

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Humangenetik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**Retrospektive cytogenetische und molekularcytogenetische Abklärung von
ätiologisch ungeklärten Aborten mit morphologisch auffälligen Feten**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt von
Ilona Dietze aus Karl-Marx-Stadt**

Marburg 2006

**Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 27.06.2006**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: PD Dr. rer. nat. Barbara Fritz

Korreferent: Prof. Dr. Roland Moll

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition des Abortes	1
1.2	Häufigkeit, Ätiologie und Wiederholungsrisiko von Spontanaborten	2
1.3	Ursachen von Aborten	3
1.3.1	Einfluss des mütterlichen Alters	3
1.3.2	Genetische Faktoren von Spontanaborten	4
1.3.3	Entstehungsmechanismen von Aneuploidien / Polyploidien	6
1.4	Parentale Herkunft chromosomaler Aberrationen - möglicher phänotypischer Effekt	8
1.5	Methoden zur Abklärung chromosomaler Ursachen in der Abort-pathologie	9
1.5.1	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)	9
1.5.2	Comparative Genomhybridisierung (CGH)	13
1.5.2.1	<i>Methodischer Hintergrund der CGH</i>	14
1.5.2.2	<i>Sensitivität und Validität der CGH</i>	16
1.5.3	Mikrodissektion	17
1.5.4	Mikrosatellitenanalyse zur Abklärung der parentalen Herkunft von Chromosomenaberrationen	20
1.6	Ziel der vorliegenden Dissertation	23
2	Material	24
2.1	Chemikalien	24
2.2	Lösungen, Puffer und Medien	26
2.2.1	Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur	26
2.2.2	Puffer und Lösungen für die Chromosomen-Bänderung	26
2.2.3	Puffer, Lösungen, Sonden und Antikörper für die In situ-Hybridisierung	27
2.2.4	PCR-Zusätze und Primer	29
2.2.5	Lösungen und Reagenzien für die DNA-Isolierung	29
2.2.6	Lösungen und Reagenzien für die DNA-Fällung	30
2.2.7	Lösungen und Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese	30
2.2.8	Lösungen und Reagenzien für die Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.3	Geräte und Zubehör	31
2.3.1	Geräte und Zubehör für die Mikrodissektion	31
2.3.2	Sonstige Geräte und Zubehör	31
3	Methoden	33
3.1	Untersuchungsgut	33
3.2	Cytogenetische Methoden	34
3.2.1	Zellkultivierung	34

3.2.1.1	<i>Langzeitkultur aus Amnionzellen und Abortgewebe</i>	34
3.2.1.2	<i>Lymphocytenkultur</i>	35
3.2.2	Chromosomenpräparation	35
3.2.3	Giemsa-Trypsin-Bänderung (GTG-Bänderung)	36
3.3	Molekularcytogenetische Methoden	37
3.3.1	Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FISH)	37
3.3.1.1	<i>Vorbereitung der Sonden und Hybridisierung</i>	37
3.3.1.2	<i>Fluoreszenz-Detektion und Waschung von indirekt markierten Sonden</i>	38
3.3.1.3	<i>Multicolor-FISH (M-FISH)</i>	39
3.3.2	Comparative Genomhybridisierung (CGH)	40
3.3.2.1	<i>Markierung der genomischen DNA über Nicktranslation</i>	40
3.3.2.2	<i>Markierung der genomischen DNA über DOP-PCR</i>	43
3.3.2.3	<i>Herstellung der Hybridisierungsmischung und Hybridisierung</i>	44
3.3.2.4	<i>Waschung der hybridisierten Objektträger</i>	45
3.3.2.5	<i>Auswertung der CGH mit digitaler Bildanalyse</i>	46
3.3.3	Mikrodissektion	47
3.4	Molekulargenetische Methoden	49
3.4.1	DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe	49
3.4.1.1	<i>DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe nach Proteinausfällung</i>	49
3.4.1.2	<i>DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe mittels All-tissue DNA-Kit (Fa. GEN-IAL)</i>	51
3.4.1.3	<i>DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe mittels Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Fa. Invitek)</i>	52
3.4.2	DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe	53
3.4.3	DNA-Isolierung aus Blut	54
3.4.4	DNA-Isolierung aus fixierter Chromosomensuspension	55
3.4.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	55
3.4.6	DNA-Amplifikation	56
3.4.6.1	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	56
3.4.6.2	<i>PCR mit spezifischen Primern mittels CombiPol DNA Polymerase Kit von Invitek</i>	57
3.4.6.3	<i>Degenerate oligonukleotide primed-PCR (DOP-PCR) für die Mikrodissektion</i>	58
3.4.6.4	<i>DNA-Amplifikation mittels GenomiPhi Amplification Kit</i>	59
3.4.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	60
3.4.7.1	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	60
3.4.7.2	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i>	61

