine Methylierungsanalyse des *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N)-Gens. Dieses wird nur auf dem väterlichen Chromosom 15 exprimiert, da es dort am 5'-Ende unmethyliert vorliegt. Mittels Methylierungsanalyse können Deletionen, UPD und Fehler im Imprintingcenter entdeckt werden. Aus positiven Ergebnissen lässt sich aber nicht schließen, welche Art des Defektes beim jeweiligen Patienten vorliegt. Zur genaueren Differenzierung schließen sich dann gegebenenfalls Mikrosatellitenanalysen, FISH- oder MLPA-Untersuchungen an. Bei negativem Befund in der Methylierungsanalyse kann ein PWS mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden [48].

1.3.2 Mikrodeletionssyndrome

Mikrodeletionen sind submikroskopische strukturelle Chromosomenaberrationen, die mit dem Verlust eines Chromosomensegments einhergehen. Sie entstehen, wenn ein submikroskopisches Stück eines Chromosoms zwischen zwei Bruchpunkten verloren geht. Die reduzierte Gendosis führt zu einer strukturellen und funktionellen Monosomie, die in manchen Fällen zu spezifischen Krankheitsbildern führen kann. Neben Stückverlusten treten auch submikroskopische Duplikationen, also Zugewinne von Chromosomenmaterial auf. Diese können ebenfalls zu charakteristischen Syndromen führen.

Neue Mikrodeletions- und -duplikationssyndrome werden heute typischerweise mittels Array-CGH entdeckt und diagnostiziert.

1.3.2.1 Mikrodeletion 16p11.2

Im Jahre 2005 wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen Autismus und einer Mikrodeletion im kurzen Arm (p) von Chromosom 16 nachgewiesen [49]. Autismus ist eine schwere Entwicklungsstörung, die die Kommunikation und das Sozialverhalten Betroffener beeinträchtigt. Außerdem besteht eine Assoziation mit repetitiven und stereotypen Verhaltensweisen. Die Prävalenz beträgt 4-11:10.000 [50, 51]. In 6% der Fälle sind Phänotypen bekannter Ätiologie wie das FraX oder die tuberöse Sklerose mit autistischen Verhaltensweisen vergesellschaftet [52].

Im Jahre 2007 konnten *Sebat et al.* die bekannte Mikrodeletion genauer auf die Position 16p11.2 eingrenzen [53]. In einer Assoziationsstudie des *Autism Genetic Resource Exchange* (AGRE) wurde nach wiederkehrenden Genkopiezahlvarianten (CNV) im Genotyp von 751 Familien mit Autismus gesucht [54]. Fünf Kinder aus vier nicht miteinander verwandten Familien waren Träger einer neu entstandenen, 593 kb großen Deletion in 16p11.2. Darunter war ein Paar zweieiiger Zwillinge, die die gleiche Veränderung trugen. Reziproke Duplikationen im gleichen Bereich wurden bei drei Familien gefunden. Auch in zwei weiteren Studienpopulationen konnten Familien mit neu entstandenen Deletionen und Duplikationen in der genannten Genregion identifiziert werden [54]. Die Studie konnte so das wiederkehrende Auftreten von *de novo* Deletionen und reziproken Duplikationen in 16p11.2 im Zusammenhang mit Autismus nachweisen. Diese Veränderungen scheinen für 1% der Fälle von Autismus ursächlich zu sein. Somit ist die *de novo* Deletion in 16p11.2 eine der bekanntesten rekurrenten genetischen Ursachen für einen Autismus [54-57].

Bei den meisten der betroffenen Patienten liegen neben dem Autismus eine Entwicklungsverzögerung mit besonderer Betonung der Sprachentwicklung und eine mentale Retardierung vor [56]. Daraus ergeben sich Überschneidungen mit dem FraX, das meist auch mit MR, SEV und gegebenenfalls autistischen Verhaltensweisen assoziiert ist.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Ätiologie mentaler Retardierung bleibt auch heute noch in vielen Fällen unklar. Es sind viele mögliche Ursachen bekannt, die oft Schritt für Schritt abgeklärt werden müssen. Ziel dieser Arbeit war es, optimale Strategien für die Identifizierung der Ursachen von MR zu beschreiben. Dafür sollten klinische Daten und Laborbefunde von mental retardierten Patienten retrospektiv ausgewertet und gezielt weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Alle untersuchten Patienten waren ursprünglich auf ein Fragiles-X-Syndrom untersucht worden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Testung wurde das Kollektiv in zwei Gruppen unterteilt: eine Gruppe mit allen Patienten, bei denen ein FraX molekulargenetisch nachgewiesen werden konnte (FraX-Positive-Patienten) und eine Gruppe, die die Patienten mit negativen Testergebnissen enthielt (FraX-Negative-Patienten).

Anhand publizierter Score-Systeme wurde zunächst ein Merkmalskatalog für das FraX erarbeitet. Alle vorliegenden Patientendaten sollten anschließend auf das Auftreten dieser Merkmale untersucht werden. Ziel war es mithilfe der Merkmalsverteilungen in den beiden Gruppen (FraX-Positive- und FraX-Negative-Patienten) das Score-System zu optimieren. Parallel sollte analysiert werden, welche Merkmale von den ärztlichen Untersuchern als relevant für die klinische Verdachtsdiagnose FraX angesehen werden. Dazu wurden einige in der Diagnostik von mentaler Retardierung tätige Ärzte anhand eines Fragebogens interviewt.

Abschließend sollten bei ausgewählten Patienten aus beiden Gruppen weitere diagnostische Schritte eingeleitet werden, um die molekularen Ursachen des jeweiligen Phänotyps besser zu beschreiben.

Labordiagnostik bei FraX-Negativen-Patienten

Aufgrund klinischer Charakteristika ausgewählte FraX-Negative-Patienten sollten auf bestimmte Differentialdiagnosen untersucht werden. Diejenigen Patienten mit besonders ausgeprägter Sprachentwicklungsverzögerung (SEV) wurden mittels FISH auf eine Mikrodeletion 16p11.2 untersucht, die in neueren Publikationen als ursächlich für einige Fälle von SEV und frühkindlichem Autismus bezeichnet wird. Darüber hinaus sollte untersucht werden ob weitere submikroskopische Chromosomenaberrationen zu Phänotypen führen können, die dem des FraX ähneln. Dazu wurden Array-CGH-Untersuchungen bei Patienten mit Phänotypen, die auf solche Mikrodeletionen hinweisen, durchgeführt. Einige Patienten mit einem BMI von > 2 SD wurden außerdem auf das Prader-Willi-Syndrom (PWS) untersucht.

Analog wurden die Kasuistiken von Patienten, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik nach Ausschluss eines FraX eine Array-CGH-Untersuchung oder Methylierungsanalyse veranlasst worden war, ausgewertet.

Labordiagnostik bei FraX-Positiven-Patienten

Bei einigen FraX-Positiven-Patienten mit besonders stark oder besonders mild ausgeprägtem Phänotyp oder auch untypischen Befunden für ein FraX sollte eine Array-CGH durchgeführt werden, um mögliche zusätzliche Störungen zu erkennen.

Konkret wurden folgende Fragestellungen und Ziele verfolgt:

- Inwiefern sind vorhandene Score-Systeme zum Screening auf ein FraX klinisch anwendbar und valide?
- Lässt sich in dem vorliegenden Patientenkollektiv ein Score-System optimieren? Kommt es bei der Anwendung zu einer sicheren Erkennung der Betroffenen und zu einer Reduktion der durchgeführten Tests?
- Welche diagnostischen Schritte sollten bei einer mentalen Retardierung mit Symptomen, die auch an ein FraX denken lassen, eingeleitet werden? Treten Mikrodeletionssyndrome häufiger auf, so dass die Array-CGH vor der Diagnostik auf ein FraX erfolgen sollte?
- Gibt es unter den Patienten mit einem FraX solche, die zusätzlich eine Mikrodeletion tragen? Trägt dies zur Variabilität des Krankheitsbildes bei?
- Spielen erst kürzlich definierte Mikrodeletionssyndrome, wie die Mikrodeletion in 16p11.2, oder eine atypische Ausprägung des Prader-Willi-Syndroms eine Rolle bei der Differentialdiagnose des FraX?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Es wurden klinische und molekulargenetische Befunde von 110 Patienten ausgewertet. Diese waren im Institut für Humangenetik und seinen kooperierenden Praxen für Humangenetik und in der Klinik für Neuropädiatrie des UKS-H Campus Kiel erhoben worden. In einigen Fällen wurden auch Untersuchungsergebnisse von anderen einsendenden Kliniken und niedergelassenen Ärzten mit einbezogen. Bei den Patienten war mit deren Einverständnis bzw. dem Einverständnis der Erziehungsberechtigten eine molekulargenetische und zytogenetische Analyse im Institut für Humangenetik durchgeführt worden. Alle ausgewählten Fälle waren in diesem Rahmen mittels Southern-Blot-Analyse auf ein FraX untersucht worden. Bei 21 der 110 Patienten hatte diese Testung einen positiven Befund erbracht, bei den übrigen 89 Patienten konnte kein FraX nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten, bei denen eine Repeatexpansion nachgewiesen wurde (im Folgenden „FraX-Positive-Patienten“), und Patienten ohne Repeatexpansion (im Folgenden „FraX-Negative-Patienten“).

Nach Abschluss der initialen diagnostischen Untersuchungen übrig gebliebene, aus Heparinblut gewonnene, PHA-stimulierte Blutlymphozyten und extrahierte DNA der Patienten waren mit deren Einverständnis im Institut für Humangenetik für weiterführende differentialdiagnostische Analysen asserviert worden.

2.1.1 Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung

Anhand der vier erwähnten Score-Systeme (Gegenüberstellung im Anhang, A1) wurde ein Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung erarbeitet (siehe Anhang, A2), mit dessen Hilfe die vorliegenden Patientenakten ausgewertet wurden.

Es wurden zunächst die meisten gemeinsamen Merkmale der zugrunde liegenden Publikationen [38-41] übernommen. Eine Gegenüberstellung dieser Score-Systeme befindet sich im Anhang (A1). Da die Augenfarbe „blau“ in Norddeutschland recht häufig ist, wurde dieses Merkmal nicht mit in den Befundbogen aufgenommen. Ein langes, schmales Gesicht wurde ebenfalls nicht berücksichtigt. Einige der Verhaltensweisen wurden zu übergeordneten Punkten zusammengefasst. Zur Beurteilung der Ohrlänge wurden die Perzentilenkurven von

Feingold et al. [58] verwendet. Als große Ohren sind Ohrlängen, die über der 97. Perzentile (> 2 SD) liegen, definiert. Das Testikularvolumen wurde mit den Perzentilenkurven von *Waller et al.* [59] beurteilt. Als Makroorchidismus ist ein Testikularvolumen oberhalb der 97. Perzentile (> 2 SD) definiert. Anhand der erhobenen Daten wurde ein für das untersuchte Kollektiv adaptiertes Score-System erarbeitet (siehe 3.1.4).

2.1.2 Ärztefragebogen

Der Befundfragebogen zur retrospektiven Datenerhebung wurde durch einige Merkmale wie Skelettfehlbildungen und angeborene Herzfehler ergänzt, die als Indikationen für eine Array-CGH gelten. Dieser erweiterte Fragebogen (siehe Anhang, A3) wurde anonym an acht in die klinische Diagnostik von FraX involvierte Ärzte verteilt, die gebeten wurden, jeweils 1-5 Punkte pro Merkmal zu vergeben. Dabei sollte „1“ für weniger wichtig und „5“ für extrem wichtig stehen. Unter den befragten Ärzten waren vier Fachärzte für Humangenetik, zwei Fachärzte für Kinderheilkunde und ein Arzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Humangenetik. Ein Arzt machte keine Angaben zu seinem Ausbildungsstand. Das Kollektiv der befragten Ärzte überschneidet sich nur geringfügig mit den Ärzten, deren Patienten molekulargenetisch untersucht worden waren.

2.2 Statistische Analysen

Die Daten wurden manuell in das computergestützte Statistikprogramm SPSS 15.0 eingegeben. Zur Bewertung von Unterschieden kategorialer Merkmale zwischen den beiden Gruppen wurden der Pearson- χ^2 -Test und der exakte Fisher-Test in Verbindung mit einer Kreuztabellenanalyse genutzt.

Der χ^2 -Test ist ein Vergleich zweier unabhängiger binomialer Anteilswerte bei großer Stichprobe und prüft in diesem Fall, ob die beiden Gruppen bezüglich der Häufigkeit der einzelnen Merkmale übereinstimmen.

Wenn die Voraussetzungen für die Approximation der Prüfverteilung durch eine χ^2 -Verteilung nicht erfüllt, wurde der exakte Fisher-Test herangezogen. Dieser vergleicht zwei unabhängige binomiale Anteilswerte bei kleiner Stichprobe. Er heißt „exakt“, weil der p-Wert als Prüfgröße genau berechnet und nicht durch Approximation bestimmt wird.

Bei größerer Variabilität der Werte (ordinal skalierte Merkmale) wurde der Wilcoxon-Test, ein Rangsummentest, verwendet. Dieser Test setzt keine bestimmte Verteilungsform der Merk-

male voraus. Die Prüfgrößen werden nicht anhand ihrer Originalmesswerte, sondern aus deren Rangzahlen berechnet [60]. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant bezeichnet.

Die statistischen Analysen erfolgten mit freundlicher Unterstützung durch das Institut für medizinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

2.3 Labormethoden – Materialien

Im Folgenden werden die zur Durchführung der Array-CGH, der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und der Methylierungsanalyse verwendeten Materialien und Geräte sowie deren Hersteller genannt. Allgemein übliche Laborgeräte, wie Objektträger oder Küvetten, sind nicht aufgeführt.

2.3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien; Reagenzien und Hersteller

Reagenz	Hersteller/Firma, Ort, Land
Acetonitril	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
AmpliTaQGold Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Brom-Phenol Blau	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Cot-1-DNA, humane	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cyanine 5-dUTP Cyanine 3-dUTP	Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octane)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-2HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Dextransulfat 40%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNA-Marker Tri Dye 100bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
2,5 mM dNTP mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dUTP-Spectrum Green	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
dUTP-Spectrum Orange	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fixogum Kleber	Marabu, Tamm, Deutschland
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GIBCO	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol Reagent Plus	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fortsetzung **Tabelle 2:** Chemikalien und Verbrauchsmaterialien; Reagenzien und Hersteller

IGEPAL	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lauril; N-Lauroylsarcosine sodium salt solution 20%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Microcon YM Centrifugal Filter Devices	Millipore Corporation, Schwalbach, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Natriumacetatlösung; Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg, Deutschland
PB-MAX Karyotyping Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease I 250ng	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
Proteasepuffer VP2000	Abbott Vysis, Wiesbaden, Deutschland
Puffer C für Restriktionsenzyme	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzym ALU I	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzym RSA I	Promega, Mannheim, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sea Kem LE Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
SSPE 20x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Stabilization & Drying-Solution	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Titriplex III	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3.2 Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits und Hersteller

Kit	Hersteller/Firma, Ort, Land
Agilent Hybridisierungs Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Bio Prime Array-CGH Genomic Labeling Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bio Prime DNA-Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
CpG WIZ Prader-Willi/Angelman Amplification Kit	Chemicon International, Billerica, USA
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
EpiTect Biusulfite Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Human Genome CGH 105A Oligo Microarray Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Phase Prep BAC DNA Kit (Midi Version)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.3.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen/Puffer und Ansätze

Lösung/Puffer	Ansatz
Agarose-Gel 2%	2 g Sea Kehl LE Agarose 50 ml TBE-Puffer
Antifade <i>Gebrauchslösung bei 4°C lichtgeschützt lagern bei -20°C für mehrere Monate lagerbar</i>	1,15 g DABCO 4 ml Aqua dest. 1 ml 1M Tris HCl pH 8,0 45 ml Glycerin auf Magnetrührer mischen in 5 ml Portionen in 50 ml Schraubröhrchen abfüllen

Fortsetzung **Tabelle 4:** Lösungen/Puffer und Ansätze

Carnoy's-Fixativ für Zellen	Methanol/Eisessig im Verhältnis 3 :1
Chloramphenicol 40 mg/ml	400 mg Chloramphenicol in 10 ml 100%igem Ethanol lösen
DAPI-Stammlösung <i>bei -20°C lagern</i>	0,2 mg DAPI pro ml Aqua dest. z.B. 10 mg DAPI in 50 ml Aqua dest. lösen
DAPI-Gebrauchslösung	500 µl DAPI-Stammlösung in 500 ml 2x SSC geben
Desoxynucleosid-Lösung 5mM je Nukleotid <i>bei -20°C lagern</i>	100 µl dNTP (100mM) 1600 µl Aqua dest.
EDTA-Lösung 0,5M pH 8,0	186,1 g Titriplex III in 800 ml Aqua dest. dazu 20 g Natriumhydroxid Plätzchen auf pH 8,0 einstellen 1000 ml Aqua dest. zugeben
LB-Medium <i>bei 4°C lagern</i>	20 g LB Broth Base in 1000 ml Aqua dest. lösen autoklavieren
Gel-Loading-Puffer	125 mg Bromphenolblau 28,7 g Glycerin mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
Mastermix 50% <i>bei -20°C lagern</i>	2,5 ml deionisiertes Formamid 1,25 ml Dextransulfat 40% 0,5 ml 20 x SSC 0,25 ml Aqua dest.
3M NaAc, pH 5,0	40,82 g Natriumacetat-Trihydrat in 80 ml Aqua dest. lösen mit Natronlauge auf pH 5,0 einstellen mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
Paraformaldehydlösung 1% <i>bei 4°C lichtgeschützt lagern</i>	10 g Paraformaldehyd 1000 ml Aqua dest. auf Heizplatte bis zur vollständigen Lösung er- wärmen
PBS (Phosphat Buffered Saline)	6,1 g Di-Natriumhydrogenphosphat 80 g Natriumchlorid 2 g Kalium-Dihydrogenphosphat 2 g Kaliumchlorid in Aqua dest. lösen auf pH 7,3 einstellen mittels Natronlauge bzw. Salzsäure mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
Proteaselösung <i>ca. 1 Woche lagerbar</i>	1 Röhrchen Protease in 500 ml Proteasepuffer lösen
SSC-Lösung (20x)	175,3 g NaCl 88,2 g Na3Citrat in 800 ml Aqua dest. lösen mit 1M HCl auf pH 7,0 einstellen mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
SSC 2x	20x SSC 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
TBE 10x	108 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 55 g Borsäure 40 ml 0,5M EDTA pH 8,0 1000 ml Aqua dest.
TBE 1x	TBE 10x 1:10 verdünnen
TE-Puffer	2,5 ml 1M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 500 µl 0,5M EDTA-Lösung pH 8,0 250 ml Aqua dest. evtl. autoklavieren

Fortsetzung **Tabelle 4:** Lösungen/Puffer und Ansätze

Tris-HCl-Puffer 1M pH 8,0	60,55 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 400 ml Aqua dest. lösen pH mit 2M HCl einstellen 500 ml Aqua dest. zugeben
Waschlösung I für FISH	20 ml 20 x SSC 3 ml Igepal mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
Waschlösung II für FISH	100 ml 20 x SSC 1000 µl Igepal mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
Waschpuffer I	50 ml 20 x SSPE 500 µl Lauril mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen
Waschpuffer II	5 ml 20 x SSPE 250 µl Lauril mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

2.3.4 FISH-Sonden

Es wurden eigene Sonden für die FISH verwendet, die von ausgewählten *Escherichia coli*-Bakterienstämmen aus *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) hergestellt wurden. BACs sind künstliche Chromosomen, die durch Einschleusung von klonierter humaner DNA in das Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) des Bakteriums entwickelt wurden. Dieses F-Plasmid ist für die Fähigkeit von Bakterien zum horizontalen Gentransfer (Konjugation) entscheidend.

Die Auswahl der BACs erfolgte anhand der Datenbank des Human Genome Browser [61]. Ausgewählte Klone wurden von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

In Tabelle 5 sind die BAC-Klone, ihre Lokalisation auf dem betreffenden Chromosom, ihre Länge und die in diesem Bereich liegenden Gene dargestellt.

Tabelle 5: Sonden für die FISH

Sonde	Lokalisation	Farbe	Größe (bp) und Lage von 16pter in bp	Gene/Marker
CTD-2515O10	16p11.2	Grün (Sgr)	157.474 29,850,774 – 30,008,247	<i>IMAA</i> <i>TMEM219</i> <i>TAOK2</i> <i>HIRIP3</i> <i>INO80E</i> <i>DOC2A</i> <i>FLJ00210</i> <i>ALDOA</i> <i>PPP4C</i> <i>FLJ25404</i> <i>FAM57B</i> <i>AKO97527</i>
RP11-727C18	16p13.13	Rot (So)	189.450 10,388,641 – 10,578,090	<i>ATF7IP2</i> <i>EMP2</i>

CTD = CalTech human BAC library D; RP11 = Roswell-Park (Cancer Institute), Klonbibliothek 11; Sgr = *spectrum green* (grüne Fluoreszenz); So = *spectrum orange* (rote Fluoreszenz)

2.3.5 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller/Firma, Ort, Land
Bio Doc Analyze Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
Biometra T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Brutschrank: Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dichtungsobjektträger; Gasket slides	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Electrophoresis power supply ST 606	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage MC1 620P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filtersätze	AHF Analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland
Gen Pix 4000B Microarray Reader	Axon Instruments, Sunnyvale, USA
Heizblock: Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungskammer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Hybridisierungsofen	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Inkubator für Zellkulturen	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Magnetrührer	Ikomag, Lübeck, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Mini horizontal submarine unit HE33	Amersham Biosciences, Little Chalfont, England
Nano Drop: ND-1000 Spektrophotometer	PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex: Vortex-Genie 2	Scientific Industries, München, Deutschland
Microm VP 2000 Processor	Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 1 und 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop M 35	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifugen	
Biofuge 22R	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Biofuge primo R Thermo Scientific	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Hettich Rotanta/K und Mikro200	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	Thermo-Electron-Corporation, Chateau-Gontier, Frankreich
Jouann RC1010	Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA
PicoFuge	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sorvall Super T21 Zentrifuge	

2.3.6 Software

Tabelle 7: Software

Software	Hersteller/Firma, Ort, Land
CGH Analytics Workstation G4172AANFP	Agilent Technology, Waldbronn, Deutschland
CGH Analytics v3.5.14	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Feature Extraction v9.5	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GenPix pro 6.1	Axon Instruments, Sunnyvale, USA
GeneScan Analysis Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
ISIS 3.0 Software	MetaSystems, Altusheim, Deutschland
IKAROS Software	MetaSystems, Altusheim, Deutschland
NanoDrop Software Version 3.2.1	PEQLab, Erlangen, Deutschland

2.4 Labormethoden – Prinzip und Durchführung

2.4.1 Array basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

2.4.1.1 Auswahl der Patienten für die Array-CGH

Für eine Array-CGH wurden aus dem Kollektiv der FraX-Negativen-Patienten fünf Fälle ausgewählt, die besonders typisch für ein FraX erschienen (Nr. 21, 24, 38, 46 und 51; die entsprechenden Scorewerte können der Darstellung des Patientenkollektivs im Anhang entnommen werden, A4).

Zusätzlich wurden die Kasuistiken von 28 Patienten aus dem Kollektiv, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik [62] im Institut für Humangenetik bereits eine Array-CGH-Untersuchung erfolgt war, hinsichtlich der Fragestellung der vorliegenden Arbeit ausgewertet.

Darüber hinaus wurde auch bei vier Patienten mit nachgewiesenem FraX, die besonders stark oder besonders mild ausgeprägte Symptome bzw. untypische Befunde zeigten, eine Array-CGH durchgeführt, um mögliche zusätzliche Störungen zu erkennen (Nr. 11, 14, 15 und 19).

2.4.1.2 Prinzip der Array-CGH

Die Matrix (gebräuchlich: Array) basierte vergleichende genomische Hybridisierung (CGH = comparative genomic hybridization) ist ein hochauflösendes Verfahren zum Nachweis von Zugewinnen (Duplikationen) oder Verlusten (Deletionen) im Genom. Sie beruht auf der Basenpaarung von Patienten-DNA mit DNA-Fragmenten, die auf der Oberfläche eines Objektträgers immobilisiert wurden. Der Begriff „Array“ bezieht sich auf die regelmäßige rasterförmige Anordnung der DNA-Fragmente.

Es wird die Fluoreszenzintensität zweier genomischer DNA-Proben verglichen. Dazu werden gleiche Mengen Patienten- und Referenz-DNA, die unterschiedlich mittels Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kohybridisiert [63]. Üblicherweise wird Test-DNA rot und Referenz-DNA grün markiert. Veränderungen in der Patienten-DNA führen zu Farbverschiebungen des Fluoreszenzsignals der betroffenen Fragmente. So erscheinen zum Beispiel Regionen, die in der zu testenden DNA durch eine Duplikation überrepräsentiert sind, intensiv rot. Im Gegensatz dazu führt eine in der Test-DNA unterrepräsentierte Region, wie im Falle einer Deletion, zu geringerer Intensität roter Fluoreszenz. Diese Fluoreszenzintensitätsverhältnisse können

mit Computerprogrammen exakt quantifiziert und der genauen Region auf einem Chromosom zugeordnet werden.

So stellt die Array-CGH ein Screeningverfahren dar, mit dem das gesamte Genom auf Deletionen und Duplikationen untersucht werden kann [64]. Balancierte Veränderungen, wie zum Beispiel Translokationen oder Polyploidien, sind hingegen nicht nachweisbar [65].

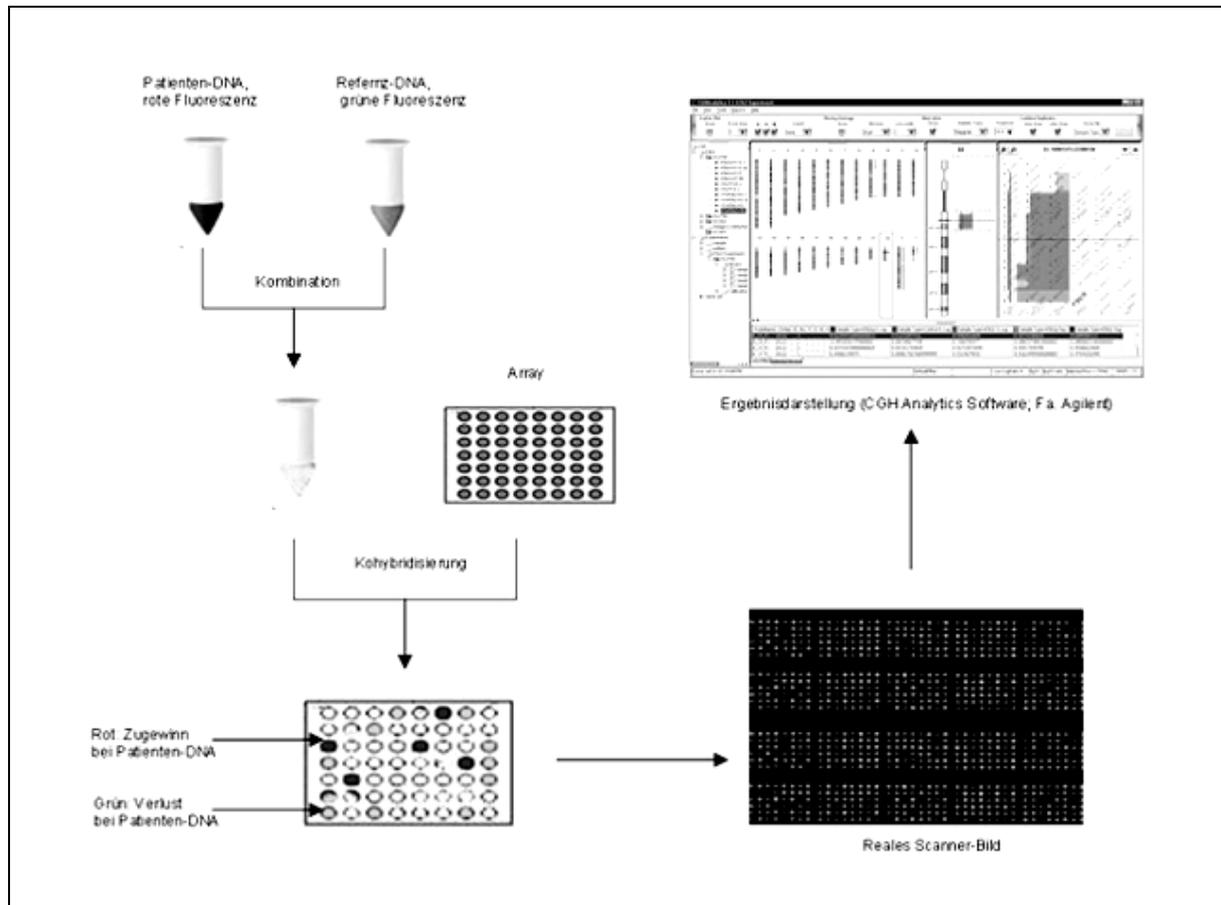


Abb. 1: Schematische Darstellung der Array-CGH [66]; Referenz-DNA ist grün markiert, die Patienten-DNA rot; Verluste (Deletionen) von Patienten-DNA führen zu vermehrter grüner Fluoreszenz, Zugewinne (Duplikationen) von Patienten-DNA zu vermehrter roter Fluoreszenz.

2.4.1.3 Durchführung

Verdau

Zuerst erfolgte der Verdau der bereits extrahiert vorliegenden Patienten-DNA sowie der gleichgeschlechtlichen Kontroll-DNA. Die DNA wurde jeweils im Institut für Humangenetik nach Standardmethoden aus peripherem Blut isoliert.

Für den Verdau wurde 1 µg der jeweiligen DNA mit Aqua dest. auf 20,2 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 2,6 µl Puffer C für Restriktionsenzyme, 0,5 µl Restriktionsenzym *Rsa I*, 0,5 µl Restriktionsenzym *Alu I*, 0,2 µl BSA (acetyliert) sowie 2,0 µl Nuklease-freiem Wasser wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

DNA-Markierung

Für die Farbmarkierung der DNA wurde das Bio-Prime-Array-CGH-Genomic-Labeling-Kit verwendet.

Zur verdauten DNA wurden 20 µl 2,5x Random-Primer gegeben und für 5 Minuten im Wasserbad bei 100°C inkubiert. Anschließend kühlte die DNA für mindestens 1 Minute auf Eis. Nun wurden 5 µl 10x dUTPs hinzugefügt. Im abgedunkelten Raum wurden 3 µl der sehr lichtempfindlichen Cy5-markierten-dUTP in das Eppendorfhütchen mit der zu untersuchenden DNA pipettiert bzw. 3 µl Cy3-markierter-dUTP in das Eppendorfhütchen der Referenz-DNA. Danach wurde 1 µl des auf Eis aufbewahrten Exo-Klenow hinzugefügt, bevor die DNA für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. 5 µl Stopp-Puffer beendeten die Inkubation.

Aufreinigung der markierten DNA

In jedes Eppendorfhütchen wurde 400 µl 1x TE-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 gegeben, die Suspension in eine Microcon-YM-30-Filter-Säule umgefüllt und bei 9.000 U/min für 8 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Filter umgedreht, in neue, beschriftete Eppendorfhütchen mit abgeschnittenem Deckel gesteckt und bei 9.000 U/min 1 Minute lang zentrifugiert. Die Hütchen enthielten nun eine relativ kleine Menge gereinigter DNA. Die Farbkorporation der sich in der Spitze der Eppendorfhütchen befindenden DNA wurde nach Nullabgleich mit Aqua dest. am Nano Drop mithilfe der Nano-Drop-Software photometrisch gemessen.

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchende DNA und die Referenz-DNA miteinander vermischt, dazu 400 µl 1x TE-Puffer (pH 8) pipettiert und diese Suspension in die Microcon-Filter-Säulen gegeben. Nach 8 Minuten Zentrifugation bei 9.000 U/min wurden die Filter umgedreht, in neue, beschriftete Eppendorfhütchen mit abgeschnittenen Deckeln gesteckt und erneut für 1 Minute bei 9.000 U/min zentrifugiert.

Nach dem Messen des Volumens der kombinierten DNA wurde das Volumen mit Aqua dest. auf 91,5 µl aufgefüllt und 28,8 µl Human-Cot-1-DNA, 30 µl Agilent-10x-blocking-agent sowie 148,5 µl Agilent-2x-hybridization-buffer hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 298,8 µl entstand.

Daraufhin erfolgte die Inkubation zuerst für 3 Minuten in einem bereits auf 100°C vorgeheizten Wasserbad und dann für 30 Minuten in einem Heizblock bei 37°C.

Montage der Objektträger zur Hybridisierung

Nachdem der Dichtungsobjektträger mit der Aufschrift „Agilent“ nach oben in die Hybridisierungskammer eingelegt wurde, wurden die 298,8 µl der aufbereiteten DNA möglichst luftblasenarm in die Gummidichtung eingefüllt. Anschließend wurde der Objektträger mit der 105K-

Plattform mit dem Barcode nach oben auf den Dichtungsobjektträger gelegt, die Hybridisierungskammer zugedeckelt und der Schraubenverschluss kräftig zuge dreht.

Zur Hybridisierung wurde die Hybridisierungskammer in den Rotor des Hybridisierungsofens eingesetzt und dort für 40-48 Stunden bei 16 U/min in 65°C belassen.

Waschvorgang mit anschließender Ozonstabilisierung und Trocknung

Bereits am Vortag mussten die Wasch-Puffer angesetzt werden. Das Waschen der Arrays erfolgte unter dem Abzug.

Die heißen Hybridisierungskammern wurden aus dem Hybridisierungsofen geholt, das Array-Dichtungsobjektträger-Sandwich aus der Hybridisierungskammer entnommen und in den Waschpuffer I gehalten. Im Waschpuffer wurde das Sandwich dann vorsichtig voneinander gelöst und der Objektträger mit dem Barcode in einen in der Waschlösung I befindlichen Objektträgerhalter gestellt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass der Objektträger ständig mit Waschlösung I benetzt war. Der Objektträgerhalter wurde für 5 Minuten in der Waschlösung I belassen und anschließend möglichst zügig in die Waschlösung II transferiert, in der er für 2 Minuten belassen wurde.

Anschließend wurde der Objektträgerhalter für 1 Minute in Acetonitril gestellt, gefolgt von 30 Sekunden in Stabilisation & Drying-Solution. Aus dieser wurde der Objektträger nach Ablauf der Zeit vorsichtig herausgezogen, aus der Halterung genommen, am Rand abgetupft und in Falconröhrchen gesteckt, die mit Alufolie umwickelt waren, um die Präparate vor Licht zu schützen.

Einscannen

Die Objektträger wurden mit dem Barcode nach oben in einen speziellen Scanner (GenePix-4000B-Microarray-Reader) gelegt und mit einer Auflösung von 5 µm/Pixel eingescannt.

Auswertung am Computer

Es wurden 105K-Arrays verwendet mit etwa 99.000 60-mer Oligonukleotiden pro Array. Das menschliche Genom umfasst etwa 3.200 Mb. Dividiert man diesen Wert durch die Anzahl der Oligonukleotide auf dem Array, erhält man die theoretische Auflösung. Sie liegt im Falle eines 105K-Arrays bei 0,03 Mb. Nach laborinternen Standards wurden nur Regionen als aberrant gewertet, in denen 10 benachbarte Marker verändert waren. Somit muss die theoretische Auflösung mit zehn multipliziert werden, um die tatsächliche Auflösung zu erhalten. Folglich lässt sich für die 105K-Arrays eine Auflösung von 0,3 Mb für die Detektion chromosomaler Aberrationen errechnen.

Die Messung der Signalintensität der eingescannten Bilder sowie deren Auswertung erfolgte mithilfe einer speziellen Software (FE-Extraction-und-CGH-Analytics-Version-3.4.27).

2.4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

2.4.2.1 Auswahl der Patienten für die FISH

Es wurden 19 Patienten (siehe Anhang, A4) mit besonders ausgeprägter Sprachentwicklungsverzögerung (SEV) mittels FISH auf eine Mikrodeletion 16p11.2 untersucht. Diese wird in neueren Publikationen als ursächlich für ca. 1% der Fälle von SEV und frühkindlichem Autismus bezeichnet [53-56] (siehe 1.3.2.1). Proben der ausgewählten Patienten waren bereits mittels FISH auf Deletionen und Duplikationen in folgenden Regionen untersucht worden: 7q11.23 (Williams-Beuren-Region), 17p11.2 (Smith-Magenis Region), 22q11.21 (DiGeorge-Region), 22q13.33 (Phelan-McDermid-Region) sowie 16p12.1 und 18p11.21 [67].

2.4.2.2 Prinzip der FISH

Mittels FISH können gezielt Chromosomenregionen dargestellt werden. Sie beruht auf der Basenpaarung von markierten einzelsträngigen DNA-Sonden mit ihren komplementären Zielsequenzen in der zu untersuchenden chromosomalen DNA.

Ein Vorteil gegenüber den traditionellen Bänderungstechniken ist die Möglichkeit, Chromosomen in allen Phasen des Zellzyklus, also auch während der Interphase, darzustellen. Mittels FISH können Veränderungen von 0,1 Mb und weniger [64] nachgewiesen werden.

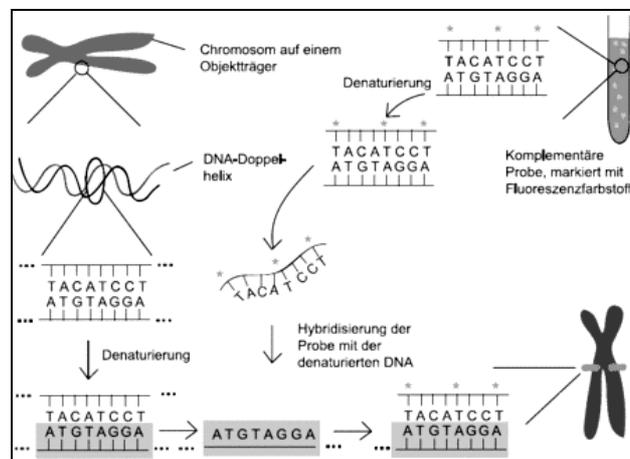


Abb. 2: Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosomenpräparaten [68]

Bei der verwendeten „direkten Methode“ werden die Sonden direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Es entsteht dann unter Anregung ein Fluoreszenzsignal am Ort („In Situ“) der Bindung („Hybridisierung“). Die fluoreszierenden gebundenen Sonden können mithilfe von Mikroskopen, die mit speziellen Filtern ausgerüstet sind, detektiert werden.

2.4.2.3 Funktionsweise der verwendeten Sonden

Die Sonde CTD-2515O10 bindet komplementär an die Chromosomenregion 16p11.2. Sie wurde mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff angefärbt. Die rot angefärbte Sonde RP11-727C18 bindet an die Region 16p13.13.

In einem normalen Interphasekern liegen beide Regionen auf beiden Chromosomen 16. Im Normalfall sind pro Interphasekern folglich zwei rote und zwei grüne Signale erkennbar. In der Metaphase liegen die Chromosomen als 2-Chromatid-Chromosomen vor, da die Chromatiden bereits verdoppelt wurden, aber noch im Bereich der Zentromere zusammengehalten werden. Eine regelrechte Signalkonstellation ist in diesem Fall das Vorliegen von je einem grünen und einem roten Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16.

Fehlt ein grünes Signal im Interphasekern, bzw. liegt nur auf einem Chromosom 16 ein grünes Doppelsignal im Metaphasekern vor, spricht das für eine Deletion im untersuchten Bereich.

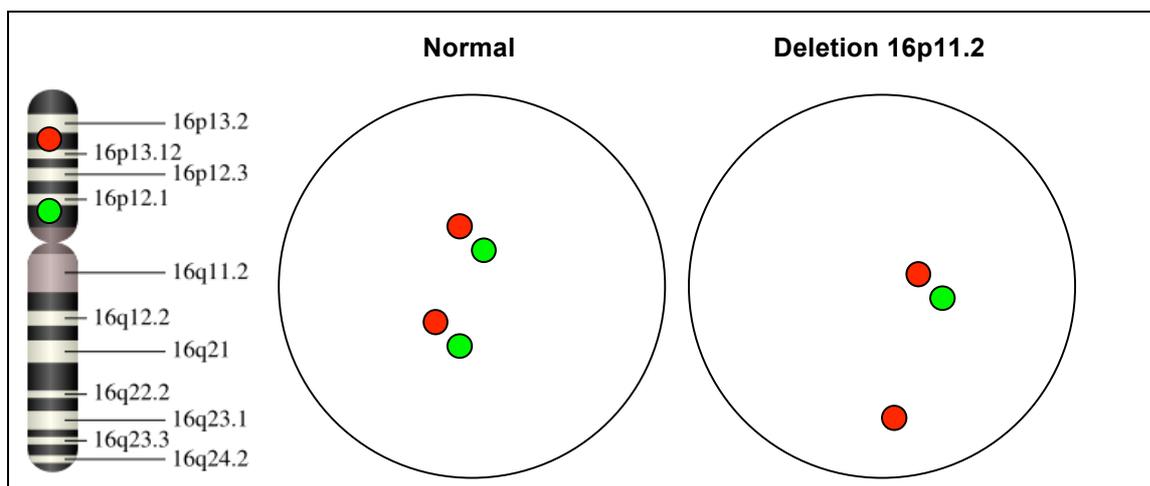


Abb. 3: Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Sonden; links Chromosom 16 und die Lage der komplementären Regionen der Sonden CTD-2515O10 (grün) und RP11-727C18 (rot); Mitte Hybridisierungssignale in einem Interphasekern einer Normalperson; rechts liegt eine Deletion 16p11.2 vor (nur ein grünes Signal, bei zwei roten Signalen)

2.4.2.4 Durchführung

BAC-DNA-Präparation

Die gewünschten Bakterienklone (BAC) wurden entsprechend der Genbereiche über die UCSC Genome Bioinformatics Datenbank [61] ausgewählt und über die Firma Invitrogen bezogen.

Die Lagerung der BAC-Klone erfolgte in Form von Glycerinstocks bei -80°C . 100 μl eines Stocks wurden mit 200 ml LB-Medium gemischt und bei 37°C im Schüttelinkubator für 16-24 Stunden inkubiert. Dann wurden 200-250 ml der Bakterienkultur in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten mit 10.000 U/min bei 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde eine DNA-Präparation mithilfe des Perfectprep-Plasmid-maxi-Kits durchgeführt. Zunächst wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und die Lösung in den Ursprungskolben zurückgegeben. Zum Pellet wurden 15 ml Lösung 1 gegeben und dieses komplett durch Pipettieren aufgelöst. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten und Lagerung für 5 Minuten auf Eis wurden 15 ml Lösung 2 zur Suspension gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Danach wurden 15 ml eisgekühlter Lösung 3 dazugegeben, erneut vorsichtig gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde für 20 Minuten bei 4°C und 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen filtriert. Zu diesem Filtrat wurden 35 ml gut gemischte kalte DNA-Binding-Matrix gegeben und nach sorgfältigem Mischen für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde sehr vorsichtig abgegossen, um einen Verlust der Matrix gebundenen DNA zu vermeiden. Danach wurden 9 ml der mit absolutem Ethanol verdünnten Purifications-Lösung zum Pellet gegeben und resuspendiert. Die verdünnte Matrix wurde anschließend auf eine im Kit beigefügte Säule in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 2000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde nochmals 9 ml verdünnte Purifications-Lösung in das 250 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, um restliche in der Matrix gebundene DNA in Lösung zu bringen. Diese Lösung wurde nach dem Zentrifugieren ebenfalls auf die Filtersäule gegeben und wieder bei 2000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden 9 ml verdünnte Purifications-Lösung zum Waschen auf die Säule gegeben und erneut bei 2000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, bis die Säule komplett trocken war. Dann erfolgte die Überführung in ein sauberes 50 ml Röhrchen. Anschließend wurden 3 ml auf 85°C vorgeheizte Elution-Lösung auf die Säule pipettiert und die Säule für 10 Minuten im Wasserbad bei 85°C inkubiert.

Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 2000 U/min wurde das Eluat in ein 50 ml Röhrchen, das für hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten geeignet war, umgefüllt. Es wurden 70 µl 5M NaCl und 6 ml absolutes Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde dann für 30 Minuten bei 17.000 U/l bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bevor es erneut für 15 Minuten bei 17.000 U/l bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet für ca. 15-30 Minuten zum Trocknen in den Vakuumtrockner gegeben. Nach Zugabe von 250 µl Aqua dest. zum Lösen des Pellets wurde die Suspension über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

Am nächsten Tag erfolgten die Überführung der DNA in ein 1,5 ml Röhrchen mit Schraubverschluss und die Bestimmung der DNA-Konzentration. Dazu wurde das Nano-Drop-ND-1000-Spektrophotometer verwendet. Zuerst wurde ein Nullabgleich mit 1 µl Aqua dest. durchgeführt, danach Reinheit und DNA-Konzentration von 1 µl DNA photometrisch be-

stimmt und mithilfe der Nano-Drop-Software ausgewertet. Bis zur Markierung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

DNA-Markierung für FISH

Für die DNA-Markierung wurde das BioPrime-DNA-Labeling-System-Kit verwendet.

Zunächst wurde 1 µg der verdauten, gereinigten DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24 µl aufgefüllt, dann wurden 20 µl 2,5x-Random-Primer hinzugefügt. Anschließend wurde die DNA für 5 Minuten im Wasserbad bei 100°C denaturiert und danach 2-3 Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Markierung wurden nun 5 µl der mit Spectrum-Green oder Spectrum-Orange markierten Sonden hinzugegeben. Da die Farben sehr lichtempfindlich sind, wurde bei diesem Schritt auf das Dunkelhalten des Eppendorfhütchens geachtet. Die Probe wurde dann mittels Pipette gemischt und es wurde 1 µl Klenow-Fragment dazugegeben. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde das Gemisch über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die DNA nach Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer mit Microconsäulen aufgereinigt. Dazu wurden nach Zugabe der markierten DNA 300 µl Aqua dest. auf die Säule gegeben und diese 10 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl Aqua dest. auf die Säule gegeben und diese umgedreht in ein neues Röhrchen gesteckt. Nun wurde für 5 Minuten bei 5.000 U/min zentrifugiert und die gereinigte, markierte DNA in das Originalröhrchen zurückgegeben. Die Aufbewahrung erfolgte anschließend im Dunkeln bei 4°C.

Präparation der markierten Sonden

Für die FISH-Untersuchung auf mögliche Deletionen oder Duplikationen wurde ein Sonden-gemisch aus einer im Spectrum-Orange und einer im Spectrum-Green markierten Sonde hergestellt. Von den unterschiedlich markierten Sonden wurden jeweils 20 µl zusammen-gemischt. Dann wurden 10 µl Human-Cot-1-DNA hinzugefügt. Anschließend wurden 5 µl Natri-umacetat und 140 µl absoluter Ethanol hinzugegeben und die Suspension für 30 Minuten bei 17.000 U/l zentrifugiert. Danach wurde soviel Ethanol wie möglich abpipettiert, ohne dabei das DNA-Pellet zu beschädigen. Die Trocknung des Pellets erfolgte in der abgedunkelten Vakuumzentrifuge bei 3.000 U/min und 20-40°C in 15-20 Minuten. Zum getrockneten Pellet wurden dann 20 µl 50% Mastermix gegeben. Das fertige Sonden-gemisch wurde bis zur Ver-wendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials

Die Untersuchung erfolgte an Zellsedimenten PHA-stimulierter Lymphozyten, die nach der Chromosomenanalyse im Rahmen der Routinediagnostik überzählig und bei -20°C in Car-noy's Fixativ gelagert waren.

Je ein Tropfen des zu untersuchenden Sediments wurde auf einen handelsüblichen Objektträger aufgetropft. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde anschließend ein für die Hybridisierung geeignetes Areal mit vielen einzelnen Metaphasen und vielen sich nicht überlappenden Zellen gesucht. Dieses wurde dann auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantschreiber markiert. Bei zu geringer Zelldichte wurde gegebenenfalls ein zweites Auftropfpräparat hergestellt.

Verdauen der Zellen

Der Verdau der Zellen erfolgte mit dem Microm-VP-2000-Processor. Das Gerät transferiert die Präparate zwischen den einzelnen Lösungen automatisch, so dass die programmierten Einwirkabstände genauestens eingehalten werden konnten.

Der Objektträger wurde für 5 Minuten bei 37°C in einer Proteaselösung inkubiert, um das Zytoplasma zu entfernen, und im Anschluss kurz mit Aqua dest. gespült. Dann wurde das Präparat für 2 Minuten in 1% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Rückstände wurden durch einen zweiten Waschgang mit Aqua dest. entfernt. Anschließend wurde das Präparat in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 Minuten in 70%igem, 85%igem und absolutem Ethanol dehydriert und dann luftgetrocknet.

Hybridisierung

Hybridisierung bedeutet das Binden der einzelsträngigen DNA-Sonde an die komplementäre Ziel-DNA.

Hierfür wurden 1,3 µl der jeweiligen Sonden-Puffer-Lösung auf das markierte Areal des Objektträgers pipettiert, mit einem runden Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum-Kleber zum Schutz vor Austrocknung abgedichtet. Anschließend wurde der Objektträger zusammen mit einem feuchten Tuch („feuchte Kammer“) plan auf den Boden einer Metallbox gelegt und diese für 7 Minuten bei 75°C in ein Wasserbad gestellt. Dadurch wurde die DNA denaturiert. Dann wurde die Box bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Waschen und Gegenfärbung

Am Folgetag wurde das Präparat gewaschen, um überschüssige, ungebundene DNA-Sonden zu entfernen.

Zunächst wurden der Fixogum-Kleber und das Deckgläschen entfernt und die Objektträger für 2 Minuten bei 71°C in Waschlösung I inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Waschlösung II für 1 Minute bei Raumtemperatur. Nach kurzem Spülen des Objektträgers in 2x-SSC erfolgte das Gegenfärben der zellulären DNA mit einem Komplementärfarbstoff. Dazu wurden die Präparate für 5 Minuten bei Raumtemperatur in eine Küvette mit DAPI-Lösung gestellt. Danach erfolgte erneut ein kurzer Waschgang in 2x-SSC, bevor die Präpa-

rate mit Antifade-Lösung beschichtet und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckelt wurden.

Auswertung und Dokumentation

Es wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wurden die jeweiligen spezifischen Filter verwendet. Alternativ konnten mittels eines Breitbandfilters grüne und rote Signale gleichzeitig ausgewertet werden (Filter von AHF). Die Ergebnisse wurden mit dem Bildanalyse-System ISIS-3.0 der Firma Metasystems dokumentiert. Die Auswertung erfolgte sowohl an Interphasekernen als auch an Metaphasen. Es wurden mindestens 15 Metaphasen bzw. wenn möglich 100 Interphasekerne ausgezählt. Von mindestens 3 Metaphasen bzw. Interphasekernen je Präparat wurden Bilder angefertigt. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Ergebnisse durch mindestens eine weitere in der FISH-Diagnostik erfahrene Person, um eine möglichst hohe Auswertegenauigkeit zu erzielen.

2.4.3 Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens

2.4.3.1 Auswahl der Patienten für die Methylierungsanalyse

Es wurde bei allen Patienten aus dem Kollektiv, bei denen Angaben zu den Körpermaßen verfügbar waren, der Body Mass Index (BMI) berechnet:

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht (kg)} : (\text{Körpergröße in m})^2$$

Sieben Patienten hatten einen BMI von ≥ 2 Standardabweichungen (SD). Es wurden die vier Patienten untersucht, von denen noch DNA verfügbar war (Nr. 13, 30, 31 und 85). Die Ergebnisse von vier weiteren Patienten aus dem Kollektiv, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik schon eine Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens erfolgt war, wurden mit zur Auswertung herangezogen (Nr. 77, 86, 91 und 94).

2.4.3.2 Prinzip der Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens stellt, wie unter 1.3.1.2 beschrieben, den ersten labordiagnostischen Schritt zur Abklärung des Vorliegens eines PWS dar.

Die DNA-Methylierung von Cytosinen, an deren 5'-Ende Guanin hängt, ist einer der wichtigsten epigenetischen Mechanismen. In aller Regel sind CG-arme Regionen methyliert, während CG-reiche Regionen, die auch CpG-Inseln genannt werden, unmethyliert sind. Eine Ausnahme stellt die hochgradige Methylierung von CpG-Inseln dar, die in der Nachbarschaft

von regulatorischen Regionen genomisch geprägter Gene liegen. Diese Hypermethylierung führt dann zu einer Inaktivierung der Gene.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Methylierungsanalyse. In der vorliegenden Arbeit wurde eine methylierungsspezifische PCR (MSP) angewandt.

Hierfür musste zunächst eine Bisulfitbehandlung durchgeführt werden. Die Bisulfitbehandlung ist ein Verfahren zur gezielten Basenumwandlung innerhalb eines DNA-Moleküls. Die Reaktion besteht in der Desaminierung von freien Cytosin-Resten durch Behandlung mit Bisulfit zu Uracil-Resten, während methylierte Cytosin-Reste als Cytosinbasen bestehen bleiben und nicht umgewandelt werden. Ein neu entstandenes Uracil wird in einer folgenden PCR durch Thymin ersetzt. Dies entspricht im komplementären Strang Adenin. Somit kommt es zu einem Austausch eines CG-Basenpaares gegen ein TA-Basenpaar. Die Bisulfitbehandlung von DNA wird genutzt, um das Methylierungsmuster von Genen zu analysieren.

	Unmethylierte DNA	Methylierte DNA
Originalsequenz	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N
Komplementärer Strang	N-G-C-N-G-C-N-G-C-N	N-G-C-N-G-C-N-G-C-N
nach Bisulfitbehandlung	N- U -G-N- U -G-N- U -G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N
Nach PCR	N- T -G-N- T -G-N- T -G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N
Komplementärer Strang	N-A-C-N-A-C-N-A-C-N	N-G-C-N-G-C-N-G-C-N

Abb. 4: Schematische Darstellung der Bisulfitbehandlung: Änderung der DNA-Sequenz durch die Bisulfitbehandlung und anschließender PCR; A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, U = Uracil, N = variable Base

Anschließend wird eine PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern durchgeführt.

Die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei etwa 95-100°C. Danach erfolgt die Abkühlung auf 50-60°C. Dabei werden zwei zugefügte Primer, deren Sequenz zu der an den 3'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär ist, angelagert (*annealing*). Primer sind aus 15-25 Basenpaaren bestehende Oligonukleotide. Durch Zusatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) werden die beiden Einzelstränge in Anwesenheit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden ein P (paternal) Primer Set und ein M (maternal) Primer Set verwendet. Beide Sets binden methylierungsabhängig an die CpG-Insel des *SNRPN*-Gens. Das P Primer Set bindet an unmethylierte, chemisch modifizierte DNA, das M Primer

Set an methylierte DNA. Um eine fehlerhafte Bindung der Primer aufgrund der sehr ähnlichen Sequenzen zu verhindern, wurden „hot start“ Enzyme verwendet.

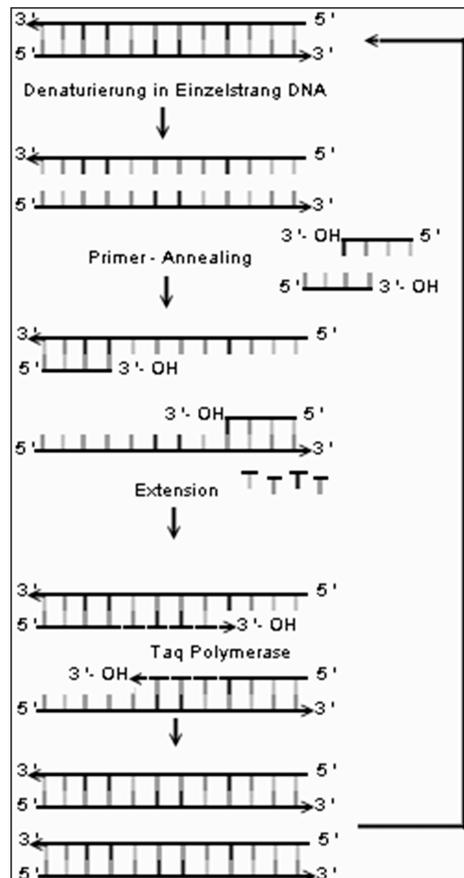


Abb. 5: Schematische Darstellung der PCR [69]

Anschließend wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese dient der Trennung der Nukleinsäuregemische nach ihrer Größe. In einem elektrischen Spannungsfeld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode. Die einzelnen Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer elektrischen Ladung und ihrer Größe unterschiedlich schnell und werden dadurch aufgetrennt. Das verwendete Agarose-Gel funktioniert hierbei wie ein Sieb: kleinere Moleküle passieren das Gel schneller als größere. Die Moleküle werden schließlich nach Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid an unterschiedlichen Stellen im Gel nachweisbar und können mit einem fotografischen Verfahren sichtbar gemacht werden.