4 Ergebnisse	65
4.1 DNA-Isolierung aus asserviertem Fetal- oder Abortgewebe	66
4.1.1 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben	66
4.1.2 DNA-Isolierung aus frischem und nativ eingefrorenem Gewebe	68
4.1.3 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	69
4.1.4 DNA-Isolierung aus fixierter Chromosomensuspension	70
4.1.5 Vergleich der verschiedenen Methoden zur DNA-Isolierung	70
4.2 DNA-Amplifikation	71
4.2.1 Universelle DNA-Amplifikation mit DOP-PCR von ROCHE	71
4.2.2 Universelle DNA-Amplifikation mit GenomiPhi DNA Amplifikation Kit	73
4.2.3 Mikrosatellitentypisierung	75
4.3 Korrelation zwischen Formalinfixierung und DNA-Qualität	76
4.4 Comparative Genomhybridisierung (CGH)	80
4.4.1 Fälle mit unauffälligem CGH-Ergebnis	83
4.4.1.1 <i>Bestätigung eines Normalbefundes (O-1980/02)</i>	85
4.4.1.2 <i>Bestätigung eines Normalbefundes (O-2017/02)</i>	86
4.4.1.3 <i>Falsch negativer Befund bei Vorliegen einer Triploidie (V-2317/01)</i>	88
4.4.2 Fälle mit pathologischem CGH-Profil	89
4.4.2.1 <i>Terminale Deletion 13q – Präzisierung eines cytogenetischen Vorbefundes (O-515/88)</i>	91
4.4.2.2 <i>Terminale Deletion 4q – Präzisierung eines cytogenetischen Vorbefundes (O-643/88)</i>	92
4.4.2.3 <i>Nachweis einer Trisomie 18 (S-41/02)</i>	93
4.4.2.4 <i>Nachweis einer Trisomie 12 (V-1771/95)</i>	95
4.4.2.5 <i>Nachweis einer interstitiellen Deletion 3p (O-212/86)</i>	98
4.4.2.6 <i>Charakterisierung eines überzähligen Markerchromosoms (O-1919/01)</i>	99
4.4.3 Fälle ohne Ergebnis nach CGH	102
4.5 Molekularcytopogenetische und molekulargenetische Methoden zur umfassenden Charakterisierung chromosomaler Imbalancen bei Aborten	103
4.5.1 Ausschluss einer Uniparentalen Disomie 2 (O-1893/01)	103
4.5.2 Terminale Deletion 4p (Wolf-Hirschhorn-Syndrom) (O-1910/01)	104
4.5.3 Inversionsduplikation 8p (118/02)	107
4.5.4 Derivatvchromosom 8 (V-2309/01)	109
5 Diskussion	113
5.1 Retrospektive Chromosomendiagnostik an Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe	113
5.2 Methodische Aspekte	114
5.2.1 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten, paraffiniertem Gewebe	114
5.2.2 CGH-Analysen mit DNA aus Paraffingewebe	118

5.2.3	CGH nach DOP-PCR	121
5.3	Korrelation der CGH-Ergebnisse mit cytogenetischen Befunden	124
5.3.1	CGH-Analyse mit unauffälligem CGH-Profil	127
5.3.1.1	<i>Feten mit Syndromverdacht</i>	127
5.3.3.2	<i>Verdacht auf chromosomale Aberration</i>	127
5.3.2	CGH-Analyse mit auffälligem CGH-Profil	129
5.3.2.1	<i>Nachweis von autosomalen Trisomien</i>	129
5.3.2.2	<i>Nachweis gonosomaler Chromosomenaberrationen</i>	130
5.3.2.3	<i>Nachweis von Deletionen / Sonderform Ringchromosomen</i>	131
5.3.2.4	<i>Nachweis von Duplikationen / Sonderform überzählige Markerchromosomen</i>	132
5.3.2.5	<i>Nachweis unbalancierter Translokationen</i>	134
5.4	Parentale Herkunft von Chromosomenaberrationen	138
5.4.1	Parentale Herkunft numerischer Chromosomenaberrationen	138
5.4.2	Parentale Herkunft struktureller Chromosomenaberrationen	141
5.5	Fallbeschreibungen	142
5.5.1	Nachweis von chromosomalen Zugewinnen - Charakterisierung eines Markerchromosoms durch die Kombination von M-FISH, chromosomaler Mikrodissektion, CGH und molekulargenetischer Analyse (O-1919/01)	142
5.5.2	Chromosomale Verluste – Terminale Deletion 4q (O-643/88)	145
5.5.3	Chromosomale Verluste – Interstitielle Deletion 3p (O-212/86)	147
5.5.4	Nachweis von Entstehungsmechanismen bei chromosomalen Aberrationen	149
6	Zusammenfassung	152
7	Zukünftige Entwicklungen	156
8	Tabellenanhang	158
Tabelle A:	Liste für Fälle mit unauffälligem CGH-Ergebnis	158
Tabelle B:	Liste für Fälle mit auffälligem CGH-Ergebnis	160
Tabelle C:	Auflistung aller bearbeiteten Fälle hinsichtlich stattgefundener Pränataldiagnostik, CGH-Ergebnisse und anderer Methoden	162
Tabelle D:	Auflistung aller Fälle, deren Lagerzeit in Formalin, der Autolysegrad des Gewebes und DNA-Zustand	164
9	Literaturverzeichnis	165
10	Anhang	180
10.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	180
10.2	Danksagung	181