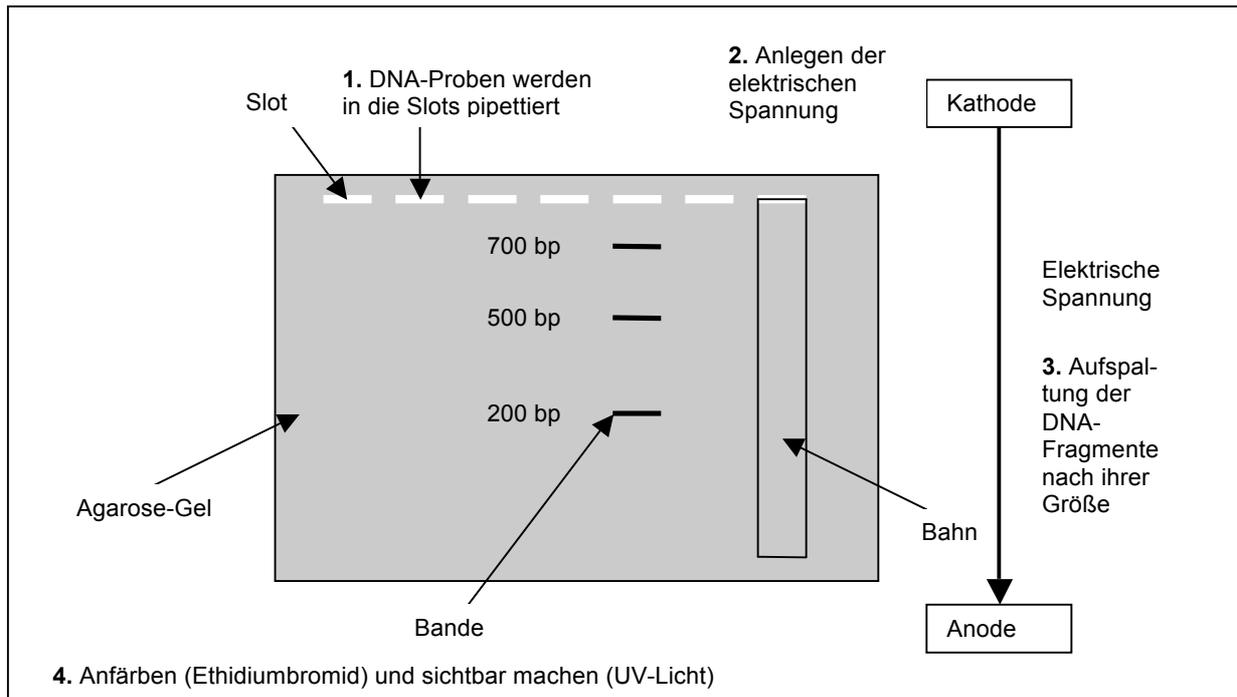


Abb. 6: Schematische Darstellung der Agarosegelelektrophorese; eigene Graphik (modifiziert nach [70])

2.4.3.3 Durchführung

Für die Vorbehandlung der DNA wurde das EpiTect-Bisulfite-Kit der Firma Qiagen verwendet. Es wurde nach dem Protokoll „Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA“ gearbeitet. Zur methylierungsspezifischen PCR wurde das CpG-WIZ Prader-Willi/Angelman-Amplification-Kit der Firma Chemicon International verwendet.

DNA-Konversion

Zunächst wurde das Aliquot des Bisulfit-Mixes durch Zugabe von 800 μ l RNase-freiem Wasser und vortexen für ca. 5 Minuten vollständig aufgelöst. Dann wurden je 2 μ g DNA in 200 μ l PCR-Röhrchen gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 μ l aufgefüllt. Zur Lösung wurden 85 μ l aufgelöster Bisulfit-Mix und 35 μ l DNA-Protect-Puffer gegeben, so dass sich in jedem Röhrchen ein Volumen von 140 μ l befand. Es wurde darauf geachtet, dass der DNA-Protect-Puffer nach Zugabe von Bisulfit einen Farbumschlag von grün zu blau zeigte. Dies bedeutete, dass gut gemischt wurde und außerdem ein optimaler pH-Wert für die Bisulfitreaktion vorlag. Die Röhrchen wurden dann geschlossen und in einen vorher programmierten Thermocycler gegeben, wo verschiedene Denaturierungs- und Inkubationsschritte (siehe Tabelle 8) durchlaufen wurden. Die Röhrchen wurden dann über Nacht im Thermocycler belassen.

Tabelle 8: Vorgegebenes Schema des Herstellers zur Bisulfitbehandlung

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 Minuten	99°C
Inkubation	25 Minuten	60°C
Denaturierung	5 Minuten	99°C
Inkubation	85 Minuten	60°C
Denaturierung	5 Minuten	99°C
Inkubation	175 Minuten	60°C

Reinigen der konvertierten DNA

Am nächsten Morgen wurden die Röhrchen aus dem Thermocycler genommen und kurz anzentrifugiert. Dann wurde der gesamte Inhalt in ein Röhrchen mit vorher eingebrachter EpiTect-spin-Säule überführt. Das Röhrchen wurde dann für 1 Minute bei 15.000 U/min zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Dann wurden 500 µl Waschpuffer-BW auf die Säule gegeben und erneut für 1 Minute bei 15.000 U/min zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Durchflusses wurden 500 µl Puffer BD zur Desulfonierung auf die Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder für 1 Minute bei 15.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden noch einmal 500 µl Waschpuffer-BW auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei 15.000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde dieser letzte Schritt noch einmal wiederholt. Danach wurde die Säule in ein sauberes 2 ml Röhrchen gegeben und wieder für 1 Minute bei 15.000 U/min zentrifugiert, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Die Säule wurde dann in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Ins Zentrum der Membran wurden 20 µl Lösungspuffer-EB gegeben und die gereinigte DNA durch Zentrifugieren für 1 Minute bei 12.000 U/min gelöst. Um die erzielte DNA-Menge zu erhöhen, wurde dieser Vorgang einmal wiederholt. Die DNA wurde dann bis zur weiteren Verarbeitung bei 2-8°C gelagert.

Amplifikation mittels PCR

Zur Amplifikation musste zunächst ein Mastermix hergestellt werden. Dafür musste die Zahl der Proben festgelegt werden. Neben den zu untersuchenden Proben sollten 4 Kontrollen mitlaufen: eine normale Kontroll-DNA, eine Negativkontrolle mit Aqua dest. und je eine Kontrolle eines Patienten mit PWS und eines Patienten mit Angelman-Syndrom (AS). Für jede Amplifikationsreaktion wurden 23 µl Mastermix benötigt, die sich aus 2,5 µl 10x-Universal-PCR-Puffer; 2 µl 2,5mM-dNTP-Mix; 2 µl P- oder M-Primer; 0,1 µl „hot start“-Enzymen (5 U/µl) und 16,4 µl Aqua dest. zusammensetzten. In das DNA-freie Kontrollröhrchen wurden 2 µl Aqua dest. hinzugegeben. In die anderen Röhrchen wurden je 2 µl der modifizierten Test-

bzw. Kontroll-DNA gegeben. Anschließend erfolgte die PCR in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 9: Durchführung der PCR

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	6 Minuten	95°C
<u>35 Zyklen:</u>		
Denaturierung	30 Sekunden	95°C
Annealing	30 Sekunden	62°C
Extension	30 Sekunden	72°C
Letzte Extension	10 Minuten	72°C

Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden 4 g Agarose mit TBE-Gebrauchslösung (1x TBE) auf 200 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle auf maximaler Stufe erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen wurden 10 µl Ethidiumbromid zugegeben und gut vermischt. Das Gemisch wurde vorsichtig in die Gelkammer gegossen, worin es innerhalb von ca. 20 Minuten erstarrte.

Anschließend wurde die Gelkammer in die mit TBE-Gebrauchslösung (= Laufpuffer) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Gel vollständig vom Laufpuffer bedeckt war. Je 10-15 µl PCR-Produkt wurden mit 3,5 µl Gel-Loading-Puffer gemischt.

Der Längenstandard wurde in eine Tasche (Slot) pipettiert, die PCR-Ladepuffergemische in die folgenden Slots. Nun wurde eine konstante elektrische Spannung abhängig von der Länge der Elektrophoresekammer und der Gelkonzentration angelegt und die Elektrophorese dadurch gestartet. Beim verwendeten 2%igen Agarose-Gel wurde eine Spannung von 10 V/cm gewählt.

Die Elektrophorese wurde beendet, als DNA-Fragmente und Längenstandard genügend aufgetrennt waren, wobei eine Mindestlaufstrecke von 6 cm eingehalten wurde.

Die Gelträger wurden zusammen mit dem Gel aus der Elektrophoresekammer genommen, auf dem UV-Tisch angesehen und fotografiert.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vorhandene Score-Systeme zum Screening auf ein FraX auf ihre klinische Anwendbarkeit und Validität überprüft werden. Darüber hinaus sollte ein Versuch unternommen werden, diese Score-Systeme anhand des vorliegenden Patientenkollektivs zu optimieren. Ziel war es außerdem einen geeigneten diagnostischen Ablauf bei klinischem Verdacht auf ein FraX sowie bei Phänotypen, die eher für das Vorliegen eines Mikrodeletionssyndroms sprechen, zu erarbeiten. Im Rahmen weiterführender Labordiagnostik bei ausgewählten Patienten sollte außerdem versucht werden die molekularen Ursachen des jeweiligen Phänotyps besser zu beschreiben (siehe 1.4).

Die Daten der ausgewählten 110 Patienten wurden mit dem Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung (siehe Anhang, A2) erhoben und anschließend statistisch ausgewertet. Alle ausgewählten Fälle waren zuvor mithilfe der Southern-Blot-Analyse auf ein FraX untersucht worden. Bei 21 der 110 Patienten konnte durch diese Untersuchung ein FraX nachgewiesen werden (FraX-Positive-Patienten) die übrigen 89 Patienten zeigten unauffällige Befunde (FraX-Negative-Patienten).

3.1 Statistische Analyse der Patientendaten

Da der Phänotyp bei weiblichen FraX-Patientinnen wesentlich uncharakteristischer ist als bei männlichen Patienten (siehe 1.2.5) und da in sowohl bei den FraX-Positiven- (2 von 21) als auch bei den FraX-Negativen-Patienten (11 von 89) deutlich weniger weibliche als männliche Patienten vertreten waren, wurden für die statistische Auswertung nur die Daten der männlichen Patienten berücksichtigt. Dadurch wurde die Stichprobe von ursprünglich 110 auf 97 reduziert.

3.1.1 Vergleichbarkeit der Kollektive in Bezug auf das Alter

Zunächst wurde getestet, ob die männlichen Patienten bezüglich des Alters gleich über beide Gruppen (FraX-Positive-Patienten und FraX-Negative-Patienten) verteilt sind. In Abbildung 7 ist die Altersverteilung des für die weitere Analyse untersuchten Kollektivs (3.1.2)

graphisch dargestellt. Der anhand des Wilcoxon-Tests ermittelte p-Wert liegt bei 0,877. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Altersverteilung zwischen den beiden Gruppen.

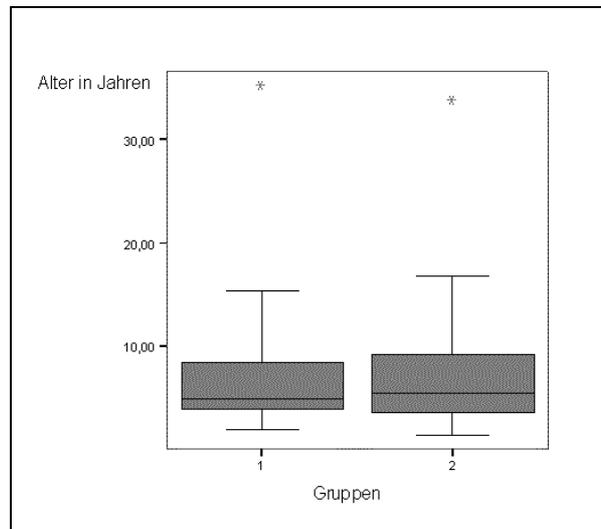


Abb. 7: Darstellung der Altersverteilung der männlichen Patienten; Gruppe 1 = FraX-Positive-Patienten, Gruppe 2 = FraX-Negative-Patienten

3.1.2 Vergleich der Kollektive

Da nicht zu allen Punkten, die ursprünglich ausgewertet werden sollten, hinreichende Patienteninformationen vorlagen, konnten von den ursprünglich 14 zu untersuchenden Merkmalen nur sieben für die statistische Auswertung berücksichtigt werden. Mentale Retardierung wurde außerdem als Einschlusskriterium für die Testung auf das FraX definiert. Bis auf zwei Patienten war bei allen männlichen Patienten eine MR im Anforderungsbogen vermerkt. Diese beiden nicht sicher retardierten Patienten wurden aus der statistischen Auswertung herausgenommen (Nr. 95 und 103).

Somit wurden letztlich 95 männliche, mental retardierte Patienten hinsichtlich folgender Merkmale verglichen:

- Große und/oder dysplastische Ohren
- Positive Familienanamnese (FA) für MR
- Sprachentwicklungsverzögerung (SEV)
- Hyperaktives Verhalten
- Autistische Verhaltensweisen
- Konzentrationsprobleme/kurze Aufmerksamkeitsspanne

In der Tabelle 10 sind die Häufigkeiten des Auftretens der einzelnen Merkmale und Verhaltensweisen aufgelistet. Zu den Punkten große und/oder dysplastische Ohren, positive Familienanamnese für mentale Retardierung und SEV waren bei allen 95 untersuchten männli-

chen Patienten Informationen verfügbar (n = 95). Die Stichproben bei den Verhaltensauffälligkeiten waren mit 45 bis 49 Patienten deutlich kleiner.

Es wurde die Merkmalshäufigkeit bei den FraX-Positiven-Patienten und FraX-Negativen-Patienten miteinander verglichen und jeweils der p-Wert berechnet. Signifikant ($p < 0,05$) war lediglich die positive FA für mentale Retardierung ($p = 0,009$), die bei den FraX-Positiven-Patienten deutlich häufiger vorlag.

Tabelle 10: Ergebnisse der retrospektiven Datenerhebung

	vorhanden	nicht vorhanden	p-Wert
Große und/oder dysplastische Ohren (n = 95)			0,077
FraX-Positive-Patienten (n = 19)	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)	
FraX-Negative-Patienten (n = 76)	34 (44,7 %)	42 (55,3 %)	
Positive Familienanamnese (n = 95)			0,009
FraX-Positive-Patienten (n = 19)	10 (52,6 %)	9 (47,4 %)	
FraX-Negative-Patienten (n = 76)	16 (21,1 %)	60 (78,9 %)	
Sprachentwicklungsverzögerung (n = 95)			0,510
FraX-Positive-Patienten (n = 19)	17 (89,5 %)	2 (10,5 %)	
FraX-Negative-Patienten (n = 76)	61 (80,3 %)	15 (19,7 %)	
Hyperaktivität (n = 46)			0,460
FraX-Positive-Patienten (n = 11)	9 (81,8 %)	2 (18,2 %)	
FraX-Negative-Patienten (n = 35)	23 (65,7 %)	12 (34,3 %)	
Autistische Züge (n = 49)			0,171
FraX-Positive-Patienten (n = 11)	8 (72,7 %)	3 (27,3 %)	
FraX-Negative-Patienten (n = 38)	17 (44,7 %)	21 (55,3 %)	
Konzentrationsprobleme (n = 45)			1,000
FraX-Positive-Patienten (n = 11)	10 (90,9 %)	1 (9,1 %)	
FraX-Negative-Patienten (n = 34)	30 (88,2 %)	4 (11,8 %)	

Angegeben sind jeweils die absoluten Zahlen sowie die Prozentzahlen und die errechneten p-Werte.

3.1.3 Auswertung der Ärztefragebögen

Es wurden acht Ärzte, die an der klinischen Diagnostik des FraX beteiligt aber weitgehend nicht mit den Einsendern des analysierten Patientenkollektivs identisch sind, mithilfe eines Fragebogens (siehe 2.1.2 und A3) interviewt, wie sie die einzelnen Merkmale bei der Entscheidung zur Testung auf ein FraX gewichten. Sie sollten jeweils 1 (weniger wichtig) bis 5 (extrem wichtig) Punkte vergeben. In Tabelle 11 sind die errechneten Mittelwerte für die einzelnen Merkmale aufgelistet. Anhand der Mittelwerte wurden Ränge gebildet.

Tabelle 11: Ergebnisse der Ärzefragebögen

Merkmal	Mittelwert	Rang
Mentale Retardierung	5	1
Sprachentwicklungsverzögerung	3,875	2
Positive Familienanamnese für mentale Retardierung	3,75	3
Hyperaktives Verhalten	3,75	3
Große und/oder dysplastische Ohren	3,625	4
Konzentrationsprobleme/kurze Aufmerksamkeitsspanne	3,625	4
Makrozephalus	3,5	5
Makroorchidismus	3,143	6
Autistische Züge/sich nicht berühren lassen wollen	3,125	7
Andere Verhaltensauffälligkeiten (z. B. aggressives Verhalten)	3	8
Wenig Augenkontakt/Scheu	2,375	9
Andere faziale Dysmorphien (z. B. Hypertelorismus, Nasenanomalien)	2,125	10
Schlaffe, überbewegliche Gelenke/Finger	2,125	10
Andere kongenitale Anomalien (z. B. Skelettfehlbildungen, Herzfehler)	1,625	11
Handwedeln	1,5	12
Zerebrale Anfälle	1,5	12
Wachstumsretardierung (pränatale und postnatale)	1,25	13
Handbeißen	1,25	13
Plantarfalte	1,125	14
Affenartige Falte/Sydney Linie	1,125	14

Mittelwerte und daraus resultierende Rangordnung der subjektiven Wichtigkeit der klinischen Merkmale nach Einschätzung der Ärzte; einzelne Ränge werden zum Teil von verschiedenen Merkmalen geteilt; die sechs scheinbar wichtigsten Merkmale sind hervorgehoben

Die sechs, nach Meinung der Ärzte wichtigsten Merkmale sind MR, SEV, positive FA für MR, hyperaktives Verhalten, große und/oder dysplastische Ohren und Konzentrationsprobleme. Diese decken sich weitgehend mit den häufig im Patientenkollektiv dokumentierten Merkmalen. Lediglich autistische Züge wurden im Patientenkollektiv zusätzlich häufig beschrieben, von den Ärzten aber als etwas weniger wichtig eingestuft (Rang 7). Wie bereits erwähnt, stimmten die Einsender der Blutproben nicht wesentlich mit den befragten Fachärzten überein, so dass die Überschneidungen der Ergebnisse nicht wesentlich darauf zurückgeführt werden können.

3.1.4 Eigene Score-Systeme

Aus den erhobenen Daten wurden zwei verschiedene Scores zur klinischen Diagnostik eines FraX erstellt. In den einen Score gingen die Merkmale ein, zu denen bei allen Patienten Informationen vorlagen (große Stichprobe): große und/oder dysplastische Ohren, positive FA und SEV (Drei-Merkmals-Score). In den zweiten Score wurden zusätzlich Hyperaktivität, autistische Züge und Konzentrationsprobleme aufgenommen (Sechs-Merkmals-Score), Merkmale zu denen bei deutlich weniger Patienten Aussagen gemacht wurden.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der eigenen Score-Systeme

Drei-Merkmals-Score	Sechs-Merkmals-Score
große und/oder dysplastische Ohren	große und/oder dysplastische Ohren
positive FA für MR	positive FA für MR
SEV	SEV
	Hyperaktivität
	autistische Züge
	Konzentrationsprobleme

In Analogie zu den bereits erwähnten Score-Systemen [38-40] (siehe Anhang, A1) wurden für das Vorliegen eines Merkmals zwei Punkte vergeben, für ein fragliches Vorliegen ein Punkt und für die Abwesenheit eines Merkmals kein Punkt.

3.1.4.1 Drei-Merkmals-Score

Die Patienten wurden anhand des erzielten Scorewertes in die Gruppen 1-3 eingeteilt. FraX-Positive-Patienten und FraX-Negative-Patienten wurden miteinander verglichen. Mithilfe des exakten Fisher-Tests wurde der p-Wert errechnet. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,020$) zwischen den beiden Gruppen, der jedoch aufgrund der Berücksichtigung nur weniger Merkmale vorsichtig interpretiert werden muss. Insbesondere ist zu beachten, dass der Score anhand desselben Datensatzes entwickelt wurde, an dem anschließend auch die Evaluation erfolgte. Dadurch kommt es zu einer zu positiven Beurteilung des Scores hinsichtlich der Unterscheidbarkeit der beiden Gruppen.

Tabelle 13: Drei-Merkmals-Score

p = 0,020	Gruppe 1 Score 0-2	Gruppe 2 Score 3-4	Gruppe 3 Score 5-6
FraX-Positive-Patienten (n = 19)	4 (21,0 %)	9 (47,4 %)	6 (31,6 %)
FraX-Negative-Patienten (n = 76)	35 (46,1 %)	34 (44,7 %)	7 (9,2 %)

Verteilung der FraX-Positive-Patienten und FraX-Negative-Patienten auf die drei Gruppen anhand des erzielten Scorewertes, angegeben sind jeweils die absoluten Zahlen und die errechneten Prozentzahlen

3.1.4.2 Sechs-Merkmals-Score

Anschließend wurde aus allen sechs relativ häufig dokumentierten Merkmalen der Sechs-Merkmals-Score berechnet. Hierfür wurden nur die Daten der Patienten berücksichtigt, bei denen maximal zu einer der Verhaltensweisen keine Angabe gemacht wurde. Insgesamt konnten so Daten von 11 FraX-Positiven-Patienten und 37 FraX-Negativen-Patienten verwendet werden. Die Punkte 0-2 wurden nach dem oben genannten Schema vergeben. Tabelle 14 zeigt die Verteilung der einzelnen Scorewerte in den beiden Gruppen. In Abbildung 8 wird die Verteilung graphisch dargestellt. Bei den FraX-Negativen-Patienten zeigt sich eine wesentlich größere Spanne der Punktwerte, die im Schnitt deutlich niedriger liegen als bei den FraX-Positiven-Patienten.

Tabelle 14: Sechs-Merkmals-Score: Verteilung der Scorewerte in den beiden Gruppen; angegeben ist jeweils die Anzahl der männlichen Patienten, die den entsprechenden Scorewert erreichten

Wert	FraX-Positive-Patienten	FraX-Negative-Patienten
0		1
1		
2		
3		1
4		4
5		5
6	1	5
7	1	9
8	3	6
9	3	4
10	2	
11	1	
12		2

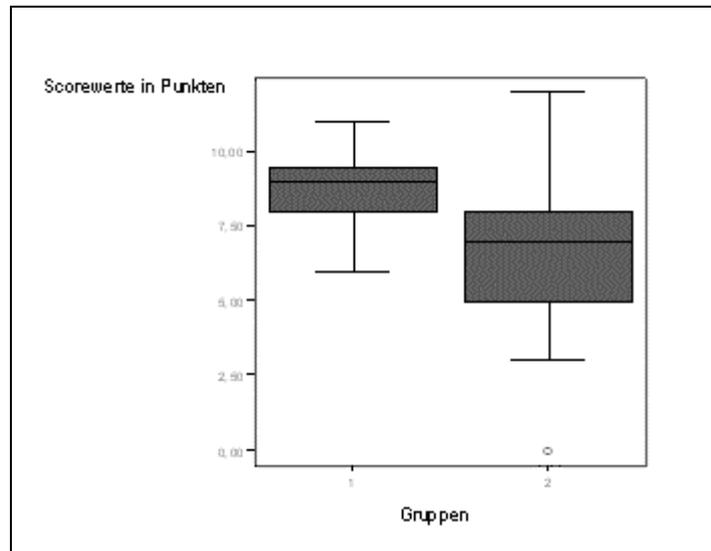


Abb. 8: Sechs-Merkmals-Score: Verteilung der Scorewerte der männlichen Patienten; Gruppe 1 = FraX-Positive-Patienten, Gruppe 2 = FraX-Negative-Patienten

Die errechneten Daten wurden mit dem exakten Wilcoxon-Test ausgewertet (siehe Tabelle 15). Der erzielte Mittelwert liegt mit 8,6 Punkten bei den FraX-Positiven-Patienten deutlich höher als bei den FraX-Negativen-Patienten (6,6 Punkte). Keiner der FraX-Positiven-Patienten hatte einen Scorewert < 6. Der Unterschied in der Punkteverteilung zwischen den beiden Gruppen ist mit $p = 0,002$ als signifikant anzusehen. Allerdings muss auch dieser Befund wegen der Übereinstimmung von Entwicklungs- und Validierungsdaten des Scores vorsichtig interpretiert werden.

Tabelle 15: Sechs-Merkmals-Score: Ergebnisse aus dem Wilcoxon-Test

p = 0,002	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum	P 25	P 75
FraX-Positive-Patienten (n = 11)	8,6	9,0	1,4	6,0	11,0	8,0	10,0
FraX-Negative-Patienten (n = 37)	6,6	7,0	2,3	0,0	12,0	5,0	8,0

SD = Standardabweichung; P = Perzentile; P 25: 1. Quartil; P 75: 3. Quartil

3.1.5 Kopfumfang

Ein Kopfumfang, der im oberen Normbereich liegt, wird als typisches Merkmal des FraX angesehen. Unabhängig von den berechneten Scores wurden daher die Kopfumfänge der Patienten in den beiden Gruppen miteinander verglichen. Von 85 der 95 männlichen Patienten liegen Angaben zum Kopfumfang vor. Es wurden jeweils die Perzentilen der Kopfumfänge ermittelt und die Patienten in drei Gruppen eingeteilt. Unterschieden wurden die Gruppen nach mikro- und makrozephalen und normalen Kopfumfängen. Zu den Mikrozephalen, d.h. den Patienten mit einer unterdurchschnittlichen Schädelgröße, wurden auch die auf der 3. Perzentile liegenden Patienten gezählt, zu den Makrozephalen, d.h. den Patienten mit einer überdurchschnittlichen Schädelgröße, auch die auf der 97. Perzentile liegenden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. Mit dem exakten Fisher-Test wurde ein p-Wert von 0,268 ermittelt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Kopfgröße zwischen den beiden Gruppen. Auffällig ist aber, dass prozentual sogar mehr FraX-Negative-Patienten makrozephal sind (20,9%) als FraX-Positive-Patienten (5,6%).

Tabelle 16: Kopfumfänge im Vergleich

p = 0,268	Mikrozephal P ≤ 3	Normal	Makrozephal P ≥ 97
FraX-Positive-Patienten (n = 18)	3 (16,7 %)	14 (77,8 %)	1 (5,6 %)
FraX-Negative-Patienten (n = 67)	6 (9,0 %)	47 (70,1 %)	14 (20,9 %)

3.2 Laborergebnisse

3.2.1 Array basierte vergleichende genomische Hybridisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei neun Patienten eine Array-CGH durchgeführt. Darunter waren fünf Patienten aus der Gruppe der FraX-Negativen, die aufgrund ihrer Scorewerte oder spezifischer Merkmale besonders typisch für ein FraX erschienen (Nr. 21, 24, 38, 46 und 51). Die übrigen vier Patienten gehörten zur Gruppe der FraX-Positiven (Nr. 11, 14, 15 und 19). Sie zeigten besonders stark oder besonders mild ausgeprägte Symptome oder auch untypische Befunde. Geklärt werden sollte bei ihnen mittels Array-CGH, ob eventuelle zusätzliche Aberrationen für ihren atypischen Phänotyp verantwortlich gemacht werden können. Schon vorhandene Untersuchungsergebnisse von weiteren 28 Patienten wurden mit ausgewertet (siehe 2.4.1.1 und [62]).