1 Einleitung

1.1 Definition des Abortes

Eine Fehlgeburt (Abort) bedeutet das Absterben eines Embryos oder die frühzeitige Geburt eines Kindes vor Erreichen der Überlebensfähigkeit und stellt die häufigste Schwangerschaftskomplikation dar. Wenn ein Kind ein Geburtsgewicht von $> 500\text{g}$ erreicht, dann wird bereits von einer Frühgeburt gesprochen, da der heutige Stand der Kinderheilkunde theoretisch ein Überleben ermöglicht.

Die Ursachen eines Abortes sind vielfältig und im Einzelfall oft nicht eruierbar. Sie umfassen sowohl chromosomale, als auch endokrinologische, anatomische, immunologische, hämostasiologische und exogene Ursachen. Im Hinblick auf den klinischen Verlauf und die Ätiologie erscheint eine Klassifizierung der Spontanaborte nach Gestationsalter sinnvoll (Martius et al. 1996):

- *Spontanabort*: Schwangerschaftsverlust vor Lebensfähigkeit des Kindes mit einem Geburtsgewicht unter 500g
- *Frühestabort*: innerhalb der ersten 5 Schwangerschaftswochen (SSW, p.m.)
- *Frühabort*: Verlust zwischen 6. - 12. SSW (p.m.)
- *Spätabort*: Fruchtabgang nach 13. SSW (p.m.)

Von *habituellen Aborten* spricht man definitionsgemäß nach drei erlittenen Fehlgeburten in ununterbrochener Reihenfolge (Definition der WHO = Weltgesundheitsorganisation). Habituelle Aborte kommen mit einer Häufigkeit von 0,4-1,8% aller Schwangerschaften vor und betreffen etwa 2% der Paare im reproduktionsfähigen Alter. Bei Paaren mit habitueller Abortneigung, für die keine gynäkologische oder exogene Ursache bekannt ist, findet man in 6-12% der Fälle bei einem Partner strukturelle Chromosomenveränderungen (vor allem Translokationen). Die Häufigkeit, mit der Chromosomenaberrationen bei solchen Paaren gefunden werden, ist 5-6-fach höher als in der Allgemeinbevölkerung und etwa 2-fach höher als bei Paaren mit einem sporadischen Abort (Heyat et al. 1991).

Als „*missed abortions*“ wird ein verhaltener Abort bis zur 9. Embryonalwoche bezeichnet, bei dem der Embryo keine Herzaktivität zeigt und die Fruchtausstoßung ausgeblieben ist (Philipp & Kalousek 2002b). Einigen Untersuchungen zufolge besteht eine direkte Korrelation zwischen Phänotyp und chromosomaler Auffälligkeit des Frühabortes (Kalousek 1987, Philipp et al. 2003).

1.2 Häufigkeit, Ätiologie und Wiederholungsrisiko von Spontanaborten

Spontanaborte sind ein häufiges Ereignis in der menschlichen Fortpflanzung. 10-15% aller Schwangerschaften enden vorzeitig, meist als Frühaborte vor Beendigung der 12. Schwangerschaftswoche (Boué et al. 1975). Je jünger die Schwangerschaft ist, desto höher ist die Rate des Embryonenverlustes. Eine hohe Abortrate von 15-18% ist in der 6.-8.SSW zu verzeichnen, während die Abortrate von der 14.-17. SSW unter 5% liegt (Shapiro et al. 1971, Koller 1983). Diese Zahl gilt nur für klinisch erkannte Schwangerschaften, die mittels Ultraschall oder hCG-Bestimmung festgestellt werden konnten. Neuere Studien zeigen, dass bis zu 70% aller Konzeptionen schon vor dem Zeitpunkt der Regelblutung unerkannt absterben (Beck et al. 1998). Beobachtungen aus in vitro Fertilisations-Studien deuten sogar auf eine noch geringere Implantationsquote von unter 30% hin (Munné et al. 1995). Weitere 30% gehen in der frühen Post-Implantationsperiode verloren. Etwa 30-40% der frühen Fehlgeburten lassen sich nicht auf eine Chromosomenstörung oder eine exogene Ursache zurückführen und bleiben somit ätiologisch ungeklärt.