In den selbst durchgeführten Arrays zeigten acht der neun Patienten (Nr. 11, 14, 15, 19, 21, 38, 46 und 51) einen unauffälligen Befund. Bei einem Patienten aus der Gruppe der FraX-Negativen-Patienten (Patient 24) zeigte sich eine 1,59 Mb große Duplikation in 3q11.2 (siehe Abbildung 9).

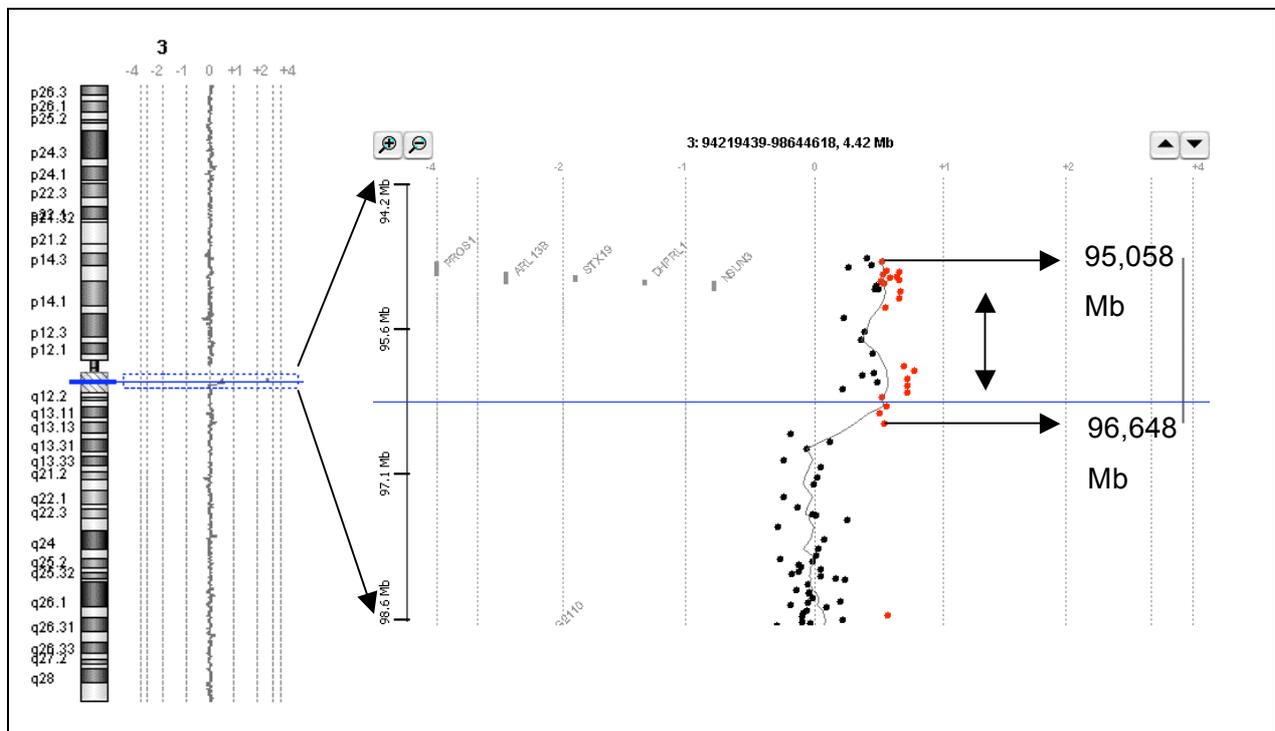


Abb. 9: Array-CGH: Duplikation in 3q11.2 bei Patient 24; die Patienten-DNA wurde rot markiert, die Referenz-DNA grün; die roten Punkte zeigen eine 1,590 Mb große Duplikation der Patienten-DNA in der entsprechenden Region an.

Von den 28 Patienten, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik [62] bzw. einer anderen Doktorarbeit [67] zu genetischen Ursachen von SEV im Institut für Humangenetik eine Array-CGH durchgeführt wurde, zeigten 23 einen unauffälligen Befund. Bei den fünf übrigen zeigten sich Veränderungen in verschiedenen Bereichen. Diese Veränderungen sollen im Folgenden in Form einer Tabelle dargestellt werden.

Tabelle 17: Auffälligkeiten in der Array-CGH bei den untersuchten FraX-Negativen-Patienten

Patient	Ort der Veränderung	Art der Veränderung	Syndrome aus der Literatur	Anmerkung
32	1q21.1	Duplikation 5,3 Mb	überlappt mit bekanntem Mikroduplikationssyndrom OMIM [18]: 612475 [57, 71-73]	identisch bei phänotypisch unauffälliger Mutter siehe 4.3.1.3
64	10p12.1	Deletion 1,7 Mb		identisch bei ebenfalls leicht mental retardierter Mutter, nicht nachweisbar bei den Großeltern mütterlicherseits
93	22q13.33	Deletion 1,5 Mb	bekanntes Mikrodeletionssyndrom OMIM: 606232 [74-78]	Mosaik siehe 4.3.1.2
98	18p11.2	Deletion 1,2 Mb		
99	16p11.2	Deletion 0,38 Mb	bekanntes Mikrodeletionssyndrom OMIM: 611913 [49, 53, 54, 56, 79]	siehe 4.3.1.1 und Anhang A5

Im Anhang (A5) wird ausführlich auf die bei dem Patienten 99 gefundene Mikrodeletion 16p11.2 und die klinischen Auffälligkeiten des Patienten eingegangen. In Abbildung 10 ist die im Rahmen der Routinediagnostik nachgewiesene Deletion in 16p11.2 dargestellt.

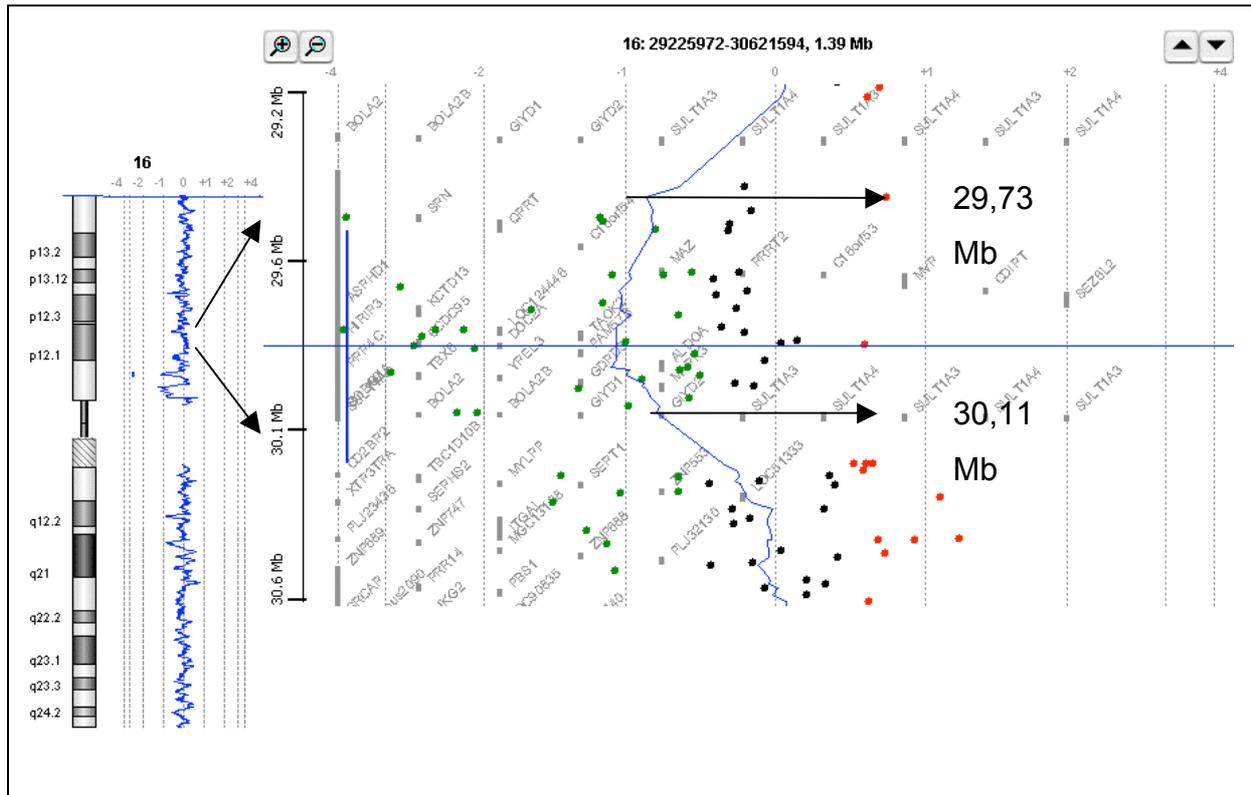


Abb. 10: Array-CGH: Deletion in 16p11.2 bei Patient 99 (Gruppe: FraX-Negative-Patienten); die Patienten-DNA wurde rot markiert, die Referenz-DNA grün; die grünen Punkte zeigen eine Deletion in der entsprechenden Region an.

3.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Wie unter 2.4.2.1 beschrieben, wurden 19 Patienten mit besonders ausgeprägter SEV aus der Gruppe der FraX-Negativen-Patienten mittels FISH auf eine Mikrodeletion 16p11.2 untersucht. Hierfür wurden die selbst hergestellten Sonden CTD-2515O10 und RP11-727C18 verwendet. Es wurden jeweils 15 Metaphasen oder 100 Interphasekerne bzw. bei einem Patienten (Nr. 89) mit nicht genügend Metaphasen und Interphasekernen nur 46 Interphasekerne ausgezählt. In insgesamt 18 der 19 untersuchten Fälle zeigte sich eine regelrechte Signalkonstellation. Im Anhang (A6) befindet sich eine Tabelle, die die Ergebnisse der FISH bei den untersuchten Patienten zusammenfasst. Eine regelrechte Signalkonstellation bedeutet, wie unter 2.4.2.3 beschrieben, das Vorliegen von je zwei roten und zwei grünen Signalen in Interphasekernen bzw. zwei roten und zwei grünen Doppelsignalen in Metaphasen. In Abbildung 11 sind Beispiele einer regelrechten Signalkonstellation dargestellt.

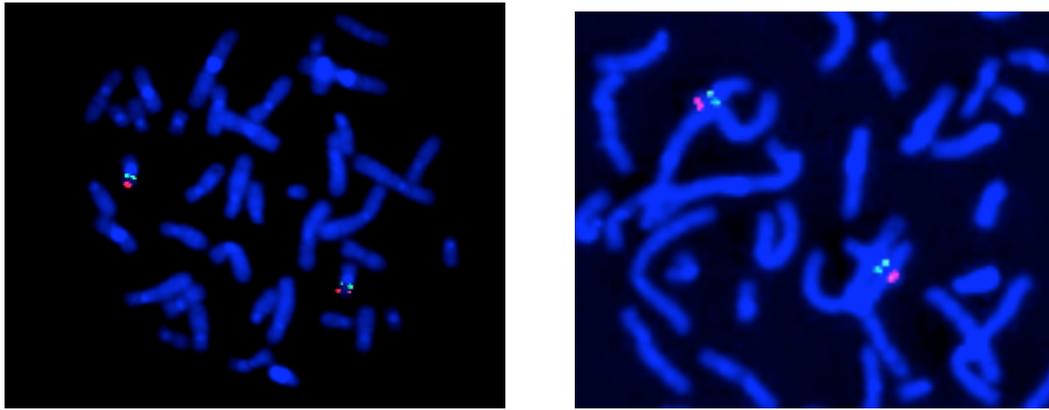


Abb. 11: FISH mit den Sonden CTD-2515O10 (16p11.2; grün) und RP11-727C18 (16p13.13; rot): Beispiele einer regelrechten Signalkonstellation in Metaphasen mit je zwei roten und zwei grünen Doppelsignalen; links Patient 103, rechts Patient 88

Bei einem Patienten (Nr. 36) zeigte sich in 9 Metaphasen und 114 Interphasekernen regelmäßig eine auf eine Deletion der Chromosomenregion 16p11.2 hinweisende Signalkonstellation. In allen Metaphasen war nur je ein grünes Doppelsignal bei zwei roten Doppelsignalen erkennbar. Von den Interphasekernen zeigten 105 nur ein grünes Signal und zwei rote Signale. Daraufhin wurden Blutlymphozyten beider Eltern mit den gleichen Sonden untersucht. Bei beiden zeigte sich eine regelrechte Signalkonstellation. Es ergab sich kein Hinweis auf das Vorliegen einer übertragbaren Chromosomenveränderung unter Beteiligung der Chromosomenregion 16p11.2. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Patienten um ein *de novo* Ereignis handelt, das als kausal für die vorliegende Symptomatik anzusehen ist. Im Anhang (A5) wird noch einmal genauer auf die klinischen Symptome dieses Patienten eingegangen.

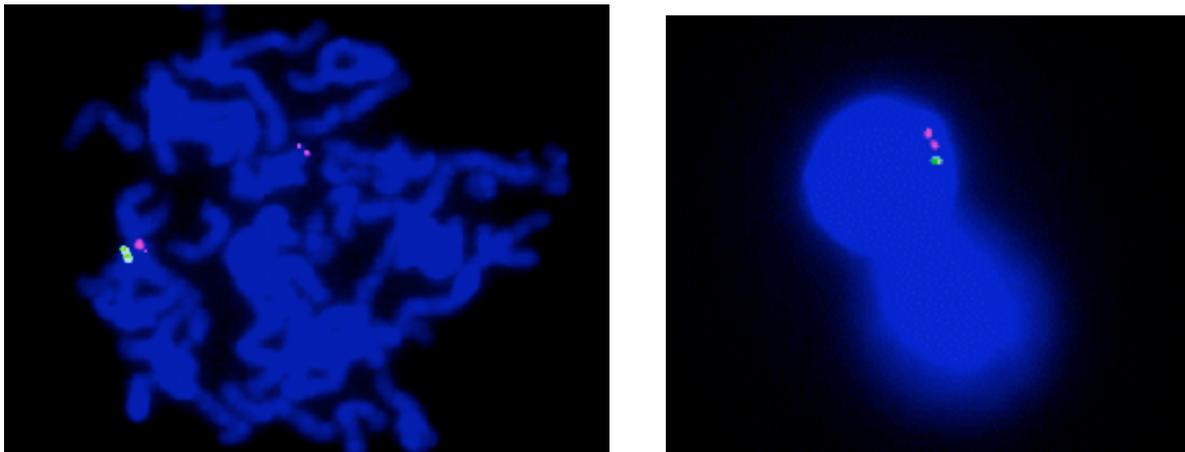


Abb. 12: FISH mit den Sonden CTD-2515O10 (16p11.2; grün) und RP11-727C18 (16p13.13; rot): Deletion in 16p11.2 bei Patient 36; links Metaphasekern mit 2 roten Doppelsignalen und einem grünen Doppelsignal, rechts Interphasekern mit zwei roten Signalen und einem grünen Signal

3.2.3 Methylierungsanalyse

Bei vier Patienten (Nr. 13, 30, 31 und 85) aus dem Kollektiv mit einem BMI ≥ 2 SD wurde eine methylierungssensitive PCR (MSP) für das Exon 1 des *SNRPN*-Gens durchgeführt. Die Ergebnisse bereits durchgeführter Analysen bei vier weiteren Patienten aus dem Kollektiv wurden mit zur Auswertung herangezogen (siehe 2.4.3.1).

Die Kontroll-DNA von gesunden Vergleichspersonen zeigte zwei verschiedene Banden. Die Banden korrelierten mit dem Vorliegen zweier unterschiedlich langer Fragmente. Das kürzere Fragment (100 bp) entstand durch Anlagerung des P-Primers an unmethylierte, bisulfitbehandelte DNA, das längere (174 bp) durch Anlagerung des M-Primers an methylierte, bisulfitbehandelte DNA. Bei Patienten mit einem Prader-Willi-Syndrom fehlt, wie schon beschrieben, das paternal exprimierte unmethylierte Gen, was zum alleinigen Vorliegen einer 174 bp-Bande führt. Liegt hingegen nur die 100 bp-Bande vor, ist dieser Befund beweisend für ein Angelman-Syndrom (AS), bei dem das maternal exprimierte Gen fehlt.

Bei allen acht Patienten ergab die Methylierungsanalyse normale Befunde, d.h. es konnten jeweils eine 100 bp-Bande und eine 174 bp-Bande nachgewiesen werden.

Laufrichtung

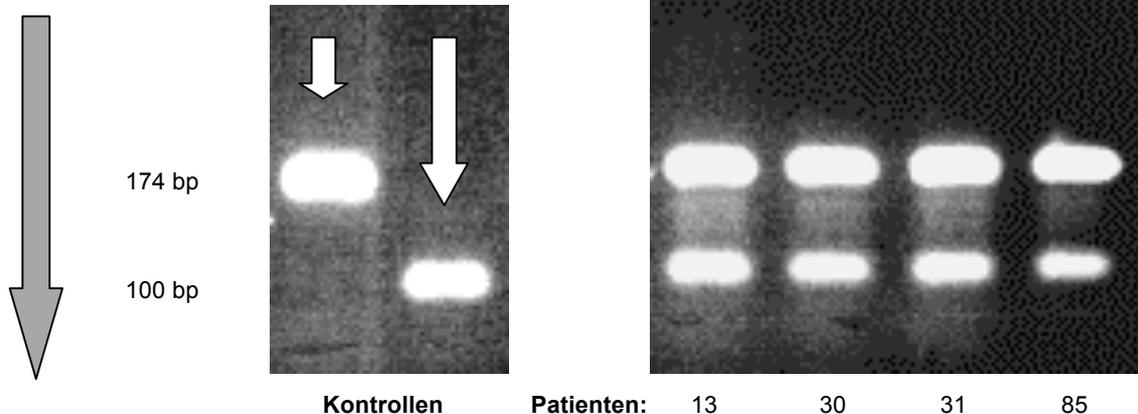


Abb. 13: Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens: Ausschnitte aus der Gelelektrophorese; links Kontrollen: kurzer weißer Pfeil = Prader-Willi-Syndrom (PWS, nur 174 bp Fragment), langer weißer Pfeil = Angelman-Syndrom (AS, nur 100 bp Fragment); rechts: Ergebnisse der untersuchten Patienten aus dem Kollektiv, bei allen lagen jeweils zwei Banden vor. Dies entspricht einem Normalbefund.

3.2.4 Zusammenfassung der Laborergebnisse

Im Folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit experimentell erhobenen bzw. ausgewerteten Laborergebnisse in Form einer Graphik zusammengefasst werden.

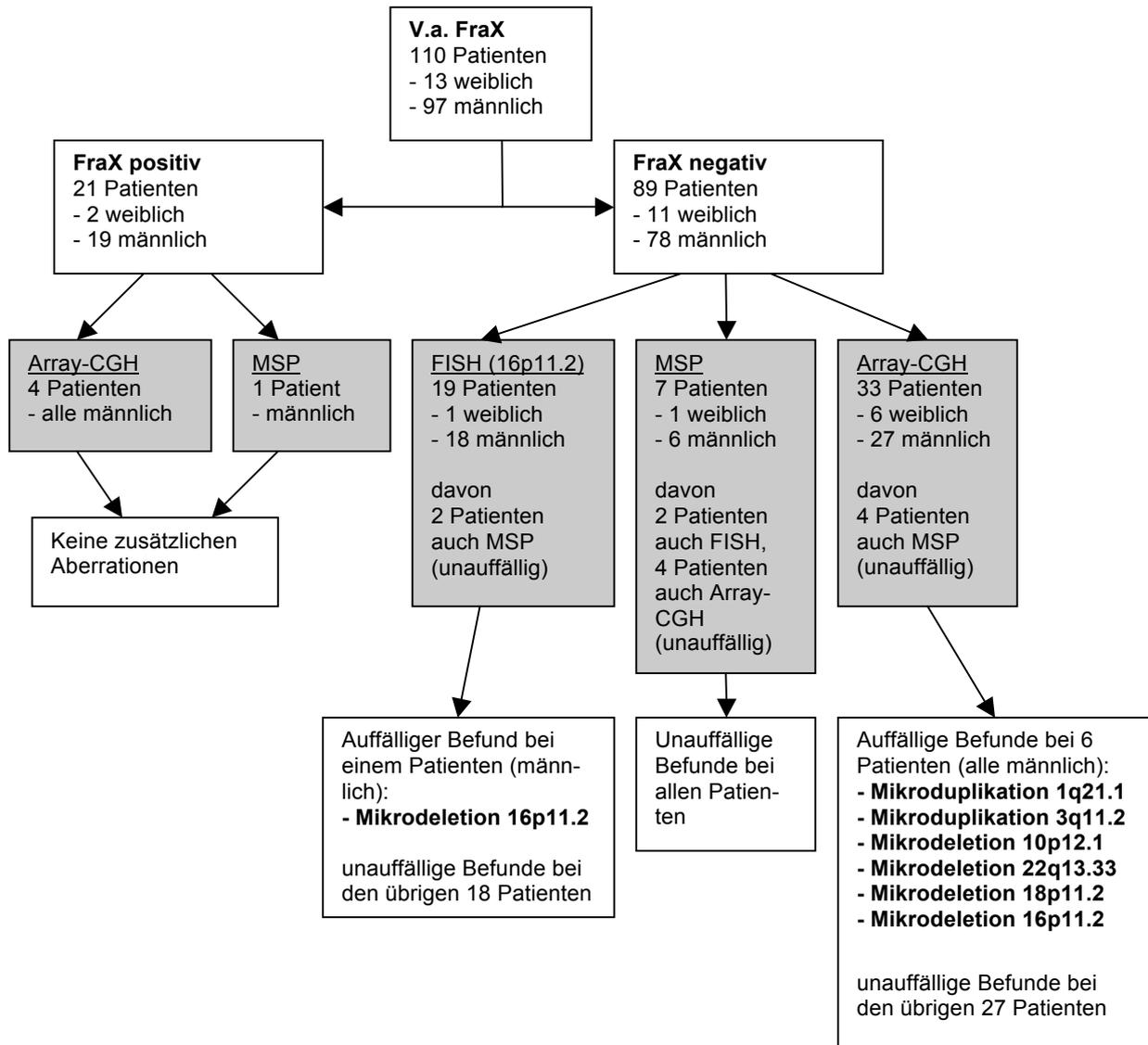


Abb. 14: Experimentelle Analysen: Das Kollektiv (alle Patienten mit V.a. FraX) wurde in zwei Gruppen (FraX-Positive- und FraX-Negative-Patienten) geteilt und in jeder Gruppe an ausgewählten Fällen weitere Labordiagnostik durchgeführt (diese Arbeit) bzw. vorliegende Befunde ausgewertet. Angegeben sind jeweils die Anzahl der Patienten, bei denen die Diagnostik durchgeführt wurde, ihr Geschlecht und die Ergebnisse. Überlappungen der diagnostischen Gruppen sind in den grauen Kästen mit aufgeführt. Bei den beiden Patienten mit den Mikrodeletionen 16p11.2 handelt es sich um unterschiedliche Patienten. MSP = methylierungsspezifische PCR

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, vorhandene Score-Systeme zum klinischen Screening auf ein FraX anhand eines Patientenkollektivs zu optimieren.

Im Rahmen weiterführender Labordiagnostik bei ausgewählten Patienten sollten außerdem die molekularen Ursachen der jeweiligen Phänotypen genauer untersucht und verschiedene Labormethoden miteinander verglichen werden (siehe 1.4).

4.1 Screening bei Verdacht auf das Fragile-X-Syndrom

4.1.1 Screeningmodelle und Score-Systeme aus der Literatur

Screeningmodelle, die auf Score-Systemen basieren, sind in diversen Studien [38, 39, 41, 80-82] getestet und als gutes Entscheidungskriterium für das weitere diagnostische Vorgehen beschrieben worden. Mithilfe der Score-Systeme lässt sich die Anzahl der durchgeführten Labordiagnostik vermindern, was zu einer deutlichen Reduktion der Kosten führt.

Ein Score-basiertes Screening soll einfach und zuverlässig sein. Es soll eine hohe Sensitivität aufweisen, d.h. möglichst alle FraX-Positiven-Patienten detektieren (mithilfe hoher Scorewerte). FraX-Negative-Patienten sollen hingegen so niedrige Werte erzielen, dass bei ihnen keine Labordiagnostik durchgeführt wird (hohe Spezifität).

Ein Problem schon vor dem eigentlichen Screening besteht darin, festzulegen, welche Kinder überhaupt anhand des Score-Systems eingeschätzt werden sollen. *Gabarron et al.* [82] fordern in ihrer Publikation ein Score-basiertes Routinescreening bei allen mental retardierten Kindern durchzuführen. Dies scheint generell sinnvoll zu sein. Als Voraussetzung müssen aber leicht anwendbare, qualitativ hochwertige Scores zur Verfügung stehen.

Alle bekannten Score-Systeme zeigten jedoch neben ihren Stärken auch Schwächen. Besondere Probleme bereitet die Einschätzung subjektiver Merkmale, die sich auf das Verhalten beziehen. Solche Merkmale sind zum Beispiel wenig Augenkontakt, Hyperaktivität oder autistische Verhaltensweisen. Aber auch ein langes, schmales Gesicht und andere körperliche Auffälligkeiten sind oft schwer objektivierbar. Dazu kommt, dass einige der in den bislang publizierten Scores berücksichtigten Merkmale, wie zum Beispiel eine Sydney-Linie,

auch in Fachkreisen oft wenig bekannt sind. Laut *Laing et al.* [80] lassen sich die interpersonellen Unterschiede in der Einschätzung subjektiver Merkmale durch Erfahrung und gute Schulung vermindern. Es ist nicht sinnvoll, Scorebögen ohne weitere Instruktionen an die Untersuchenden zu verteilen. Eine Schulung des Personals sollte generell im Rahmen der Einführung erfolgen.

Als weiteres Problem können sich Fragen zur Vorgeschichte, vor allem der Familienanamnese (FA), herausstellen. Diese wird von den meisten Untersuchern bereits zuverlässig erhoben, doch die Qualität und Vollständigkeit der Informationen sind sehr variabel. In vielen Familien sind wichtige Informationen nicht verfügbar, da nicht über die mentale Beeinträchtigung von Angehörigen gesprochen wird, vor allem dann, wenn keine eindeutige Diagnose bekannt ist. Teilweise sind auch aus mangelndem Kontakt keine Informationen vorhanden. Dies ist zum Beispiel oft der Fall, wenn Kinder in Pflegefamilien aufwachsen, was bei Kindern mit MR nicht selten ist. Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Erhebung ist die FA sehr wichtig. Sie stellt das Fundament der genetischen Beratung dar und sollte daher immer bestmöglich erhoben werden.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass selbst das sorgfältigste Screening anhand einer Checkliste eine darüber hinausgehende klinische Untersuchung und weitere Anamneseerhebung nicht ersetzen kann. Eine Detektion eventuell vorhandener zusätzlicher Merkmale ist wichtig, da diese diagnostisch richtungsweisend sein können.

Bei der Durchführung von Screeninguntersuchungen sollte darüber hinaus bedacht werden, dass diese eine unbekanntere, neue und schwierige Situation für das untersuchte Kind darstellen [80]. In einer hektischen, fremden Umgebung zeigt ein Kind unter Umständen nicht sein normales Verhalten. Gegebenenfalls können daher Verhaltensauffälligkeiten beim ersten Kontakt nicht sicher beurteilt werden. Gerade bei Kindern sind die Verhaltensauffälligkeiten aber besonders wichtig, da bei ihnen die körperlichen Merkmale eines FraX meist weniger spezifisch sind als bei älteren Patienten [39] (siehe 1.2.5). Bei fehlerhafter Einschätzung und Interpretation der Verhaltensweisen werden Betroffene mit einem – noch – milde ausgeprägten Phänotyp gegebenenfalls nicht erkannt.

Beim Vergleichen der verschiedenen Publikationen [38, 39, 41, 80-82] fällt auf, dass die angewandten Score-Systeme Unterschiede in der Merkmalsauswahl aufweisen (siehe Vergleich einiger Score-Systeme im Anhang, A1). Die Forscher haben die bestehenden Checklisten jeweils für das von ihnen untersuchte Kollektiv modifiziert.

4.1.2 Eigene Scores

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein solches modifiziertes Score-System für das untersuchte Patientenkollektiv zu erarbeiten. Dafür sollte zunächst die klinische Anwendbarkeit der vorhandenen Score-Systeme im untersuchten Patientenkollektiv überprüft werden. Der selbst erarbeitete Score sollte dann daraufhin untersucht werden, ob es durch seine Anwendung zu einer sicheren Detektion aller Betroffenen bei gleichzeitiger Reduktion der durchgeführten Tests gekommen wäre (siehe 1.4).

Die retrospektive Datenerhebung erwies sich, wie unter 3.1.2 erwähnt, als problematisch. Aufgrund der zum Teil schlechten Datenlage konnten sieben der ursprünglich 14 Merkmale nicht ausgewertet werden. Es wurde daraufhin ein Score bestehend aus drei (große und/oder dysplastische Ohren, positive FA für MR und SEV) und einer aus sechs Merkmalen (zusätzlich Hyperaktivität, Konzentrationsprobleme und autistische Züge) berechnet. Beide zeigten signifikante Unterschiede bezüglich der Punkteverteilung zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,020$ und $p = 0,002$). Diese Ergebnisse müssen jedoch, wie bereits im Ergebnis-Teil erwähnt (siehe 3.1.4), vorsichtig interpretiert werden, da aufgrund der Vorgehensweise die Gefahr eines statistischen „Overfittings“ besteht. Die Scores wurden anhand derselben Patienten validiert, an denen sie auch hergeleitet wurden. Dadurch sind niedrige p -Werte zu erwarten gewesen. Man müsste die Scores an einer unabhängigen Stichprobe validieren um statistisch zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.

Im Folgenden soll besonders auf den Sechs-Merkmals-Score genauer eingegangen werden. In der Abbildung 15 ist die Verteilung der Scorewerte über die beiden Gruppen (FraX-Positive-Patienten und FraX-Negative-Patienten) graphisch dargestellt. Die Graphik veranschaulicht, dass bei höheren Scorewerten eine größere Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis vorliegt. Auffällig sind die beiden FraX-Negativen-Patienten mit einem Scorewert von 12, während keiner der FraX-Positiven-Patienten diesen maximalen Scorewert erreichte. Bei den beiden FraX-Negativen-Patienten handelt es sich um die Patienten 38 und 75. Ihr Phänotyp ist besonders typisch für ein FraX, sie weisen aber keine entsprechenden Veränderungen im SB auf. Bei Patient 38 wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des typischen Phänotyps bei negativem Southern-Blot eine Array-CGH durchgeführt. Diese erbrachte ebenfalls ein unauffälliges Ergebnis. In der Literatur werden diverse Patienten beschrieben, bei denen ein typischer FraX-Phänotyp vorlag, aber keine Repeatexpansion nachgewiesen werden konnte [83-89]. Auf dieses Phänomen soll unter 4.2.3 noch genauer eingegangen werden.

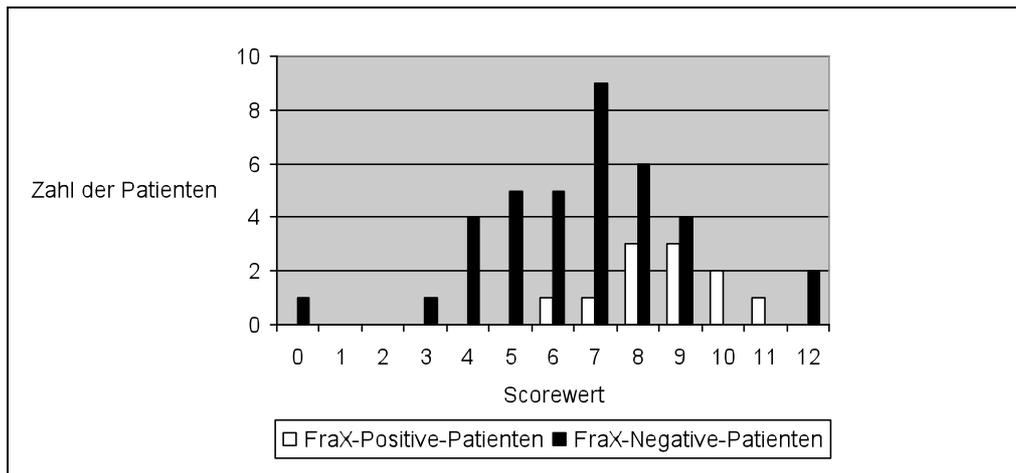


Abb. 15: Sechs-Merkmal-Score: Zahl der männlichen Patienten, die einen bestimmten Scorewert erreichten, im Vergleich zwischen den beiden Gruppen

Wäre analog zu einer anderen Publikation mit sechs Merkmalen [38] beim erarbeiteten Sechs-Merkmal-Score eine Grenze von ≥ 5 Punkten für die Labordiagnostik gezogen, wären 12,5% (42 statt 48) weniger Tests durchgeführt worden. Alle 11 FraX-Positiven-Patienten wären getestet und erkannt worden, so dass eine hohe Sensitivität von 100% vorgelegen hätte. Die Spezifität, d.h. die FraX-Negativen-Patienten, bei denen keine Labordiagnostik durchgeführt worden wäre, hätte jedoch nur 16,2% (6 von 37) betragen. Eine höhere Spezifität ließe sich durch einen höheren Grenzwert erreichen. Bei ≥ 8 Punkten als Grenze für die Labordiagnostik hätte die Spezifität 67,6% betragen. Statt der 37 FraX-Negativen-Patienten wären nur 12 getestet worden. Dies hätte aber auch zu einer Reduktion der Sensitivität auf 81,8% geführt. Zwei der FraX-Positiven-Patienten wären nicht in die Labordiagnostik einbezogen worden. Die Anzahl der durchgeführten Tests wäre von 48 auf 21 gesunken (56,2%). Im vorliegenden Fall ist eine hohe Sensitivität aber wichtiger als eine hohe Spezifität, damit bei möglichst vielen FraX-Positiven-Patienten eine Labordiagnostik und somit Diagnosestellung erfolgt. Daher wird empfohlen, die Grenze zunächst bei ≥ 5 Punkten zu legen. Zu bedenken ist, dass aufgrund des retrospektiven Studienaufbaus und der Stichprobengröße gegebenenfalls eine ungewünschte Selektion von Patienten erfolgt ist. Auf die außerdem vorliegende Gefahr eines statistischen „Overfittings“ wurde bereits eingegangen. Die angegebenen Werte sind daher nur als Tendenz zu betrachten. Es ist nicht auszuschließen, dass eine prospektive, multizentrische Studie in einem unabhängigen Kollektiv abweichende Werte erbringen könnte. Bei einer solchen Studie könnten nach vorausgehender Schulung der Untersucher eventuell zusätzliche Merkmale berücksichtigt werden. Es wäre dann zu testen, ob dadurch bei gleich bleibender Sensitivität die Spezifität erhöht werden könnte.

Als alleiniges Merkmal war im untersuchten Kollektiv nur die positive Familienanamnese signifikant. Auch in anderen Publikationen wird sie als besonders typisch beschrieben [38, 39,

82]. *Gabarron et al* [82] erwähnen, dass bei 28% ihrer Patienten mit positiver FA ein FraX nachweisbar gewesen sei. Im vorliegenden Kollektiv liegt dieser Wert sogar bei 38% (10 von 26). Das betont die bereits angesprochene große Relevanz dieses Merkmals, das von den meisten Untersuchern als sehr wichtig eingestuft und daher regelmäßig erhoben wird. Dies wurde auch aus der Ärzteumfrage deutlich. In Tabelle 11 (siehe 3.1.3) sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Die sechs wichtigsten Merkmale für die Ärzte waren MR, SEV, positive FA für MR, Hyperaktivität, große und/oder dysplastische Ohren und Konzentrationsprobleme. Diese sechs Merkmale entsprechen weitgehend dem Sechs-Merkmals-Score. Zusätzlich wurden autistische Züge aufgenommen, die bei den Ärzten mit 3,125 Punkten (von 5 möglichen Punkten) im Mittel auf dem 7. Rang liegen. Die befragten Ärzte bewerteten einen Makrozephalus (im Mittel 3,5 Punkte) und einen Makroorchidismus (im Mittel 3,143 Punkte) mit den Rängen 5 und 6 und somit als wichtigere Merkmale. Die Auswertung der erhobenen Patientendaten ergab aber, dass ein Makrozephalus nicht signifikant häufiger bei FraX-Positiven-Patienten als bei FraX-Negativen-Patienten aufzutreten scheint ($p = 0,268$; siehe 3.1.5, Tabelle 16). Prozentual lag sogar bei den FraX-Negativen-Patienten häufiger ein Makrozephalus vor (20,9%) als bei den FraX-Positiven-Patienten (5,6%). Es scheint, als sei eines der Merkmale, bei denen sofort an ein FraX gedacht wird, in Wirklichkeit gar nicht so typisch für den FraX-Phänotyp. Auch diese Werte können aufgrund der kleinen und selektierten Stichprobe aber nur als Tendenz angesehen werden und müssten im Rahmen weiterer Studien genauer untersucht werden.

Makroorchidismus tritt erst postpubertär auf [39]. Es wurde jedoch Wert darauf gelegt, einen Score zu entwickeln, der eine möglichst frühe Diagnosestellung ermöglicht. Daher wurde Makroorchidismus nicht weiter berücksichtigt. Unter 4.1.4 wird die Bedeutung der frühen Diagnosestellung noch einmal aufgegriffen.

Der Sechs-Merkmals-Score erwies sich also zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines FraX als statistisch relevant ($p = 0,002$) und deckte sich weitgehend mit den Einschätzungen der Untersuchenden. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Zahl der befragten Ärzte ($n = 8$) viel zu klein ist, als dass sich daraus eine statistische Relevanz ableiten ließe. Die Ergebnisse wurden daher nur nach den Mittelwerten in Ränge geordnet und diese als Trend betrachtet. Auf die Durchführung weitergehender statistischer Analysen wurde aus dem genannten Grund verzichtet.

Der Sechs-Merkmals-Score soll nun mit dem Score von *Giangreco et al* [38], der schon mehrfach zitiert und ebenfalls retrospektiv an Daten von jungen Patienten getestet wurde, verglichen werden. Neben den gemeinsamen Merkmalen (große und/oder dysplastische Ohren, positive FA, Hyperaktivität, autistische Züge, Konzentrationsprobleme/kurze Auf-

merksamkeitsspanne) werteten *Giangreco et al* [38] MR und ein langes, schmales Gesicht als zusätzliche Merkmale. Außerdem fassten sie Hyperaktivität und Konzentrationsprobleme als ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom) zusammen. MR wurde in dieser Arbeit als Einschlusskriterium für die Anmeldung zur Testung auf FraX definiert, so dass bei allen 48 Patienten, für die der Sechs-Merkmals-Score berechnet wurde, eine MR vorlag. Ein langes, schmales Gesicht ist, wie bereits erwähnt, ein sehr subjektives Merkmal, das im Kollektiv nur sehr selten dokumentiert wurde. Es wurden stattdessen autistische Verhaltensweisen mit in das Score-System aufgenommen, die recht typisch zu sein scheinen. Auch diese Verhaltensauffälligkeit wurde bereits als recht subjektives Merkmal beschrieben. Zum einen lässt sie sich jedoch einfacher – durch spezielle Tests – objektivieren als die Gesichtsform, zum anderen wurde bereits betont, wie wichtig gerade Verhaltensauffälligkeiten für die Einschätzung bei Kindern sind.

Tabelle 18: Vergleich des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Sechs-Merkmals-Scores mit dem von *Giangreco et al.* [38] und den Ergebnissen der Ärzteumfrage (hier Top-6)

	Sechs-Merkmals-Score	six-item-score [38]	Ärzte
große/dysplastische Ohren			
positive FA			
Hyperaktivität		ADHS	
Aufmerksamkeitsdefizit		ADHS	
MR			
SEV			
autistische Züge			
langes/schmales Gesicht			

Die jeweils verwendeten Merkmale sind grau hinterlegt, im Kasten sind die bei allen vorkommenden Merkmale hervorgehoben.

Mit dem Sechs-Merkmals-Score wurde ein statistisch relevanter, kurzer Score entwickelt, der typische, relativ gut zu erfassende Merkmale berücksichtigt. Weitere prospektive Studien zur Anwendung des Scores sind notwendig. Dabei sollten Scorewerte von ≥ 5 als Eingangskriterium für die Labordiagnostik betrachtet werden (zur Labordiagnostik bei Verdacht auf FraX siehe 4.2).

4.1.3 Labortests als Alternative

Nolin et al. [90] fordern die Entwicklung eines einfachen, kostengünstigen und sicheren Labortests als mögliche Screening-Alternative zu den Score-Systemen.

Zum Zeitpunkt ihrer Publikation (1992) wurde das FraX meist noch zytogenetisch diagnostiziert. Erst kurz zuvor war es *Verkerk et al.* gelungen, das *FMR1*-Gen zu identifizieren [26],

was den molekulargenetischen Nachweis des FraX mittels Southern-Blot ermöglichte. Bereits 1993 wurde der Southern-Blot (SB) als Goldstandard zur Diagnostik des FraX in den Guidelines der *National Fragile X Foundation* aufgeführt [91]. Als Screening wurde der Southern-Blot in den nachfolgenden Jahren jedoch nicht eingesetzt, da er zu zeitaufwändig, kosten- und arbeitsintensiv ist. Ein Nachteil des SB ist außerdem, dass Repeatlängen < 100, die im Bereich einer Prämutation liegen, nicht sicher detektiert werden können. Gerade das Erkennen von Prämutationen ist jedoch ein wichtiger Aspekt für die genetische Beratung. Alternativ gibt es PCR-Methoden, mit denen sich auch Repeatlängen < 100 nachweisen lassen. Diese zeigen jedoch Schwächen beim Nachweis von Vollmutationen und Mosaiken. Sie eignen sich besonders als kostengünstiger, schneller erster Schritt der Labordiagnostik, an den sich gegebenenfalls ein SB anschließt [92]. Aktuell wird versucht modifizierte PCR-Methoden mit neuen Polymerasen und Primern zu entwickeln, um ein besseres Screening zu ermöglichen [93-95].

Parallel wird an der Möglichkeit eines immunologischen Screenings mit FMRP-Antikörpern gearbeitet [93, 96]. FMRP ist das Genprodukt des *FMR1*-Gens, dessen Expression bei Vollmutationsträgern vollständig unterdrückt ist (siehe 1.2.2) [29]. Ein Antikörper-basiertes Screening wäre im Verdachtsfall einfach und schnell anwendbar. Der Grad der FMRP-Expression in Kombination mit der zugehörigen mRNA scheint darüber hinaus prognostische Relevanz zu haben [97]. Die beschriebene Methode könnte somit in Zukunft auch zur Vorhersage des zu erwartenden klinischen Verlaufs eingesetzt werden.

Bislang gibt es noch keine gute Labormethode, um das klinische Screening vollständig zu ersetzen. In Zukunft könnten Labormethoden jedoch an die Stelle der Score-Systeme treten und diese in ihrer Bedeutung übertreffen. Dadurch ließen sich die genannten Probleme bei der klinischen Anwendung von Score-Systemen umgehen.

Zunächst bleibt eine sichere Diagnostik aller Betroffenen mit FraX schwierig. *Stoll et al.* verdeutlichen diese Problematik an verschiedenen Patienten [98]. Sie machen ähnliche Probleme für die oft verzögerte Diagnosestellung verantwortlich, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit aufgefallen sind. Unter anderem nennen sie folgende typische Fehlerquellen: unspezifische körperliche Merkmale besonders bei Kindern, zum Teil unvollständige Untersuchung und Dokumentation und eine scheinbar unauffällige FA durch Mangel an Informationen. Die Autoren fordern daher eine Testung im Hinblick auf das FraX bei allen Kindern mit MR oder Entwicklungsverzögerungen unklarer Genese sowie bei autistischen Verhaltensweisen.

Aus Kostengründen scheint es jedoch sinnvoll, zunächst eine Prädiagnostik zum Beispiel anhand eines Score-Systems durchzuführen. Solange keine einfachen und kostengünstigen

Screeningmethoden im Labor zur Verfügung stehen, scheint dies die sinnvollste Herangehensweise. Der erarbeitete Sechs-Merkmals-Score scheint für diese Zwecke gut geeignet zu sein. Vor einer breiten klinischen Einführung müsste dies jedoch noch durch weitere Studien belegt werden.

4.1.4 Bedeutung der frühzeitigen Diagnosestellung

Die wichtigste Bedeutung einer frühzeitigen Diagnosestellung beim FraX liegt in der dann verbesserten Grundlage der genetischen Beratung. Sobald die Diagnose FraX bei einem Familienmitglied gestellt ist, kann den übrigen Angehörigen eine Diagnostik auf das Vorliegen von Veränderungen, vor allem im Sinne einer Prämutation, angeboten werden. Basierend auf deren Ergebnissen kann gezielt bei Kinderwunsch beraten und gegebenenfalls eine Pränataldiagnostik durchgeführt werden. Die meisten Fachärzte für Humangenetik halten laut *Acharya et al.* [99] ein präkonzeptionelles Screening für die sinnvollste Methode. Ein präkonzeptionelles Screening in betroffenen Familien ist billiger als eine pränatale Diagnostik und beinhaltet nicht deren Risiko [100]. Darüber hinaus lässt es mehr Zeit für die genetische Beratung und gibt Risikopaaren die Möglichkeit, bei Kinderwunsch andere Optionen zu bedenken [101].

Würde man allen Frauen mit > 60 Repeats, die sich für eine Schwangerschaft entscheiden, ein Pränatalscreening anbieten, würde man in einem von drei Fällen einen positiven FraX-Befund erhalten [101]. Damit sind die generellen Anforderungen an ein Pränatalscreening erfüllt, die besagen, dass das Risiko des Eingriffs nicht größer sein sollte als die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines positiven Befundes [102].

Bislang gibt es keine kausale Therapie des FraX. Eine frühzeitige Diagnosestellung ermöglicht eine symptomorientierte Frühförderung, bei der die Sprachtherapie eine besondere Rolle spielt. Verhaltensauffälligkeiten können medikamentös zum Beispiel mit Antidepressiva oder Neuroleptika beeinflusst werden.

Zurzeit wird eine neue Therapie entwickelt, die so genannte mGluR-Therapie. Es scheint, als könnten mGluR-Antagonisten die Funktion des fehlenden FMRP übernehmen. Man hofft dadurch, die neuronalen Störungen verhindern oder sogar rückgängig machen zu können [30]. Die Möglichkeit einer pharmakotherapeutischen Beeinflussung der kognitiven Funktionen bei FraX würde einer frühzeitigen Diagnosestellung eine vollkommen neue Bedeutung zukommen lassen.

4.2 Labordiagnostik bei Verdacht auf das Fragile-X-Syndrom

Oft wird bei unklarer Entwicklungsverzögerung und Lernproblemen neben der Zytogenetik generell eine Testung auf das FraX durchgeführt. Ein solches Vorgehen wird zum Beispiel auch von *Moeschler et al.* [103] vorgeschlagen (siehe 4.4 und Abbildung 16).

Unter 4.1 wurde die Anwendung von Score-Systemen kritisch beleuchtet und ein Sechsmerkmal-Score vorgeschlagen, um die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines FraX abschätzen zu können. Bei allen Patienten mit Scorewerten ≥ 5 sollte eine Testung auf das FraX erfolgen. Bei niedrigeren Scorewerten sollten gegebenenfalls andere diagnostische Schritte, wie zum Beispiel eine Array-CGH, erwogen werden.

4.2.1 Southern-Blot und PCR

Unter 1.2.3 wurde bereits das heute übliche diagnostische Vorgehen mittels Southern-Blot (SB) und PCR beschrieben.

Besonders bei Verdacht auf das Vorliegen von Prämutationen scheint es sinnvoll, zunächst eine PCR durchzuführen. Damit können, wie bereits beschrieben, auch kleine Repeatexpansionen nachgewiesen werden. Bei unauffälligem Ergebnis sollte eine Diagnostik mittels SB angeschlossen werden, die im Gegensatz zur PCR auch eine sichere Detektion von Mosaiken erlaubt. Darüber hinaus kann mittels SB auch der Methylierungsstatus untersucht werden.

Da alle verfügbaren Methoden Schwächen aufweisen, empfehlen *Cecconi et al.* [104] die generelle Durchführung von mehr als einer Methode. So sollte zum Beispiel auch bei bereits erkannten Auffälligkeiten mittels PCR ein SB durchgeführt werden, da auch falsch positive Fälle auftreten können [105].

Bei männlichen Patienten mit hohen Scorewerten kann gegebenenfalls direkt ein SB durchgeführt werden. Wenn sich keine Repeatexpansion nachweisen lässt, sollte eine weitere Diagnostik erwogen werden, die sich am spezifischen Phänotyp des Patienten orientiert.

4.2.2 Array basierte vergleichende genomische Hybridisierung

Die Array-CGH ermöglicht es, mit einem Test das ganze Genom auf Imbalancen zu untersuchen. Durch sie können bei ca. 10% der Patienten mit idiopathischer MR Veränderungen detektiert werden [15]. In den letzten Jahren wurden einige neue Mikrodeletionssyndrome

beschrieben, die mittels Array-CGH entdeckt wurden. Unter 4.3.1 werden einige dieser Mikrodeletionssyndrome beschrieben.

Die Array-CGH ist ein potenziell wichtiges Werkzeug für die Diagnostik, dessen Auswertung aber oft noch Schwierigkeiten bereitet [15]. Denn mittels Array-CGH wurde eine unerwartet große interindividuelle Varianz des menschlichen Genoms entdeckt. Über alle Chromosomenpaare verteilt liegen submikroskopische strukturelle Chromosomenveränderungen, die in Anzahl und Verteilungsmuster von Individuum zu Individuum variieren. Diese so genannten Copy number variants (CNV) sind per Definition mindestens 1000 bp (1 kb) groß, können aber auch Bereiche von 1 Mb und mehr umfassen. Meist handelt es sich um Deletionen und Duplikationen, die oft in Gen-armen Regionen liegen, aber auch in kodierenden Genen oder regulatorischen Elementen auftreten. Die betroffenen Gene spielen meist keine Rolle in der Embryonalentwicklung, sondern in der Interaktion mit der Umwelt, wie dem Geruchssinn oder der Infektabwehr. So können CNVs eine komplexe Rolle in der Pathogenese multifaktorieller Erkrankungen spielen [106]. Man schätzt, dass das menschliche Genom circa 1500 CNV-Regionen umfasst, die circa 10% der menschlichen Erbinformationen ausmachen. Es ist noch unklar, wie viele CNVs „nur“ benigne Normvarianten darstellen [106]. Verschiedene Datenbanken fassen den jeweils aktuellen Stand der Wissenschaft zu Häufigkeit und Signifikanz der CNVs zusammen [61, 107]. Dennoch wirft das Entdecken eines CNVs bei einem bestimmten Patienten heute oft noch viele Fragen auf [106]. Eine Schwachstelle der Array-CGH ist außerdem, dass balancierte Chromosomenaberrationen, kleine Imbalancen und Mosaik nicht sicher detektiert werden können [63].

Trotz der genannten Schwachstellen wird die Array-CGH heute bereits in einigen Ländern, wie zum Beispiel den Niederlanden und England, als erster Untersuchungsschritt durchgeführt. In Deutschland werden zurzeit Leitlinien entwickelt, die die Rolle der Array-CGH in der Diagnostik festlegen sollen.

Bei 37 Patienten aus dem Kollektiv (n = 110) wurde eine Array-CGH durchgeführt. Alle waren zuvor mittels SB auf das FraX untersucht worden. Vier dieser 37 Patienten waren FraX-Positiv, die übrigen 33 FraX-Negativ. Fünf von diesen 33 Patienten (15,2%) hatten auffällige Befunde in der Array-CGH, die sich mittels FISH verifizieren ließen. Es wurde eine Mikroduplikation 1q21.1 und je eine Mikrodeletion in den Regionen 10p12.1, 22q13.33 [67], 18p11.2 und 16p11.2 nachgewiesen.

Für zwei der fünf Patienten ließ sich der Sechs-Merkmals-Score berechnen: Patient 93 mit der Mikrodeletion 22q13.33 erzielte einen Scorewert von 6 und Patient 98 mit der Mikrodeletion 18p11.2 einen Scorewert von 8. Bei beiden wäre anhand des Scores von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines FraX auszugehen gewesen. Unter 4.3.1.2 wird

noch einmal genauer auf die Auffälligkeiten bei dem Patienten 93 eingegangen, da es sich bei der nachgewiesenen Aberration um ein bekanntes Mikrodeletionssyndrom handelt. Die beim Patienten 98 gefundene Mikrodeletion 18p11.2 ist bislang noch nicht beschrieben worden, so dass eine kausale Verknüpfung zwischen Genotyp und Phänotyp nicht sicher hergestellt werden kann. Dafür müssten in Zukunft noch weitere Patienten mit dieser Veränderung und ähnlichem Phänotyp beschrieben werden.

Für die drei übrigen Patienten konnte nur der Drei-Merkmals-Score berechnet werden, da wichtige Angaben zu Verhaltensauffälligkeiten nicht verfügbar waren. Patient 32 mit der Mikroduplikation 1q21.1 und Patient 99 mit der Mikrodeletion 16p11.2 erzielten hier beide 2 Punkte, somit war das Vorhandensein eines FraX bei ihnen eher unwahrscheinlich. Patient 64 mit der Mikrodeletion 10p12.1 erzielte hingegen einen Scorewert von 6, womit ein FraX sehr wahrscheinlich war. Der Patient 99 wird im Anhang (A5) ausführlich vorgestellt.

Die Auffälligkeiten von Patient 32 werden unter 4.3.1.3 genannt, da bei ihm eine Veränderung im Bereich eines bekannten Mikroduplikationssyndroms vorliegt. Die beim Patienten 64 gefundene Mikrodeletion 10p12.1 ist bislang noch nicht beschrieben worden. Da die Mutter des Patienten die gleiche Veränderung trägt und ebenfalls mental beeinträchtigt ist, ist jedoch von einem Kausalzusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp auszugehen. Wie bei der Mikrodeletion 18p11.2 sind jedoch noch weitere Fälle nötig, um einen typischen Phänotyp dieser Mikrodeletion beschreiben zu können.

Bei dem Patienten 24 zeigte sich in der Array-CGH eine 1,590 Mb große Duplikation in 3q11.2 (siehe 3.2.1, Abbildung 9). Nach aktuellem Stand liegen einzelne kleine CNVs im Bereich der Duplikation. Es sind aber auch Abschnitte betroffen, für die keine CNVs bekannt sind. Als nächster diagnostischer Schritt wäre eine Array-CGH bei beiden Eltern indiziert, da sich solch kleine Duplikationen mittels FISH oft nicht sicher nachweisen lassen. Über die Auswirkungen der Duplikation auf den Phänotyp des Patienten können bislang keine Aussagen gemacht werden. Darüber hinaus gibt es kein beschriebenes Mikroduplikationssyndrom für die Region 3q11.2.

Zusammenfassend wurde bei 37,1% der FraX-Negativen-Patienten (33 von 89) eine Array-CGH durchgeführt. Von den Untersuchten hatten 15,2% (5 von 33) auffällige und verifizierbare Befunde, was der in der Literatur beschriebenen Detektionsrate von ca. 10% entspricht [15]. Unter den Aberrationen waren zwei Mikrodeletionen und eine Mikroduplikation, die im Bereich bekannter Syndrome liegen.

Bei Patienten, bei denen keine Repeatexpansion nachgewiesen werden kann, ist die Durchführung einer Array-CGH somit ein sinnvoller anschließender Schritt. Besonders im Zusam-

menhang mit SEV und autistischen Verhaltensweisen ist an das Vorliegen einer submikroskopischen Chromosomenabberation zu denken (siehe auch 4.3.1).

Direkt eine Array-CGH durchzuführen, kann bei atypischen Phänotypen oder Phänotypen, die auf beschriebene Mikrodeletions- oder -duplikationssyndrome hinweisen, erwogen werden. Bei Patienten mit einem typischen FraX-Phänotyp sollte insbesondere bei positiver FA für MR aber zunächst ein SB durchgeführt werden.

4.2.3 Typischer Fragiles-X-Phänotyp ohne Repeatexpansion

Zwei Patienten, bei denen keine Repeatexpansion mittels SB nachweisbar war, erzielten den Höchstwert von 12 Punkten im Sechs-Merkmals-Score (siehe 4.1.2).

Von anderen Wissenschaftlern sind bereits ähnliche Fälle beschrieben worden, bei denen ein typischer Phänotyp ohne Repeatexpansion vorlag [83-89]. Als Ursachen solcher so genannter Phänokopien sind folgende Mechanismen beobachtet worden:

- Deletionen im Bereich des *FMR1*-Gens [83-87]
- Punktmutationen im *FMR1*-Gen [88]
- Erworbene Läsionen des zentralen Nervensystems (ZNS) [89]

Von den beobachteten Deletionen im Bereich des *FMR1*-Gens waren immer die proximalen Exons einschließlich der Promotorregion und/oder des CGG-Repeats betroffen [83-87]. Die Länge variierte zwischen 1 bp und > 9 Mb. *De Graaff et al.* [46] bezeichnen die CpG reiche Region vor dem *FMR1*-Gen als „hot spot“ für solche Mutationen. Phänotypisch können aus den Mutationen neben einem typischen FraX-Phänotyp auch atypische Auffälligkeiten oder ein PWS-ähnlicher Phänotyp resultieren [87].

Eine der kleineren Deletionen wurde zum Beispiel von *Wöhrle et al.* [84] beschrieben. Sie berichten von einem Patienten mit Entwicklungsverzögerungen, SEV, fazialen Dysmorphien und Makroorchidismus, bei dem sie eine < 250 kb große Deletion nachweisen konnten, die die ersten Exons des *FMR1*-Gens betraf. Die Mutation konnte auch bei der Mutter des Patienten und deren Schwester nachgewiesen werden, die beide heterozygot und phänotypisch unauffällig waren.

Ein Patient mit atypischem Phänotyp wurde zum Beispiel von *Quan et al.* [108] beschrieben. Bei diesem Patienten lag ein FraX-Phänotyp kombiniert mit Adipositas und Analatresie vor. Eine große Deletion des gesamten *FMR1*-Gens mit ≥ 9 Mb umgebender DNA konnte bei ihm nachgewiesen werden. Die Bruchpunkte lagen bei Xq26.3 und Xq27.3. Diese Mutation war beim Großvater mütterlicherseits entstanden und über die phänotypisch unauffällige Mutter an ihren Sohn vererbt worden.

Kürzlich berichteten *Cecconi et al.* [104] von so genannten „Pseudodeletionen“ im *FMR1*-Gen. Bei einer gesunden Frau mit positiver FA für MR wurde eine Guanin (G) zu Cytosin (C) Umwandlung im CGG-Repeat nachgewiesen, die im Southern-Blot zu einem kürzeren Fragment von 2,5 kb statt 2,8 kb führte und so das Bild einer Deletion mimte. Ein solcher Austausch einer Purinbase (Guanin oder Adenin) gegen eine Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin) wird auch als Transversion bezeichnet. Die Autoren konnten nachweisen, dass es sich bei dieser Veränderung um einen stillen Polymorphismus handelt, der bei ca. 1% der Bevölkerung auftritt. Sie betonen, dass Transversionen an anderen Positionen gegebenenfalls Veränderungen in der Struktur von mRNA und DNA nach sich ziehen können, aus denen auch pathologische Phänotypen resultieren können. So berichten zum Beispiel *Tarleton et al.* [109] von einem Jungen, bei dem eine Einzelbasensubstitution im CGG-Repeat zu milder Entwicklungsverzögerung und SEV führte. Bei diesem Jungen war ebenfalls eine Transversion von G zu C aufgetreten. In seinem Fall führte sie zu einer um 24% reduzierten FMRP-Expression, die vermutlich für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist.

Eine Punktmutation im *FMR1*-Gen konnten *De Boulle et al.* [88] bei einem Patienten mit stark ausgeprägter MR mit SEV, fazialen Dysmorphien und Makroorchidismus nachweisen. Durch einen neu aufgetretenen Basenaustausch von Thymin (T) zu Adenin (A) an Stelle 1100 in der *FMR1*-Sequenz kam es zu einer Substitution von Isoleucin durch Asparagin (Ile367Asn). Der Junge war durch diese Punktmutation schwerer klinisch beeinträchtigt als die meisten Patienten mit typischen Repeatexpansionen oder viele der beschriebenen Patienten mit Deletionen im *FMR1*-Gen. Als mögliche Ursache für die schwerwiegenden Beeinträchtigungen des Jungen diskutieren die Autoren einen eventuell auftretenden Proteinsuizidalen Effekt durch die *FMR1*-Mutante. Sie schlagen vor, bei Patienten mit typischem Phänotyp für FraX ohne Repeatexpansion das *FMR1*-Gen zu sequenzieren.

Es wurde im Rahmen der Diskussion bereits vorgeschlagen, mental retardierte Patienten ohne Repeatexpansion mittels Array-CGH zu untersuchen. Mit dieser Untersuchung könnten die größeren Deletionen im Bereich des *FMR1*-Gens entdeckt werden, jedoch nicht Punktmutationen und sehr kleine Deletionen. Um auch diese zu detektieren, müsste eine Sequenzierung des *FMR1*-Gens durchgeführt werden. Es bietet sich daher an, bei Patienten mit typischem FraX-Phänotyp ohne Repeatexpansion eine Sequenzierung des *FMR1*-Gens durchzuführen. Bei eher untypischem Phänotyp sollte, wie unter 4.2.2 dargestellt, eine Array-CGH durchgeführt werden.

Erworbene Läsionen des Zentralnervensystems können in seltenen Fällen auch das Erscheinungsbild des FraX verursachen. *Fryns et al.* [89] berichten von einem Mann mit Hypothalamus-Tumor und von zwei Männern mit peri- oder postnataler Hirnschädigung. Bei allen

drei Männern konnten Merkmale des FraX wie Makroorchidismus und die typischen fazialen Dysmorphien beobachtet werden.

Auch im untersuchten Kollektiv fielen Patienten auf, deren Phänotyp besonders typisch für ein FraX ist, bei denen aber keine Repeatexpansion nachgewiesen werden konnte. Unter 4.1.2 wurden bereits zwei Patienten (Nr. 38 und 75) erwähnt, die zu der Gruppe der FraX-Negativen-Patienten gehörten, aber den maximalen Scorewert von 12 im Sechs-Merkmal-Score erzielten. Beide wiesen neben der MR folgende Merkmale auf: große und/oder dysplastische Ohren, positive Familienanamnese für MR, SEV, Hyperaktivität, Aufmerksamkeitsdefizit und autistische Verhaltensweisen. Bei beiden wurde außerdem eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie beobachtet. Patient 38 hat zusätzlich einen Makrozephalus und faziale Dysmorphiezeichen, wie ein langes Kinn und ein flaches Philtrum. An weiteren Auffälligkeiten sind bei ihm beidseits vorhandene Sandalenfurchen und auffällige Pigmentnävi sowie zwei Café-au-lait-Flecken am Rücken beschrieben worden. Bei diesem Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Array-CGH durchgeführt, die unauffällige Ergebnisse erbrachte. Größere Deletionen im *FMR1*-Gen sind bei diesem Patienten folglich mit großer Sicherheit ausgeschlossen. Um Punktmutationen und kleine Deletionen sicher auszuschließen, müsste zusätzlich die bereits angesprochene Sequenzierung des *FMR1*-Gens erfolgen. Bei dem Patienten 75 wurde bislang keine Array-CGH durchgeführt. Dies und ggf. auch eine Sequenzierung sollte aber im Rahmen der weiteren diagnostischen Abklärung erwogen werden.

4.2.4 Fragiles-X-Syndrom mit zusätzlichen chromosomalen Aberrationen

Es wurden vier Patienten aus der Gruppe der FraX-Positiven-Patienten mittels Array-CGH auf zusätzliche Aberrationen, wie zum Beispiel Mikrodeletionen, untersucht (Nr. 11, 14, 15 und 19). Die Untersuchung erbrachte bei allen vier Patienten unauffällige Befunde.

Bei Patienten mit einem Down-Syndrom (Trisomie 21, DS) sind Fälle bekannt, in denen zusätzliche Aberrationen aufgetreten sind und zum Teil zur Variabilität des Krankheitsbildes beigetragen haben. *Koulišcher et al.* berichten zum Beispiel von einer Patientin mit DS und zusätzlicher Deletion des kurzen Armes von Chromosom 5 [110]. Die Deletion führt zu einer partiellen Monosomie 5p, die klinisch im so genannten Cri-du-Chat-Syndrom resultiert. Das charakteristische Merkmal betroffener Kinder ist ein eigentümliches Wimmern und schrilles Schreien. Zusätzlich treten typische kraniofaziale Dysmorphien auf. Bei der von *Koulišcher et al.* beschriebenen Patientin konnten jedoch keine Zeichen dieses Syndroms entdeckt wer-

den. Phänotypisch lag bei ihr das Bild eines DS vor. *MacFaul et al.* beschreiben Patientinnen mit Down-Turner-Mosaik, die hauptsächlich die phänotypischen Merkmale eines DS aufwiesen [111]. Bei einigen Patientinnen konnten jedoch auch zusätzliche Auffälligkeiten, wie eine Nackenfalte und neonatale Lymphödeme beobachtet werden, die typisch für ein Turner-Syndrom sind. Die beschriebenen Fälle legen nahe, dass das Auftreten zusätzlicher Aberrationen möglich ist und diese sich auch phänotypisch auswirken können.

Bislang sind noch keine ähnlichen Fälle bei FraX-Patienten publiziert worden. Da im Rahmen dieser Arbeit nur vier Patienten aus der Gruppe der FraX-Positiven-Patienten mittels Array-CGH untersucht wurden, kann die Frage, ob zusätzliche Aberrationen, wie Mikrodeletionen, auftreten und zur Variabilität des Krankheitsbildes beitragen können, nicht sicher beantwortet werden. Um genauere Informationen zu erhalten, müsste eine größere Gruppe von FraX-Patienten auf zusätzliche genetische Veränderungen untersucht werden.

4.3 Differentialdiagnosen zum Fragilen-X-Syndrom

4.3.1 Mikrodeletionssyndrome als Differentialdiagnose

Mikrodeletionen wurden in den vergangenen Jahren vor allem im Zusammenhang mit Autismus und SEV beschrieben. Autismus (OMIM [18] 209850) ist eine Entwicklungsstörung, die meist im Alter von 3 Jahren auffällig wird. Die typische Trias besteht aus verminderter bis fehlender verbaler Kommunikation, reduzierter bis fehlender sozialer Interaktion und stereotypen, ritualisierten Verhaltensweisen und Interessen [112, 113]. Es sind verschiedene Loci beschrieben worden, die mit einem mehr oder weniger stark ausgeprägten Phänotyp assoziiert sind. 14 bekannte Loci liegen auf den Autosomen, drei auf dem X-Chromosom [18]. Auch das FraX geht oft mit autistischen Verhaltensweisen einher. Das Vollbild ist in diesem Zusammenhang jedoch eher untypisch.

Die bekannten Mikrodeletionssyndrome sind zum Teil mit einem spezifischen Phänotyp assoziiert. Eine zielgerichtete Diagnostik ist daher oft möglich, setzt aber entsprechendes diagnostisches Wissen beim behandelnden Arzt voraus. Verkompliziert wird die Diagnostik dadurch, dass viele Mikrodeletionssyndrome noch weitgehend unbekannt sind und bei den bekannteren Syndromen zum Teil atypische Phänotypen auftreten [114]. Neben Deletionen wurden auch Duplikationen beschrieben. Diese sind oft noch schwieriger zu diagnostizieren,

da sie meist mit einem milderem Phänotyp und einer geringeren Penetranz, d.h. Manifestationswahrscheinlichkeit, einhergehen [115].

Bei von phänotypisch unauffälligen Eltern vererbten Imbalancen sind diese bislang meist als nicht ursächlich für Auffälligkeiten beim Kind betrachtet worden. Bei einigen der neu entdeckten Syndrome scheint eine Vererbung von unauffälligen Eltern an betroffene Kinder hingegen geradezu typisch zu sein. Als ursächlich für dieses Phänomen einer so genannten inkompletten Penetranz werden seltene epigenetische Mechanismen diskutiert. Auch bislang unbekannt Mechanismen scheinen möglich.

Bei den im Folgenden beschriebenen Syndromen handelt sich um mögliche Differentialdiagnosen des FraX, die besonders bei SEV und Autismus erwogen werden sollten.

4.3.1.1 Mikrodeletion 16p11.2

Unter 1.3.2.1 wurde bereits auf die Mikrodeletion 16p11.2 eingegangen, die im Jahre 2005 erstmalig beschrieben wurde [49]. Es scheint für 1% der Fälle von Autismus ursächlich zu sein (AUTS14, OMIM 611913). Die meisten der beschriebenen Patienten sind außerdem mental retardiert und entwicklungsverzögert, mit Betonung der Sprachentwicklung [56].

Bei zwei Patienten aus dem Kollektiv (Nr. 36 und 99) wurde eine solche Mikrodeletion im kurzen Arm von Chromosom 16 nachgewiesen. Die beiden werden im Anhang (A5) genauer vorgestellt. Beim Vergleich der beiden Patienten mit den ursprünglich in der Literatur beschriebenen Patienten fällt auf, dass zwar bei beiden eine SEV vorliegt, jedoch kein Autismus. Beim Patienten 99 wurde zwar ursprünglich der Verdacht auf Autismus gestellt, das Vollbild mit der oben genannten Trias konnte aber ausgeschlossen werden. Beide Patienten sind global entwicklungsverzögert mit besonderer Betonung der Sprachentwicklung und zeigen einige faziale und körperliche Dysmorphien, die jedoch nicht wegweisend sind. Darüber hinaus liegt bei beiden eine Sehschwäche vor.

Die Phänotypen der beschriebenen Patienten sind also eher untypisch für ein Mikrodeletionssyndrom 16p11.2. Auch *Bijlsma et al.* [116] beobachteten eine große Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes. Sie berichten von einem weiten Spektrum klinischer Auffälligkeiten, das von MR mit oder ohne multiple Anomalien über Autismus, SEV und Lernprobleme bis hin zu normalen Phänotypen reicht. Würde eine gezielte Diagnostik auf diese Veränderung nur bei Patienten mit nachgewiesenem Autismus durchgeführt, würden viele Fälle, wie auch die beiden vorgestellten, nicht entdeckt werden. Es bietet sich daher an, die Diagnostik auch bei Patienten mit SEV durchzuführen. Da noch andere Mikrodeletionssyndrome mit SEV assoziiert sein können, scheint die Array-CGH in diesem Fall der beste diagnostische Schritt zu sein. Alternativ kann die Diagnostik der Mikrodeletion 16p11.2 mittels FISH

mit den in dieser Arbeit verwendeten Sonden CTD-2515O10 und RP11-727C18 durchgeführt werden.

4.3.1.2 Mikrodeletion 22q13.3

Bei dem Patienten 93 konnte mittels Array-CGH eine 1,5 Mb große Deletion in 22q13.3 nachgewiesen werden, die als Mosaik vorliegt [67]. Die Eltern dieses Patienten seien entfernt konsanguin, es bestehe aber keine positive FA für MR. Der Patient selbst weist eine MR mit ausgeprägter SEV auf. Er ist hyperaktiv und seine Aufmerksamkeitsspanne ist vermindert. Körperlich auffällig sind eine Hypertrichose, Syndaktylien zwischen den Zehen, Café-au-lait-Flecken und ein Strabismus. Eine neonatale Hypotonie oder autistische Züge wurden nicht beschrieben. Auch ist dieser Patient eher klein und leicht (mit 7 6/12 Jahren Körpergröße und Gewicht zwischen P10 und P25). Phänotypisch ist dieser Patient eher untypisch für das Mikrodeletionssyndrom 22q13.3.

Der typische Phänotyp des Mikrodeletionssyndroms 22q13.3, auch Phelan-McDermid-Syndrom genannt, zeichnet sich durch folgende Merkmale aus: neonatale Hypotonie, globale Entwicklungsverzögerung, normales bis gesteigertes Wachstum, stark verzögerte bis fehlende Sprachentwicklung, autistische Verhaltensweisen und milde Dysmorphiezeichen [75, 117-119].

Die Größe der Deletion weist eine große Variabilität auf. Sie kann zwischen 160 kb und 9 Mb variieren. Bei großen Deletionen ≥ 5 Mb ist meist eine zytogenetische Diagnostik möglich. Unabhängig von der Größe der deletierten Region wurde bei fast allen betroffenen Patienten eine MR und SEV beobachtet. Kleinere Variationen des Phänotyps abhängig von der Größe der deletierten Region sind aber möglich [120].

In 74% der bekannten Fälle liegt die Deletion auf dem väterlichen Chromosom 22. Als betroffene Gene wurden *SHANK3*, *ACR* und *RABL2B* identifiziert [77]. *Durand et al.* [117] konnten nachweisen, dass eine Verminderung des *SHANK3*-Genproduktes zu schweren kognitiven Defiziten führt. Neben einfachen Deletionen wurde auch von Mosaiken und Kombinationen aus Deletionen und Duplikationen berichtet [78].

4.3.1.3 Mikroduplikation 1q21.1

Bei dem Patienten 32 wurde eine 5,3 Mb große Duplikation in 1q21.1 gefunden. Auch die phänotypisch unauffällige Mutter ist Trägerin dieser Veränderung. Bei dem Patienten liegt eine MR mit SEV vor. Darüber hinaus sind eine Makrosomie und faziale Dysmorphien beschrieben. Im Alter von 3 11/12 Jahren war der Patient 114 cm groß (P >97) und 19,8 kg schwer (P 90). Der Kopfumfang lag bei 54 cm (P 97). Phänotypisch präsentiert dieser Patient

das typische Bild der Mikroduplikation in diesem Bereich. Lediglich Autismus oder autistische Verhaltensweisen wurden nicht beschrieben.

Mikroduplikationen in 1q21.1 wurden 2007 erstmalig beschrieben [71]. Typische phänotypische Merkmale sind milde-moderate MR und milde faziale Dysmorphien. Die Patienten sind meist makrozephal [72]. Als dafür verantwortliches Gen konnte *HYDIN2* identifiziert werden. Dies ist ein dosisabhängiges Gen, das in der veränderten Region liegt. Die gesteigerte Genodosis bei Duplikationen führt zum Makrozephalus [73]. Außerdem sind Autismus bzw. autistische Verhaltensweisen typisch [72]. *Itsara et al.* [57] wiesen auch eine Assoziation mit Schizophrenie nach. Die Mikroduplikationen in diesem Bereich werden oft von phänotypisch unauffälligen oder gering betroffenen Eltern an ihre Kinder vererbt [73].

Die beim Patienten 32 nachgewiesene Mutation überlappt mit der Region rekurrenter Duplikationen, ist jedoch wesentlich größer. Nach aktuellem Wissensstand kann im beschriebenen Fall daher nicht sicher von einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation ausgegangen werden.

4.3.2 Atypisches Prader-Willi-Syndrom als Differentialdiagnose

Neben den Mikrodeletionssyndromen wurde auch eine atypische Ausprägung des PWS als mögliche Differentialdiagnose in Betracht gezogen. Es gibt bislang noch keine Publikationen zu diesem Thema. Auch im untersuchten Kollektiv wurde unter den FraX-Negativen-Patienten kein Patient mit PWS gefunden. Es wurden jedoch nur sieben FraX-Negative-Patienten auf ein PWS untersucht. Die Ergebnisse dürfen daher nur mit Vorsicht interpretiert werden und lassen sich nicht generalisieren.

De Vries et al. [45] haben den entgegengesetzten Fall beschrieben (siehe auch 1.3.1.1). Sie berichten von Patienten mit PWS-ähnlichem FraX, konnten den zugrunde liegenden Mechanismus zunächst aber nicht aufdecken. Später berichteten *de Graaff et al.* [46] von einem Patienten mit einer Deletion im *FMR1*-Gen, der einen PWS-ähnlichen Phänotyp aufwies. Bei einem der ursprünglich beschriebenen Patienten [45] konnte bei Nachuntersuchungen eine ähnliche Mutation gefunden werden. Ein Teil der Fälle mit PWS-ähnlichem Phänotyp ist auf solche Veränderungen zurückzuführen, bei den übrigen konnte der Pathomechanismus bislang nicht aufgedeckt werden. Eine Testung auf das Vorliegen eines FraX scheint bei PWS-ähnlichem Phänotyp mit unauffälligen Ergebnissen in der Methylierungsanalyse sinnvoll zu sein. Wenn sich keine Repeatexpansion nachweisen lässt, sollte eine weitere molekulargenetische Diagnostik zur Detektion von Deletionen im *FMR1*-Gen erwogen werden.

4.4 Diagnostisches Vorgehen bei mentaler Retardierung

Mentale Retardierung ist ein bedeutendes Gesundheitsproblem, dessen Ätiologie auch heute noch in vielen Fällen unklar bleibt. Das Ziel einer humangenetischen Diagnostik bei betroffenen Patienten ist es, Veränderungen im Erbgut zu erfassen, um den Angehörigen Aussagen über Wiederholungsrisiko und Verlauf machen zu können. Darüber hinaus ergeben sich aus der Diagnose in einigen Fällen therapeutische Konsequenzen.

Wird keine genetische Ursache festgestellt kann das Wiederholungsrisiko, in Abhängigkeit von der Anzahl betroffener Kinder und der durchgeführten genetischen Diagnostik, auf 1-12% und mehr geschätzt werden [121].

Wenn zusätzlich zur mentalen Retardierung Dysmorphien auftreten, können diese eine genaue syndromspezifische Diagnostik ermöglichen. Die einzelnen diagnostischen Schritte ergeben sich dann aus der Verdachtsdiagnose. Bei allen Patienten mit nichtsyndromaler – unspezifischer – mentaler Retardierung sollte neben neuropädiatrischen Untersuchungen, Stoffwechseluntersuchungen und bildgebender Verfahren als genetische Diagnostik zunächst eine Chromosomenanalyse erfolgen. Bei männlichen Patienten sollte zusätzlich eine Testung auf das FraX durchgeführt werden, besonders wenn anhand eines klinischen Scores das Vorliegen eines FraX wahrscheinlich ist (siehe auch 4.1 und 4.2). Bei Hinweisen auf das Vorliegen einer XLMR und negativen Testergebnissen für das FraX sollte darüber hinaus der Ausschluss anderer X-chromosomaler Gendefekte erwogen werden [4]. Weitere diagnostische Möglichkeiten sind FISH-Untersuchungen auf Mikrodeletionen, Subtelomernalyse, Array-CGH und Untersuchungen auf eine Störung der genomischen Prägung, wie zum Beispiel die Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens.

Auch nach Ausschöpfen aller diagnostischen Möglichkeiten bleibt heute bei ca. 50% der Patienten mit schwerer MR die Ätiologie unklar. Bei mildereren Formen der MR liegt dieser Wert sogar noch höher [7].

In Abbildung 16 ist der von *Moeschler et al.* [103] vorgeschlagene Ablauf einer optimalen Diagnostik bei MR und Entwicklungsverzögerungen überarbeitet dargestellt. Nach Ansicht der Autoren können besonders die betreuenden Ärzte von einem klaren Ablaufschema profitieren. Es kann ihnen helfen, den Familien das diagnostische Vorgehen darzulegen und dieses durch genaue Vorbereitung und Datenerhebung zu optimieren. Der vorgeschlagene diagnostische Ablauf scheint sinnvoll zu sein. Die Testung auf ein FraX sollte jedoch zielgerichteter erfolgen, zum Beispiel nach Abschätzen der Wahrscheinlichkeit eines FraX anhand

eines klinischen Scores. Zu betonen ist außerdem die zunehmende diagnostische Relevanz der Array-CGH zum Nachweis von Chromosomenveränderungen (siehe 4.2.2).

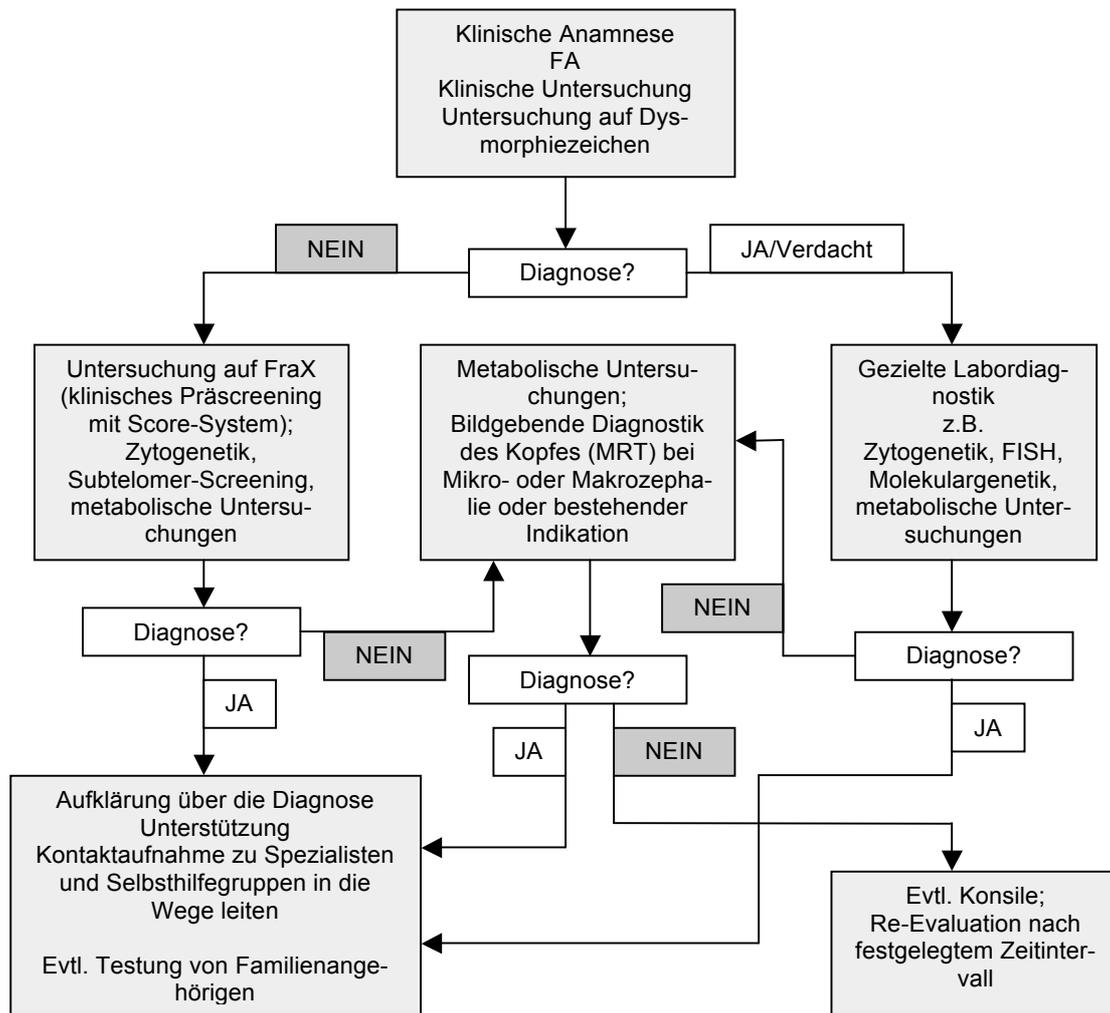


Abb. 16: Ablaufschema zum diagnostischen Vorgehen bei MR und Entwicklungsverzögerungen (modifiziert nach Moeschler et al. [103])

4.5 Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Strategien und diagnostische Pfade zu erarbeiten, um die Zahl undiagnostizierter Ursachen mentaler Retardierung zu reduzieren.

Einige der anfangs formulierten Fragen konnten weitgehend beantwortet werden, andere müssten in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Es gelang einen adaptierten Score zu entwickeln, mit dessen Hilfe sich die Zahl durchgeführter Labordiagnostik reduzieren lässt. Weitere prospektive Studien mit möglichst großen Fallzahlen sind notwendig, um die gefundenen Ergebnisse zu verifizieren und genauere Aussagen über eine weitere Anwendung machen zu können.

In der Labordiagnostik haben sich die Array-CGH und die FISH als sinnvolle Alternativen bzw. Ergänzungen in der Diagnostik bei mental retardierten Patienten erwiesen. Gerade bei Symptomen, die an ein spezielles Mikrodeletions- oder –duplikationssyndrom denken lassen, sollte die gezielte Durchführung einer FISH erwogen werden. Bei weniger spezifischem Phänotyp, der auch nicht typisch für ein FraX ist, kann alternativ eine Array-CGH durchgeführt werden. Gerade die Array-CGH ist eine sehr potente Labormethode, deren Bedeutung in der Labordiagnostik in den kommenden Jahren zunehmen wird.

Nicht sicher beantworten ließen sich folgende Fragen:

- Tragen zusätzliche Aberrationen bei FraX positiven Patienten zur Variabilität des Phänotyps bei?
- Spielt eine atypische Ausprägung des PWS eine Rolle in der Differentialdiagnostik des FraX?

Diese nicht beantworteten Fragen bieten Ansätze für weitere Untersuchungen.

Festzuhalten ist, dass ein Umdenken in der Abfolge der diagnostischen Schritte und fallspezifisches Vorgehen unter Einbeziehung neuerer Methoden wie der Array-CGH zu einer Verbesserung der Zahl diagnostizierter Ursachen von MR beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Mentale Retardierung ist ein bedeutendes Gesundheitsproblem, dessen Ätiologie auch heute noch in vielen Fällen unklar bleibt. Unter den mental retardierten männlichen Patienten ist das Fragile-X-Syndrom eine der häufigsten und bekanntesten Diagnosen. Dennoch führt die Testung auf ein Fragiles-X-Syndrom in vielen Fällen zu negativen Ergebnissen.

Mithilfe publizierter Screening-Scores sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Score anhand eines Patientenkollektivs optimiert werden, um das klinische Screening auf ein Fragiles-X-Syndrom zu verbessern. Zusätzlich sollten die molekularen Grundlagen der Phänotypen ausgewählter Patienten durch weiterführende Labordiagnostik genauer aufgeklärt werden.

Es wurden klinische und molekulargenetische Befunde von 110 Patienten ausgewertet, die zuvor im Institut für Humangenetik auf das Vorliegen eines Fragilen-X-Syndroms untersucht worden waren. Bei 21 dieser Patienten wurde ein Fragiles-X-Syndrom mittels Southern-Blot nachgewiesen, die übrigen 89 Patienten zeigten unauffällige Befunde. Aus den vorliegenden Scores wurde ein Befundbogen erarbeitet mit dessen Hilfe die relevanten klinischen Daten gezielt ausgewertet wurden. Zusätzlich wurden einige Fachärzte, die in der klinischen Diagnostik mental retardierter Patienten erfahren sind, anhand eines Fragebogens nach ihrer Einschätzung bezüglich der Wichtigkeit der einzelnen Merkmale für den klinischen Verdacht auf ein Fragiles-X-Syndrom befragt.

Im Anschluss wurde bei ausgewählten Fällen eine weiterführende Labordiagnostik durchgeführt. Von den Patienten mit nachgewiesenem Fragilen-X-Syndrom wurden fünf Patienten mit besonders stark oder mild ausgeprägtem Phänotyp oder auch atypischen Befunden auf zusätzliche Aberrationen getestet. Vier dieser Patienten wurden mittels Array-CGH auf zusätzliche Mikrodeletionen und -duplikationen untersucht. Bei einem Patienten wurde eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt, um das zusätzliche Vorliegen eines Prader-Willi-Syndroms auszuschließen. Außerdem wurden bei 27 Patienten mit negativen Ergebnissen in der Testung auf ein Fragiles-X-Syndrom zusätzliche diagnostische Schritte eingeleitet. Bei fünf Patienten wurde eine Array-CGH durchgeführt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse von 28 weiteren Patienten, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik bereits eine Array-CGH durchgeführt worden war, mit ausgewertet. 19 Patienten mit besonders ausgeprägter Sprachentwicklungsverzögerung wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf eine Mikrodeletion in 16p11.2 untersucht. Außerdem wurden drei Patienten auf das Vorliegen eines atypischen Prader-Willi-Syndroms getestet und die Ergebnisse von vier weiteren Patienten, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik bereits eine Testung auf ein Prader-Willi-Syndrom durchgeführt worden war, mit ausgewertet.

Es wurde ein Sechs-Merkmals-Score (Große und/oder dysplastische Ohren, positive Familienanamnese für mentale Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung, hyperaktives Verhalten, autistische Verhaltensweisen, Konzentrationsprobleme) erarbeitet, der sich als signifikant bezüglich positiver Testergebnisse für ein Fragiles-X-Syndrom erwies.

Die zusätzliche Labordiagnostik bei den 59 Patienten, bei denen mittels Southern-Blot kein Fragiles-X-Syndrom nachgewiesen werden konnte, erbrachte in sieben Fällen auffällige Ergebnisse. Mittels Array-CGH konnten folgende Veränderungen nachgewiesen werden: eine familiäre Mikroduplikation 1q21.1, zwei bekannte Mikrodeletionen in 16p11.2 und 22q13.3, sowie zwei Mikrodeletionen in 10p12.2 und 18p11.2 und eine Mikroduplikation in 3q11.2, die bislang noch nicht im Zusammenhang mit einem Phänotyp, der dem des Fragilen-X-Syndroms ähnelt, beschrieben wurden. Bei einem weiteren Patienten konnte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine Mikrodeletion in 16p11.2 nachgewiesen werden. Ein atypisches Prader-Willi-Syndrom lag bei keinem der untersuchten Patienten vor. Es konnten auch keine zusätzlichen Aberrationen bei den fünf Patienten, bei denen ein Fragiles-X-Syndrom vorlag, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit einen vereinfachten Sechs-Merkmals-Score für das klinische Screening auf ein Fragiles-X-Syndrom vor und zeigt, dass sich die Symptome submikroskopischer chromosomaler Aberrationen mit denen eines Fragilen-X-Syndroms überschneiden können.

6 Abstract

Diagnosis and differential diagnosis in mentally retarded children referred for Fragile X testing

Mara Hesse (1), Holger Tönnies (1), Monika Kautza (1), Angela Sternkopf (1), Nele Husemeyer (1), Stefan Gesk (1), Ulrich Stephani (2), Amke Caliebe (3), Reiner Siebert (1), Almuth Caliebe (1)

1 Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel & Christian-Albrechts Universität zu Kiel

2 Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel & Christian-Albrechts Universität zu Kiel

3 Institut für Medizinische Informatik und Statistik Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel & Christian-Albrechts Universität zu Kiel

In mentally retarded males Fragile X syndrome is one of the most common diagnoses. However to our experience in most patients testing for Fragile X syndrome is negative.

Based on published screening programmes [38-41] we tried to adapt a clinical checklist for routine testing mentally retarded children for Fragile X syndrome. Additionally we screened several mentally retarded patients with negative Fragile X results for submicroscopic deletions and duplications using Array-CGH and FISH.

The adapted six-feature-score (large/dysplastic ears, positive family history of mental retardation, hyperactivity, attention deficit, autistic like behaviour und delayed development of speech) turned out to be significant with regard to positive Fragile X test and should be further tested in a prospective setting. By applying Array-CGH and FISH 7 out of 56 patients tested showed microdeletions with assumed correlation to the phenotype. Among those were two well described deletions, del(16p11.2) [MIM 611913] and del(22q13.3) [MIM 606232]. Moreover we detected microdeletions in 10p12.2 and 18p11.2 and a microduplication in 3q11.2 that have not been described yet in combination with a Fragile X phenotype. Additionally a familial aberration (microduplication 1q21.1) was found. We propose a new simplified six-feature-score for clinical screening for Fragile X syndrome and demonstrate that submicroscopic chromosome aberrations can overlap with symptoms of Fragile X syndrome.

Erschienen in Medizinische Genetik, März 2010, Band 22, Heft 1, Seite 144

Präsentiert in Posterform bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2010 in Hamburg

Literaturverzeichnis

1. ICD-10, International Classification of Diseases, <http://www.icd-code.de>.
2. Leonard H and Wen X, *The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium*. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002. 8(3): p. 117-34.
3. Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreëls F, *The prevalence of mental retardation: A critical review of recent literature*. Developmental Medicine and Child Neurology, 1997(39): p. 125-132.
4. Tzschach, *Genetik der mentalen Retardierung*. Dtsch Ärztebl, 2007. 104(20): p. 1400-1405.
5. Meinecke P, *Mentale Retardierungssyndrome- vom Symptom zur Diagnose*. Aktuelle Neuropädiatrie, ed. A.F. (Hrsg.). 2001.
6. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J, *Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics*. Am J Med Genet, 1997. 72(4): p. 468-77.
7. Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T, *Genetics and pathophysiology of mental retardation*. Eur J Hum Genet, 2006. 14(6): p. 701-13.
8. Bunday S, Thake A, Todd J, *The recurrence risks for mild idiopathic mental retardation*. J Med Genet, 1989. 26(4): p. 260-6.
9. Chiurazzi P and Oostra BA, *Genetics of mental retardation*. Curr Opin Pediatr, 2000. 12(6): p. 529-35.
10. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J, *Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation*. Lancet, 1999. 354(9191): p. 1676-81.
11. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL, *Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities*. J Med Genet, 2006. 43(6): p. 478-89.
12. De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C, *Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes*. J Med Genet, 2003. 40(6): p. 385-98.
13. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P, *Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances*. Genes Chromosomes Cancer, 1997. 20(4): p. 399-407.
14. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG, *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays*. Nat Genet, 1998. 20(2): p. 207-11.
15. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M, *Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH)*. J Med Genet, 2005. 42(9): p. 699-705.
16. Penrose, *A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect*. London: Medical Research Council, 1938.
17. Ropers HH, *X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder*. Curr Opin Genet Dev, 2006. 16(3): p. 260-9.
18. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, John Hopkins University.

19. Martin JP and Bell J, *A pedigree of mental defect showing sex-linkage*. J Neurol Psychiatr, 1943(6): p. 154-631.
20. Lehrke R, *Theory of X-linkage of major intellectual traits*. Am J Ment Defic, 1972. 76(6): p. 611-9.
21. Lubs, *A marker X chromosome*. Am J Hum Genet, 1969(21): p. 231-244.
22. Sutherland GR, *Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium*. Science, 1977. 197(4300): p. 265-6.
23. Froster-Iskenius U, Hall JG, Curry CJ, *False negative results in patients with fra(X)(q) mental retardation taking oral vitamin supplements*. N Engl J Med, 1987. 316(17): p. 1093.
24. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al., *Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox*. Cell, 1991. 67(6): p. 1047-58.
25. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel J, *Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome*. Science, 1991. 252(5010): p. 1097-102.
26. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al., *Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome*. Cell, 1991. 65(5): p. 905-14.
27. Froster-Iskenius U, McGillivray BC, Dill FJ, Hall JG, Herbst DS, *Normal male carriers in the fra(X) form of X-linked mental retardation (Martin-Bell syndrome)*. Am J Med Genet, 1986. 23(1-2): p. 619-31.
28. Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G, *The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis*. Ann Hum Genet, 1984. 48(Pt 1): p. 21-37.
29. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL, *The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation*. Nat Genet, 1993. 4(4): p. 335-40.
30. Steinbach D und Steinbach P, *Fragiles-X-Syndrom - Störung synaptischer Plastizität mit Hoffnung auf Heilung*. medgen, 2006(18): p. 182-186.
31. Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL, *FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review*. Genet Med, 2001. 3(5): p. 359-71.
32. Froster, *Das Fragile-X-Syndrom*. pädiat. prax., 2007(70): p. 481-490.
33. Froster, *Das Fragile-X-Syndrom*. Kinder- und Jugendmedizin, 2007(7): p. 199-202.
34. Bennetto L, Pennington BF, Porter D, Taylor AK, Hagerman RJ, *Profile of cognitive functioning in women with the fragile X mutation*. Neuropsychology, 2001. 15(2): p. 290-9.
35. Fisch GS, Snow K, Thibodeau SN, Chalifaux M, Holden JJ, Nelson DL, Howard-Peebles PN, Maddalena A, *The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring*. Am J Hum Genet, 1995. 56(5): p. 1147-55.
36. Sherman SL, *Premature ovarian failure in the fragile X syndrome*. Am J Med Genet, 2000. 97(3): p. 189-94.
37. Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, Zhang L, Jardini T, Gane LW, Harris SW, Herman K, Grigsby J, Greco CM, Berry-Kravis E, Tassone F, Hagerman PJ, *Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population*. JAMA, 2004. 291(4): p. 460-9.
38. Giangreco CA, Steele MW, Aston CE, Cummins JH, Wenger SL, *A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population*. J Pediatr, 1996. 129(4): p. 611-4.
39. Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A, *Fragile X checklist*. Am J Med Genet, 1991. 38(2-3): p. 283-7.
40. Butler MG, Mangrum T, Gupta R, Singh DN, *A 15-item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome*. Clin Genet, 1991. 39(5): p. 347-54.

41. Arvio M, Peippo M, Simola KO, *Applicability of a checklist for clinical screening of the fragile X syndrome*. Clin Genet, 1997. 52(4): p. 211-5.
42. Prader A, Labhart A, Willi H, *Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter*. Schweizerische medizinische Wochenschrift, 1956(86): p. 1260-1261.
43. Horsthemke B. and Wagstaff J, *Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region*. Am J Med Genet A, 2008. 146A(16): p. 2041-52.
44. Cassidy SB and Driscoll DJ, *Prader-Willi syndrome*. Eur J Hum Genet, 2008.
45. de Vries BB, Fryns JP, Butler MG, Canziani F, Wesby-van Swaay E, van Hemel JO, Oostra BA, Halley DJ, Niermeijer MF, *Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype*. J Med Genet, 1993. 30(9): p. 761-6.
46. de Graaff E, Rouillard P, Willems PJ, Smits AP, Rousseau F, Oostra BA, *Hotspot for deletions in the CGG repeat region of FMR1 in fragile X patients*. Hum Mol Genet, 1995. 4(1): p. 45-9.
47. Schrander-Stumpel C, Gerver WJ, Meyer H, Engelen J, Mulder H, Fryns JP, *Prader-Willi-like phenotype in fragile X syndrome*. Clin Genet, 1994. 45(4): p. 175-80.
48. Horsthemke B, Bartsch O, Bürger J, *Leitlinien für die molekulare und cytogenetische Diagnostik bei Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom*. medgen, 2001(13): p. 71-73.
49. Barnby G, Abbott A, Sykes N, Morris A, Weeks DE, Mott R, Lamb J, Bailey AJ, Monaco AP; International Molecular Genetics Study of Autism Consortium, *Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT*. Am J Hum Genet, 2005. 76(6): p. 950-66.
50. Chakrabarti S and Fombonne E, *Pervasive developmental disorders in preschool children*. JAMA, 2001. 285(24): p. 3093-9.
51. Fombonne E, *Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update*. J Autism Dev Disord, 2003. 33(4): p. 365-82.
52. Fombonne E, *Epidemiological trends in rates of autism*. Mol Psychiatry, 2002. 7 Suppl 2: p. S4-6.
53. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M, *Strong association of de novo copy number mutations with autism*. Science, 2007. 316(5823): p. 445-9.
54. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ; Autism Consortium, *Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism*. N Engl J Med, 2008. 358(7): p. 667-75.
55. Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH Jr, Dobyns WB, Christian SL, *Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism*. Hum Mol Genet, 2008. 17(4): p. 628-38.
56. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Keltelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW, *Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder*. Am J Hum Genet, 2008. 82(2): p. 477-88.
57. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI, Mefford H, Ying P, Nickerson DA, Eichler EE, *Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease*. Am J Hum Genet, 2009. 84(2): p. 148-61.

-
58. Feingold M and Bossert WH, *Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1974. 10(13): p. 1-16.
 59. Waaler PE, Thorsen T, Stoa KF, Aarskog D, *Studies in normal male puberty*. Acta Paediatr Scand Suppl, 1974(249): p. 1-36.
 60. Weiß C, *Basiswissen Medizinische Statistik*. 3 ed. 2005, Springer, Heidelberg. 323.
 61. UCSC, Human Genome Browser, <http://www.genome.ucsc.edu>.
 62. Husemeyer N, Dissertation im Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel und Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, *in Vorbereitung*
 63. Tönnies H, *Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics*. Trends Mol Med, 2002. 8(6): p. 246-50.
 64. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, *Taschenlehrbuch Humangenetik*. Vol. 7. 2006, Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag.
 65. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R, *Interphase cytogenetics of the hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification*. Anticancer Research, 2003(23): p. 1139-1148.
 66. Praxis für Humangenetik, Homepage, <http://www.medizinische-genetik.at>.
 67. Sternkopf A, *Molekularzytogenetische Untersuchungen zum Nachweis chromosomaler Aberrationen bei Patienten mit sprachbetonter Entwicklungsverzögerung*, Institut für Humangenetik. 2008, UKSH, Campus Kiel und Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 68. Heinrich U and Locher M, Analysetechniken und Systematik der Chromosomenstörungen, <http://www.medizinische-genetik.de>.
 69. Laborwissen. <http://www.laborwissen.de>.
 70. Molecularstation. <http://www.molecularstation.com>.
 71. Autism Genome Project Consortium, Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L, Feuk L, Qian C, Bryson SE, Jones MB, Marshall CR, Scherer SW, Veland VJ, Bartlett C, Mangin LV, Goedken R, Segre A, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, Betancur C, Bourgeron T, Gillberg C, Leboyer M, Buxbaum JD, Davis KL, Hollander E, Silverman JM, Hallmayer J, Lotspeich L, Sutcliffe JS, Haines JL, Folstein SE, Piven J, Wassink TH, Sheffield V, Geschwind DH, Bucan M, Brown WT, Cantor RM, Constantino JN, Gilliam TC, Herbert M, Lajonchere C, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Miller J, Nelson S, Samango-Sprouse CA, Spence S, State M, Tanzi RE, Coon H, Dawson G, Devlin B, Estes A, Flodman P, Klei L, McMahon WM, Minshew N, Munson J, Korvatska E, Rodier PM, Schellenberg GD, Smith M, Spence MA, Stodgell C, Tepper PG, Wijsman EM, Yu CE, Rogé B, Mantoulan C, Wittemeyer K, Poustka A, Felder B, Klauck SM, Schuster C, Poustka F, Bölte S, Feineis-Matthews S, Herbrecht E, Schmötzer G, Tsiantis J, Papanikolaou K, Maestrini E, Bacchelli E, Blasi F, Carone S, Toma C, Van Engeland H, de Jonge M, Kemner C, Koop F, Langemeijer M, Hijmans C, Staal WG, Baird G, Bolton PF, Rutter ML, Weisblatt E, Green J, Aldred C, Wilkinson JA, Pickles A, Le Couteur A, Berney T, McConachie H, Bailey AJ, Francis K, Honeyman G, Hutchinson A, Parr JR, Wallace S, Monaco AP, Barnby G, Kobayashi K, Lamb JA, Sousa I, Sykes N, Cook EH, Guter SJ, Leventhal BL, Salt J, Lord C, Corsello C, Hus V, Weeks DE, Volkmar F, Tauber M, Fombonne E, Shih A, Meyer KJ, *Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements*. Nat Genet, 2007. 39(3): p. 319-28.
 72. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D, Collins A, Mercer C, Norga K, de Ravel T, Devriendt K, Bongers EM, de Leeuw N, Reardon W, Gimelli S, Bena F, Hennekam RC, Male A, Gaunt L, Clayton-Smith J, Simonin I, Park SM, Mehta SG, Nik-Zainal S, Woods CG, Firth HV, Parkin G, Fichera M, Reitano S, Lo Giudice M, Li KE, Casuga I, Brooker A, Conrad B, Schwerzmann M, Räber L, Gallati S, Striano P, Coppola A, Tolmie JL, Tobias ES, Lilley C, Armengol L, Spyschaert Y, Verloo P, De Coene A, Goossens L, Mortier G, Speleman F, van Binsbergen E, Nelen MR, Hochstenbach R, Poot M, Gallagher L, Gill M, McClellan J, King MC, Regan R, Skinner C, Stevenson RE, Antonarakis SE,

- Chen C, Estivill X, Menten B, Gimelli G, Gribble S, Schwartz S, Sutcliffe JS, Walsh T, Knight SJ, Sebat J, Romano C, Schwartz CE, Veltman JA, de Vries BB, Vermeesch JR, Barber JC, Willatt L, Tassabehji M, Eichler EE, *Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes*. N Engl J Med, 2008. 359(16): p. 1685-99.
73. Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang SH, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong CT, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Patel A, *Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities*. Nat Genet, 2008. 40(12): p. 1466-71.
74. Wong AC, Ning Y, Flint J, Clark K, Dumanski JP, Ledbetter DH, McDermid HE, *Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation*. Am J Hum Genet, 1997. 60(1): p. 113-20.
75. Prasad C, Prasad AN, Chodirker BN, Lee C, Dawson AK, Jocelyn LJ, Chudley AE, *Genetic evaluation of pervasive developmental disorders: the terminal 22q13 deletion syndrome may represent a recognizable phenotype*. Clin Genet, 2000. 57(2): p. 103-9.
76. Phelan MC, Rogers RC, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, McDermid H, Shaw SR, Claytor J, Willis J, Kelly DP, *22q13 deletion syndrome*. Am J Med Genet, 2001. 101(2): p. 91-9.
77. Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, Prieur M, Jonveaux P, Philippe A, Bourrouillou G, de Martinville B, Delobel B, Vallee L, Croquette MF, Mattei MG, *Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations*. J Med Genet, 2003. 40(9): p. 690-6.
78. Lindquist SG, Kirchhoff M, Lundsteen C, Pedersen W, Erichsen G, Kristensen K, Lillquist K, Smedegaard HH, Skov L, Tommerup N, Brøndum-Nielsen K, *Further delineation of the 22q13 deletion syndrome*. Clin Dysmorphol, 2005. 14(2): p. 55-60.
79. Eichler EE and Zimmerman AW, *A hot spot of genetic instability in autism*. N Engl J Med, 2008. 358(7): p. 737-9.
80. Laing S, Partington M, Robinson H, Turner G, *Clinical screening score for the fragile X (Martin-Bell) syndrome*. Am J Med Genet, 1991. 38(2-3): p. 256-9.
81. Nolin SL, Snider DA, Jenkins EC, Brown WT, Krawczun M, Stetka D, Houck G Jr, Dobkin CS, Strong G, Smith-Dobrinsky G, et al., *Fragile X screening program in New York State*. Am J Med Genet, 1991. 38(2-3): p. 251-5.
82. Gabarrón J, Lopez I, Glover G, Carbonell P, *Fragile X screening program in a Spanish region*. Am J Med Genet, 1992. 43(1-2): p. 333-8.
83. Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR, et al., *Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion*. Nat Genet, 1992. 1(5): p. 341-4.
84. Wöhrle D, Kotzot D, Hirst MC, Manca A, Korn B, Schmidt A, Barbi G, Rott HD, Poustka A, Davies KE, et al., *A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome*. Am J Hum Genet, 1992. 51(2): p. 299-306.
85. Tarleton J, Richie R, Schwartz C, Rao K, Aylsworth AS, Lachiewicz A, *An extensive de novo deletion removing FMR1 in a patient with mental retardation and the fragile X syndrome phenotype*. Hum Mol Genet, 1993. 2(11): p. 1973-4.
86. Gu Y, Lugenbeel KA, Vockley JG, Grody WW, Nelson DL, *A de novo deletion in FMR1 in a patient with developmental delay*. Hum Mol Genet, 1994. 3(9): p. 1705-6.

87. Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G, *Fragile X syndrome and deletions in FMR1: new case and review of the literature*. Am J Med Genet, 1997. 72(4): p. 430-4.
88. De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ, *A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation*. Nat Genet, 1993. 3(1): p. 31-5.
89. Fryns JP, Dereymaeker A, Hoefnagels M, Volcke P, Van den Berghe H, *Partial fra(X) phenotype with megalotestes in fra (X)-negative patients with acquired lesions of the central nervous system*. Am J Med Genet, 1986. 23(1-2): p. 213-9.
90. Nolin SL, Snider DA, Jenkins EC, Dobkin CS, Patchell K, Krawczun M, Strong G, Colwell M, Victor A, Payyapilli T, et al., *New York State screening program for fragile X syndrome: a progress report*. Am J Med Genet, 1992. 43(1-2): p. 328-32.
91. Oostra BA, Jacky PB, Brown WT, Rousseau F, *Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome*. National Fragile X Foundation. J Med Genet, 1993. 30(5): p. 410-3.
92. Pandey UB, Phadke SR, Mittal B, *Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation*. Neurol India, 2004. 52(1): p. 36-42.
93. Sofocleous C, Kolialexi A, Mavrou A, *Molecular diagnosis of Fragile X syndrome*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. 9(1): p. 23-30.
94. Nygren AO, Lens SI, Carvalho R, *Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification enables a rapid and reliable distinction between male FMR1 pre-mutation and full-mutation alleles*. J Mol Diagn, 2008. 10(6): p. 496-501.
95. Khaniani MS, Kalitsis P, Burgess T, Slater HR, *An improved Diagnostic PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (FMR1)*. Mol Cytogenet, 2008. 1(1): p. 5.
96. Sireteanu A and Rusu C, *[Diagnostic testing in fragile X syndrome]*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2006. 110(4): p. 968-71.
97. Tassone F, Hagerman RJ, Iklé DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, Oostra BA, Taylor AK, *FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome*. Am J Med Genet, 1999. 84(3): p. 250-61.
98. Stoll C, *Problems in the diagnosis of fragile X syndrome in young children are still present*. Am J Med Genet, 2001. 100(2): p. 110-5.
99. Acharya K and Ross LF, *Fragile X screening: attitudes of genetic health professionals*. Am J Med Genet A, 2009. 149A(4): p. 626-32.
100. Song FJ, Barton P, Sleightholme V, Yao GL, Fry-Smith A, *Screening for fragile X syndrome: a literature review and modelling study*. Health Technol Assess, 2003. 7(16): p. 1-106.
101. Ryyänänen M, Heinonen S, Makkonen M, Kajanoja E, Mannermaa A, Pertti K, *Feasibility and acceptance of screening for fragile X mutations in low-risk pregnancies*. Eur J Hum Genet, 1999. 7(2): p. 212-6.
102. Bundesärztekammer, *Richtlinien zur pränatalen Diagnostik von Krankheiten und Krankheitsdispositionen*. Deutsches Ärzteblatt, 1998. 95(50): p. 64-70.
103. Moeschler JB, *Medical genetics diagnostic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability*. Curr Opin Neurol, 2008. 21(2): p. 117-22.
104. Cecconi M, Forzano F, Rinaldi R, Cappellacci S, Grammatico P, Faravelli F, Dagna Bricarelli F, Di Maria E, Grasso M, *A single nucleotide variant in the FMR1 CGG repeat results in a "Pseudodeletion" and is not associated with the fragile X syndrome phenotype*. J Mol Diagn, 2008. 10(3): p. 272-5.
105. EMQN, The European Molecular Genetics Quality Network, <http://www.emqn.org>.
106. Bartholdi D, *Medizinische Genetik: Copy number variants (CNV)*. Schweiz Med Forum, 2008. 8(51-52): p. 1007-1008.
107. Decipher, <http://decipher.sanger.ac.uk>.
108. Quan F, Zonana J, Gunter K, Peterson KL, Magenis RE, Popovich BW, *An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene*. Am J Hum Genet, 1995. 56(5): p. 1042-51.

-
109. Tarleton J, Kenneson A, Taylor AK, Crandall K, Fletcher R, Casey R, Hart PS, Hatton D, Fisch G, Warren ST, *A single base alteration in the CGG repeat region of FMR1: possible effects on gene expression and phenotype*. J Med Genet, 2002. 39(3): p. 196-200.
 110. Koulischer L and Gillerot Y, *Down's syndrome in Wallonia (South Belgium), 1971-1978: cytogenetics and incidence*. Hum Genet, 1980. 54(2): p. 243-50.
 111. MacFaul R, Turner T, Mason MK, *Down's/Turner's mosaicism. Double aneuploidy as a rare cause of missed prenatal diagnosis of chromosomal abnormality*. Arch Dis Child, 1981. 56(12): p. 962-3.
 112. Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, Kalaydjieva L, McCague P, Dimiceli S, Pitts T, Nguyen L, Yang J, Harper C, Thorpe D, Vermeer S, Young H, Hebert J, Lin A, Ferguson J, Chiotti C, Wiese-Slater S, Rogers T, Salmon B, Nicholas P, Petersen PB, Pingree C, McMahon W, Wong DL, Cavalli-Sforza LL, Kraemer HC, Myers RM, *A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology*. Am J Hum Genet, 1999. 65(2): p. 493-507.
 113. Bailey A, Phillips W, Rutter M, *Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives*. J Child Psychol Psychiatry, 1996. 37(1): p. 89-126.
 114. Ahn JW, Mann K, Docherty Z, Mackie Ogilvie C, *Submicroscopic chromosome imbalance in patients with developmental delay and/or dysmorphism referred specifically for Fragile X testing and karyotype analysis*. Mol Cytogenet, 2008. 1(1): p. 2.
 115. Ben-Shachar S, Lanpher B, German JR, Qasaymeh M, Potocki L, Nagamani SC, Franco LM, Malphrus A, Bottenfield GW, Spence JE, Amato S, Rousseau JA, Moghaddam B, Skinner C, Skinner SA, Bernes S, Armstrong N, Shinawi M, Stankiewicz P, Patel A, Cheung SW, Lupski JR, Beaudet AL, Sahoo T, *Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders*. J Med Genet, 2009. 46(6): p. 382-8.
 116. Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Franssen van de Putte DE, Anderlid BM, Lundin J, Lapunzina P, Pérez Jurado LA, Delle Chiaie B, Loeys B, Menten B, Oostra A, Verhelst H, Amor DJ, Bruno DL, van Essen AJ, Hordijk R, Sikkema-Raddatz B, Verbruggen KT, Jongmans MC, Pfundt R, Reeser HM, Breuning MH, Ruivenkamp CA, *Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals*. Eur J Med Genet, 2009. 52(2-3): p. 77-87.
 117. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T, *Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders*. Nat Genet, 2007. 39(1): p. 25-7.
 118. Precht KS, Lese CM, Spiro RP, Huttenlocher PR, Johnston KM, Baker JC, Christian SL, Kittikamron K, Ledbetter DH, *Two 22q telomere deletions serendipitously detected by FISH*. J Med Genet, 1998. 35(11): p. 939-42.
 119. Phelan MC, *Deletion 22q13.3 syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2008. 3: p. 14.
 120. Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE, *Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms*. J Med Genet, 2003. 40(8): p. 575-84.
 121. Turner G and Partington M, *Recurrence risks in undiagnosed mental retardation*. J Med Genet, 2000. 37(12): p. E45.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Array-CGH [66]	Seite 21
Abb. 2	Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung [68]	Seite 24
Abb. 3	Schematische Darstellung der verwendeten Sonden	Seite 25
Abb. 4	Schematische Darstellung der Bisulfitbehandlung	Seite 30
Abb. 5	Schematische Darstellung der PCR [69]	Seite 31
Abb. 6	Schematische Darstellung der Agaroseelektrophorese	Seite 32
Abb. 7	Darstellung der Altersverteilung der männlichen Patienten	Seite 36
Abb. 8	Sechs-Merkmals-Score; Scorewerte der männlichen Patienten	Seite 40
Abb. 9	Array-CGH: Duplikation in 3q11.2	Seite 42
Abb. 10	Array-CGH: Deletion in 16p11.2	Seite 44
Abb. 11	FISH: regelrechte Signalkonstellation	Seite 45
Abb. 12	FISH: Deletion in 16p11.2	Seite 45
Abb. 13	Methylierungsanalyse des <i>SNRPN</i> -Gens: Elektrophorese	Seite 46
Abb. 14	Zusammenfassung der Labordiagnostik	Seite 47
Abb. 15	Sechs-Merkmals-Score; Scoreverteilung über die Gruppen	Seite 51
Abb. 16	Diagnostisches Vorgehen bei mentaler Retardierung	Seite 67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Ursachen mentaler Retardierung [6]	Seite 2
Tabelle 2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Seite 15
Tabelle 3	Verwendete Kits	Seite 16
Tabelle 4	Lösungen/Puffer und Ansätze	Seite 16
Tabelle 5	Sonden für die FISH	Seite 18
Tabelle 6	Verwendete Geräte	Seite 19
Tabelle 7	Software	Seite 19
Tabelle 8	Vorgegebenes Schema zur Bisulfitbehandlung	Seite 33
Tabelle 9	Durchführung der PCR	Seite 34
Tabelle 10	Ergebnisse der retrospektiven Datenerhebung	Seite 37
Tabelle 11	Ergebnisse der Ärztefragebögen	Seite 38
Tabelle 12	Gegenüberstellung der eigenen Score-Systeme	Seite 39
Tabelle 13	Drei-Merkmals-Score	Seite 39
Tabelle 14	Sechs-Merkmals-Score; Verteilung der Scorewerte	Seite 40
Tabelle 15	Sechs-Merkmals-Score; Wilcoxon-Test	Seite 41
Tabelle 16	Kopfumfänge im Vergleich	Seite 41
Tabelle 17	Auffälligkeiten in der Array-CGH im Kollektiv	Seite 43
Tabelle 18	Vergleich des Sechs-Merkmals-Scores mit anderen Scores	Seite 53

Anhang

A1: Gegenüberstellung einiger Score-Systeme

Hier werden die vier dieser Arbeit zugrunde liegenden Score-Systeme miteinander verglichen. Aus ihnen wurde der Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung erarbeitet.

	Butler et al. [40]	Arvio et al. [41]	Hagerman et al. [39]	Giangreco et al. [38]
Mentale Retardierung				
Große Ohren				
Makroorchidismus				
Plantarfalte				
Positive FA für MR				
Hyperaktivität				ADHD
Berührungsempfindlichkeit				Autistische Züge
Kurze Aufmerksamkeitsspanne				ADHD
Überbewegliche Gelenke				
SEV				
Handwedeln				
Blaue Augen				
Sydney-Linie				
Handbeißen				
Wenig Augenkontakt				Autistische Züge
Laute Stimme				
Schüchternheit				
Fluchen				
Prahlen				
Langes Gesicht				

Die in den verschiedenen Score-Systemen berücksichtigten Merkmale sind jeweils grau hervorgehoben. *Giangreco et al.* fassen Hyperaktivität und kurze Aufmerksamkeitsspanne zum Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHD, englisch: *attention-deficit hyperactivity disorder*) und Berührungsempfindlichkeit und wenig Augenkontakt zu autistischen Zügen zusammen.

Die Punktevergabe erfolgte bei *Butler et al.*, *Hagerman et al.* und *Giangreco et al.* nach folgendem Schema:

- Vorliegen eines Merkmals = 2 Punkte
- Fragliches Vorliegen eines Merkmals = 1 Punkt
- Abwesenheit eines Merkmals = 0 Punkte

Arvio et al. vergaben lediglich einen Punkt für jedes vorliegende Merkmal und keinen Punkt für jedes abwesende Merkmal.

A2: Befundbogen zur retrospektiven Datenerhebung

Fragiles X –Syndrom

positiv

negativ

Name/Nummer des Patienten:

Geburtsdatum: ___/___/_____

Untersuchungsdatum: ___/___/_____

Länge _____ cm (P _____) / KU _____ cm (P _____) / Gewicht _____ kg (P _____)

Familienanamnese:

Konsanguinität:

Diagnostik: Chromosomenanalyse

FISH

weitere: _____

Neuropädiatrie

Pädiatrie UKS-H

Epilepsiezentrum

	vorhanden	Nicht vorhanden	Keine Angabe
Mentale Retardierung			
Große Ohren/Dysplasien			
Makroorchidismus			
Plantarfalte			
Positive Familienanamnese für mentale Retardierung			
Hyperaktives Verhalten			
Autistische Züge/sich nicht berühren lassen wollen			
Konzentrationsprobleme/kurze Aufmerksamkeitsspanne			
Schlaffe, überbewegliche Gelenke/Finger			
Sprachentwicklung verzögert			
Handwedeln			
Affenartige Falte/Sydney Linie			
Handbeißen			
Wenig Augenkontakt/Scheu			

A3: Ärztefragebogen

Es würde uns interessieren, welche Merkmale und Auffälligkeiten Sie besonders dazu bewegen, eine Untersuchung auf das **Fragile X-Syndrom** einzuleiten.

Wir bitten Sie daher die unten stehenden Aspekte mit den Punkten 1-5 zu bewerten.

Dabei bedeutet 1 = *weniger wichtig* und 5 = *extrem wichtig*.

Es handelt sich hierbei nicht um einen „Test“, sondern wir möchten erfahren, welche Aspekte von den einweisenden Ärzten besonders beachtet werden.

Danke für Ihre Mitarbeit!

Mentale Retardierung	
Positive Familienanamnese für mentale Retardierung	
Große Ohren/dysplastische Ohren	
Andere faziale Dysmorphien (z. B. Hypertelorismus, Nasenanomalien)	
Andere kongenitale Anomalien (z. B. Skelettfehlbildungen, Herzfehler)	
Makroorchidismus	
Plantarfalte	
Affenartige Falte/Sydney Linie	
Wachstumsretardierung (pränatale und postnatale)	
Makrozephalus	
Schlaffe, überbewegliche Gelenke/Finger	
Autistische Züge/sich nicht berühren lassen wollen	
Sprachentwicklungsverzögerung	
Konzentrationsprobleme/kurze Aufmerksamkeitsspanne	
Hyperaktives Verhalten	
Andere Verhaltensauffälligkeiten (z. B. aggressives Verhalten)	
Handwedeln	
Handbeißen	
Wenig Augenkontakt/Scheu	
Zerebrale Anfälle	

Sonstiges: (bitte nennen Sie weitere Merkmale, denen Sie besondere Beachtung schenken)

Und zum Schluss bitte eine Angabe zur Ausbildung (Zutreffendes bitte markieren; Doppelnennungen möglich):

Ich bin Arzt/Ärztin für Humangenetik.

Ich bin Arzt/Ärztin für Kinderheilkunde.

Ich bin Arzt/Ärztin in der Weiterbildung für Humangenetik.

Ich bin Arzt/Ärztin in der Weiterbildung für Kinderheilkunde.

Ich bin Arzt/Ärztin für _____

A4: Das Patientenkollektiv

Nr.	Geschlecht	Alter	Score 3	Score 6	Diagnostik im Rahmen der Arbeit und ausgewählte Routinediagnostik	Diagnose
1.	männlich	35 2/12	4	9		FraX
2.	weiblich	3 4/12				FraX
3.	weiblich	6 7/12				FraX
4.	männlich	5	4	10		FraX
5.	männlich	6 4/12	6			FraX
6.	männlich	4	6	11		FraX
7.	männlich	2 10/12	4			FraX
8.	männlich	15 5/12	2	8		FraX
9.	männlich	6 5/12	4			FraX
10.	männlich	7 9/12	2			FraX
11.	männlich	11	6		Array-CGH	FraX
12.	männlich	3 10/12	4	7		FraX
13.	männlich	6 3/12	2	8	Methylierungsanalyse	FraX
14.	männlich	9 4/12	6		Array-CGH	FraX
15.	männlich	4 10/12	2		Array-CGH	FraX
16.	männlich	10 2/12	4	9		FraX
17.	männlich	2 6/12	6	10		FraX
18.	männlich	4 3/12	4	9		FraX
19.	männlich	2 10/12	6		Array-CGH	FraX
20.	männlich	4 7/12	4	8		FraX
21.	männlich	13 3/12	3		Array-CGH	
22.	männlich	12 11/12	2		A	
23.	männlich	16	0		A	
24.	männlich	14 7/12	4	7	Array-CGH	
25.	männlich	7 10/12	4	7		
26.	männlich	9 11/12	1			
27.	männlich	10	4			
28.	männlich	9 10/12	2	7		
29.	männlich	3 8/12	4			
30.	männlich	3 9/12	2	7	Methylierungsanalyse, FISH	
31.	männlich	4 9/12	4		A, Methylierungsanalyse	
32.	männlich	3 11/12	2		A	DUP1q21.1
33.	männlich	2 2/12	3			
34.	männlich	1 5/12	3		A	
35.	männlich	16 9/12	1	6		
36.	männlich	13 10/12	4		FISH	DEL16p11.2
37.	männlich	12 10/12	3			
38.	männlich	8 10/12	6	12	Array-CGH	
39.	weiblich	9 6/12				
40.	männlich	9 2/12	4			
41.	männlich	8 3/12	4	8		
42.	weiblich	7 11/12				
43.	männlich	5 2/12	6			
44.	männlich	6 10/12	2	7		
45.	männlich	5	4		FISH	
46.	männlich	3 4/12	2	8	Array-CGH	
47.	männlich	2 3/12	4		A	
48.	männlich	10 11/12	4			
49.	männlich	6 5/12	2	4		
50.	weiblich	6 3/12				
51.	männlich	5 3/12	4		Array-CGH	
52.	männlich	3 4/12	2	7	FISH	
53.	männlich	5 1/12	2			
54.	weiblich	3 9/12			FISH	
55.	männlich	4 3/12	4		FISH	
56.	männlich	4 6/12	2		A	

57.	männlich	3 4/12	4	9	FISH	
58.	männlich	4 2/12	6		A	
59.	männlich	2 6/12	4			
60.	weiblich	3 10/12			A	
61.	männlich	2 1/12	4		FISH	
62.	weiblich	2 8/12			A	
63.	männlich	2 2/12	0	5		
64.	männlich	1 9/12	6		A	DEL10p12.1
65.	männlich	2 3/12	0			
66.	männlich	9 3/12	2	7		
67.	männlich	4 6/12	4			
68.	männlich	6 8/12	0			
69.	männlich	5 10/12	4	9		
70.	männlich	12 8/12	4			
71.	männlich	16 10/12	4			
72.	männlich	1 7/12	2			
73.	männlich	5 3/12	2	7	A	
74.	männlich	6 1/12	2	4	A	
75.	männlich	3 9/12	6	12		
76.	weiblich	6 2/12				
77.	männlich	8 3/12	4	9	M	
78.	männlich	11 10/12	2	3		
79.	männlich	5 4/12	0	0		
80.	männlich	3	2			
81.	männlich	14 7/12	4	9		
82.	männlich	14 5/12	0	4		
83.	männlich	6 6/12	4	6		
84.	männlich	2	4	6		FraX
85.	weiblich	5 10/12			A, Methylierungsanalyse	
86.	männlich	2 3/12	2	4	A, M	
87.	männlich	6 1/12	4		FISH	
88.	männlich	5 2/12	2	6	FISH	
89.	männlich	10 4/12	4	5	FISH	
90.	männlich	6 8/12	2		FISH	
91.	männlich	3 5/12	2		FISH, M	
92.	männlich	8 3/12	2		FISH	
93.	männlich	7 6/12	2	6	A	DEL22q13.3
94.	männlich	8 6/12	2	5	A, M	
95.	männlich	10 5/12	X	X	A	
96.	männlich	8 5/12	4	5	A	
97.	weiblich	4 7/12			A	
98.	männlich	2 5/12	4	8	A	DEL18p11.2
99.	männlich	7 3/12	2		A	DEL16p11.2
100.	männlich	33 9/12	6	8	A	
101.	weiblich	6 8/12			A	
102.	weiblich	6 10/12			A	
103.	männlich	7 3/12	X	X	FISH	
104.	männlich	3 8/12	2		FISH	
105.	männlich	3 3/12	4		FISH	
106.	männlich	4 11/12	2	5	FISH	
107.	männlich	5 3/12	6	7	A	
108.	männlich	1 9/12	4	8	A	
109.	männlich	3 9/12	2	6	A	
110.	männlich	5 7/12	2	8	FISH	

X = männliche Patienten, bei denen keine MR im Anforderungsbogen vermerkt wurde und die daher nicht bei der statistischen Auswertung berücksichtigt wurden

A = Array-CGH bereits im Rahmen der Routinediagnostik gelaufen; Kasuistiken mit ausgewertet

M = Methylierungsanalyse bereits im Rahmen der Routinediagnostik gelaufen; Kasuistiken mit ausgewertet

A5: Ausgewählte Fälle

Hier sollen die beiden Patienten mit nachgewiesenen Mikrodeletionen 16p11.2 genauer beschrieben werden. Die Phänotypen der anderen Patienten, bei denen bekannte Mikrodeletions- bzw. -duplikationssyndrome nachgewiesen werden konnten, wurden unter 4.3.1 dargestellt.

1. Patient 99: männlich, 7 Jahre, Mikrodeletion 16p11.2

Das Blut dieses Patienten wurde aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Untersuchung mittels Array-CGH zugesandt. Dort waren bei globaler Entwicklungsstörung unklarer Genese mit Betonung der Sprachentwicklung bereits eine Chromosomenanalyse und eine molekulargenetische Diagnostik auf ein FraX sowie eine molekularzytogenetische Untersuchung auf eine Mikrodeletion 22q11.2 durchgeführt worden. Alle genannten Tests ergaben unauffällige Befunde.

Zur Vorgeschichte des Patienten liegen ausführliche Berichte aus dem UKE vor. Daraus geht hervor, dass er nach unkomplizierter Schwangerschaft in der 37. +3 SSW spontan nach vorzeitigem Blasensprung geboren wurde (Apgar 9/10/10). Die Geburtsmaße lagen im unteren Normbereich: Geburtsgewicht 2560 g (P 3), Körperlänge 48 cm (P 10-25), Kopfumfang 32 cm (P 10). Postpartal zeigten sich Trinkschwierigkeiten, die ein Stillen unmöglich gemacht hätten. Einmalig sei im Alter von 7 Monaten ein Fieberkrampf aufgetreten, sonst wurden keine zerebralen Krampfanfälle beobachtet. Der Patient wurde früh durch eine allgemeine Muskelhypotonie auffällig. Er konnte mit 15 Monaten frei sitzen, mit 18 Monaten frei laufen. Im Alter von einem Jahr habe er begonnen einzelne Wörter zu sprechen, die weitere Sprachentwicklung sei verzögert verlaufen. Im Alter von 6 Jahren konnte er nur Drei-Wort-Sätze sprechen. Die Hör- und Sehfähigkeit des Patienten seien eingeschränkt.

Der Patient hat bis auf eine leicht antevertierte Nase, ein schmales Oberlippenrot, volle Wangen und partielle kutane Syndaktylien der 2. und 3. Zehen beider Füße, keine fazialen oder körperlichen Auffälligkeiten.

In der Poliklinik für Hör-, Stimm- und Sprachheilkunde im UKE wurden im Jahre 2006 mit dem ET 6-6 unterdurchschnittliche Ergebnisse in fast allen Bereichen von mehr als 2 SD unter dem Altersdurchschnitt festgestellt. Der ET 6-6 ist ein Entwicklungstest für die Altersgruppe 6 Monate bis 6 Jahre, der Bereiche wie Körpermotorik, Handmotorik, kognitive Entwicklung und Sprachentwicklung, sowie Sozialentwicklung und emotionale Entwicklung erfasst. Lediglich die Sozialentwicklung wurde bei dem Patienten als durchschnittlich beurteilt.

Es liegt außerdem ein Brief des Werner-Otto-Instituts in Hamburg vor, wo der Patient im Jahre 2006 im Alter von 6 Jahren zur psychologischen Begutachtung vorgestellt wurde. Damals besuchte er einen Sprachheilkindergarten, eine Einschulung in eine Förderschule für geistig behinderte Kinder war für das Jahr 2007 geplant. In der Untersuchungssituation zeigte sich ein deutlich auffälliges Sozial- und Arbeitsverhalten. Die Obergrenze der kognitiven Leistungsfähigkeit ließ sich zum Vorstellungszeitpunkt nicht sicher ermitteln, da der Patient teilweise die Mitarbeit verweigerte. Von der Mutter wurde damals der Verdacht auf eine autistische Störung geäußert. Sie beschrieb einige typische Verhaltenszüge vor allem aus der frühen Kindheit, wie zum Beispiel stereotype Verhaltensweisen im Spiel. Auch die deutlich reduzierte Sprachentwicklung hätte in diese Richtung gedeutet werden können. Gegen das Vorliegen einer autistischen Störung sprachen die gute emotionale Anteilnahme und die gute Kommunikation mit anderen über Mimik und Gestik. Der Patient nahm dabei gut Augenkontakt auf. Daher wurde zum damaligen Vorstellungszeitpunkt ein frühkindlicher Autismus ausgeschlossen.

Der Patient habe eine gesunde jüngere Schwester. Auch die weitere Familienanamnese sei hinsichtlich mentaler Retardierung unauffällig.

Die Array-CGH-Untersuchung zeigte bei diesem Patienten eine 0,380 Mb große Deletion in 16p11.2, die anschließend mittels FISH verifiziert werden konnte (Sonden CTD-2515O10 und RP11-727C18). Bei den Eltern ließ sich die Veränderung mittels FISH nicht nachweisen, so dass von einem *de novo* Ereignis auszugehen war.

2. Patient 36: männlich, 16 Jahre, Mikrodeletion 16p11.2

Dieser Patient wurde im Jahre 2006 im Alter von 14 Jahren erstmalig im Institut für Human-genetik zur Beratung vorgestellt. Ausschlaggebend war eine Lernbehinderung unklarer Genese.

Die Mutter berichtete, dass ihr Sohn nach unkomplizierter Schwangerschaft spontan in der 40. SSW geboren wurde (Körpergewicht 3560 g (P 50), Körperlänge 53 cm (P 50), Kopfumfang 35 cm (P 50), Apgar 10/10). Bei Geburt habe ein Hodenhochstand vorgelegen, der erfolgreich hormonell behandelt werden konnte. Die motorische Entwicklung sei leicht verzögert verlaufen, er habe nicht gekrabbelt, konnte aber im Alter von 16 ½ Monaten frei laufen. Die Sauberkeitserziehung sei mit 4 Jahren abgeschlossen gewesen. Zu diesem Zeitpunkt wäre bei ihm aber eine Sprachentwicklungsverzögerung diagnostiziert worden. Außerdem liege eine Sehschwäche vor.

Bei der ersten Vorstellung im Alter von 13 10/12 Jahren fielen folgende körperliche Merkmale auf: relativ geringe Körperhöhe (154 cm = P 3) bei normalem Kopfumfang (54,7 cm = P 50); Ohrlänge beidseits 6,3 cm (+1 SD), dysmodellerte Ohren, hoher Gaumen, Interkanthalab-

stand 3,5 cm (+2 SD), äußerer Kanthalabstand 10 cm (-1 SD); Intermamillardistanz 22 cm (P 97), Beinlängendifferenz von 1 cm links < rechts.

Der Patient hat gesunde Zwillingsgeschwestern sowie eine gesunde Halbschwester und Halbzwillingsschwester mütterlicherseits. Bei der Mutter sei in der Vorgeschichte eine Fehlgeburt eines Kindes mit Ullrich-Turner-Syndrom aufgetreten. Darüber hinaus berichtete die Mutter, dass bei einer Cousine väterlicherseits ein Down-Syndrom vorläge.

Eine 2006 durchgeführte Chromosomenanalyse ergab keinen Hinweis auf eine numerische oder strukturelle Chromosomenaberration als Ursache der Lernbehinderung. Auch ein FraX konnte damals ausgeschlossen werden.

Es liegt ein Bericht aus dem Sozialpädiatrischen Zentrum des Diakoniekrankenhauses Rotenburg vor, wo der Patient Anfang 2008 aufgrund von Schulschwierigkeiten und Verhaltensauffälligkeiten vorgestellt wurde. Dort wurden die intellektuellen Fähigkeiten des Patienten mithilfe des Hamburg-Wechsler-Intelligenztests für Kinder (HAWIK III) getestet. Er erzielte einen unterdurchschnittlichen Gesamtest-IQ von 80 (Mittelwert = 100 +/- 15). Dieser setzt sich aus einem Verbal-IQ von 87 (knapp durchschnittlich) und einem Handlungs-IQ von 76 zusammen, der im Bereich einer Lernbehinderung liegt. Darüber hinaus fielen Defizite in Konzentration und Ausdauer sowie eine Leseschwäche und Rechtschreibschwierigkeiten auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an Blutlymphozyten des Patienten eine FISH mit den Sonden CTD-2515O10 und RP11-727C18 durchgeführt, die eine Deletion der Region 16p11.2 zeigte (siehe 3.2.2). Die durchgeführten FISH-Untersuchungen bei den Eltern zeigten regelrechte Signalkonstellationen, so dass von einem *de novo* Ereignis auszugehen war.

A6: Ergebnisse FISH

Sonden CTD-2515O10 Sgr und RP11-727C18 So

Patientennummer	Ausgewertet	Befund	Interpretation
30	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
36	9 Metaphasen 114 Interphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf <u>einem</u> Chromosom 16 105x ein grünes Signal 4x zwei grüne Signale 5x kein grünes Signal	Deletion in 16p11.2
45	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
52	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
54	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
55	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
57	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
61	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
87	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation
88	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grünes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkonstellation

89 Schlechte Signalqualität! Wenige Zellen!	46 Interphasekerne	36 x 2 grüne Signale 6 x 3 grüne Signale 4 x 1 grünes Signal rote Signale schwach, im Goldfilter o.B.	Kein Hinweis auf eine Deletion
90	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
91	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
92	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
103	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
104	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
105	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
106	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation
110	15 Metaphasen	Je ein rotes und ein grü- nes Doppelsignal auf beiden Chromosomen 16	Regelrechte Signalkon- stellatation

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Siebert danke ich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, für die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und des UKS-H, Campus Kiel durchführen zu können und für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Almuth Caliebe danke ich für die freundliche Betreuung und Korrektur meiner Arbeit. Ihre Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Herrn Prof. Dr. med. U. Stephani danke ich für die Bereitstellung der Patientenakten aus der Klinik für Neuropädiatrie des UKS-H, Campus Kiel.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Amke Caliebe aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik des UKS-H, Campus Kiel für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Für die Unterstützung bei Laborfragen danke ich Herrn Dr. med. S. Gesk, Herrn Dr. med. H. Plendl und Herrn PD Dr. rer. nat. H. Tönnies sowie Frau Ratjen und Frau Heiden.

Meiner Familie und meinem Partner danke ich herzlich für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit. Besonderer Dank gilt auch Bernd Wilken, Christina Bieber und Jessica Bockhorst für die Überprüfung und Korrektur von Rechtschreibung und Grammatik.

Außerdem danke ich Frau PD Dr. med. S. Spranger herzlich für wertvolle Anregungen und Tipps.

Lebenslauf

Name	Mara Hesse
Geburtstag	19.03.1984
Geburtsort	Bremen
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Elisabeth Holthaus-Hesse, Gynäkologin Ulrich Hesse, Pädiater

Schulischer Werdegang

- Grundschule an der Gete (Bremen) 1990-1994
- Schulzentrum an der Julius-Brecht-Allee (Bremen) 1994-2000
- California High School (San Ramon, CA, USA) 2000-2001
- Altes Gymnasium (Bremen) 2001-2003
- Abitur 2003

Universitärer Werdegang

- WS 03/04 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel
- Physikum (Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung) 2005
- SS 06 Auslandssemester in Rom, Italien (Università degli studenti di Roma Tor Vergata)
- Famulaturen:
 - 1 Monat Facharztpraxis für Humangenetik
 - 1 Monat Pädiatrie
 - 15 Tage Facharztpraxis für Pränataldiagnostik
 - 15 Tage Facharztpraxis für Kinderkardiologie
 - 1 Monat Innere Medizin
- Praktisches Jahr:
 - Pädiatrie und Humangenetik im UKS-H Campus Kiel (2008)
 - Chirurgie im ASBZ Bozen, Südtirol, Italien (2008/2009)
 - Innere Medizin im Asklepios Westklinikum Hamburg (2009)
- Doktorarbeit am Institut für Humangenetik WS 06/07 bis Februar 2010
- Staatsexamen (Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung) voraussichtlich April 2010

Stipendien

- Erasmus SS 06
- Stipendium zur Förderung des Praktischen Jahres im Ausland der CAU Kiel