In das 2. Schwangerschaftstrimenon fallen nur ca. 10% der Aborte, ca. 1/3 davon weisen einen auffälligen Karyotyp auf (Tab. 1). Relativ wenig Information liegt über die chromosomale Konstitution von Totgeburten vor. Der Anteil von Chromosomenaberrationen beträgt hier weniger als 6% und ist somit wesentlich geringer als bei Spontanaborten.

Die Wahrscheinlichkeit eines Abortes steigt mit der Zahl der vorangegangenen Aborte. Frauen mit drei und mehr vorausgegangenen Fehlgeburten haben unabhängig vom Alter ein 3-fach erhöhtes Risiko für eine erneute Fehlgeburt in der folgenden Schwangerschaft im Vergleich zu Erstgebärenden. Auch wenn es sich möglicherweise um eine rein zufällige Aneinanderreihung von Aborten unterschiedlicher Genese handelt, kann dennoch ein gemeinsamer pathophysiologischer Faktor wirksam sein, welcher zu wiederholten Aborten führen kann. Erste prospektive Studien beschreiben ein Wiederholungsrisiko von rund 20% für Frauen nach Erstabort mit oder ohne Lebendgeburten in der Anamnese (Poland et al. 1977). Das entspricht dem allgemeinen Abortrisiko und ist somit nicht erhöht (siehe Kap. 1.3.2). Nach Auswertung von 10 Studien zur Abhängigkeit der Abortrate bezogen auf die Anzahl vorangegangener Aborte liegt die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Schwangerschaftsverlaufs noch über 65% (Stirrat 1990).

Differenziert man zudem zwischen chromosomal aberranten Erstaborten und Erstaborten mit unauffälligem Karyotyp, so scheint das Risiko für einen Abort in einer

nachfolgenden Schwangerschaft erhöht, wenn ein normaler Karyotyp im Abortmaterial gefunden wurde (16-17% versus 23%) (Boué et al. 1975, Geisler & Kleinbrecht 1978, Morton et al. 1987, Ogasawara et al. 2000). Für die Trisomien 13, und 18 sowie Aneuploidien der Geschlechtschromosomen ist das Wiederholungsrisiko in der nachfolgenden Schwangerschaft nicht wesentlich erhöht. In der Literatur wird das Wiederholungsrisiko für ein Down-Syndrom mit rund 0,62% für eine 20 Jährige und mit 0,85% für eine Frau unter 30 Jahren angegeben, wenn bereits ein Kind mit einer Trisomie 21 geboren wurde. Somit ist das Risiko für Frauen unter 30 Jahren 6mal höher als bei anderen Frauen ohne vorangegangene Schwangerschaft mit einem Down-Syndrom. Für diese nichtaltersabhängigen Risiken werden versteckte Mosaik oder kleine strukturelle Defekte eines Elternteils diskutiert (Morris et al. 2005). Dem erhöhten Wiederholungsrisiko liegt zumindest für einen Teil der Familien ein Gonadenmosaik bei einem Elternteil zugrunde (Bruyère et al. 2000).

1.3 Ursachen von Aborten

1.3.1 Einfluss des mütterlichen Alters

Eine positive Korrelation zwischen Spontanabortrate und mütterlichem Alter ist schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Das ermittelte durchschnittliche Abortrisiko liegt bei 13,5% (Kiely et al. 1986, Kline & Stein 1987, Fretts et al. 1992). Dies konnte durch eine neuere Studie, in der mehr als 1,2 Millionen Schwangerschaften in einem Untersuchungszeitraum von 14 Jahren erfasst wurden, bestätigt werden. Als einzig signifikanter Risikofaktor kristallisierte sich ein erhöhtes mütterliches Alter heraus (Nybo Andersen et al. 2000). Geringen Einfluss hatte dagegen die Anzahl vorausgegangener Aborte, Geburten bzw. der Konzeptionstermin. Danach haben Frauen unter 20 Jahren Abortraten um 10%, bei 40-jährigen steigt die Abortinzidenz auf über 35%, bei 45-jährigen beträgt die Rate sogar ca. 75% (vgl. Abb. 1). Zwei- und Dreifachtrisomien werden am häufigsten bei Schwangeren über 37 Jahre gefunden.

Wird die Abortrate auch nach Gestationswochen analysiert, so liegt diese in der Altersgruppe der 25-29 Jährigen in fast allen Schwangerschaftswochen am niedrigsten (Wulf & Schmidt-Matthiesen 1985).

Das Risiko für Totgeburten und ektopische Schwangerschaften ist ebenfalls abhängig vom mütterlichen Alter. Bei der Besprechung von Abortursachen in einer genetischen Beratung sollte diese Altersabhängigkeit stets berücksichtigt werden.

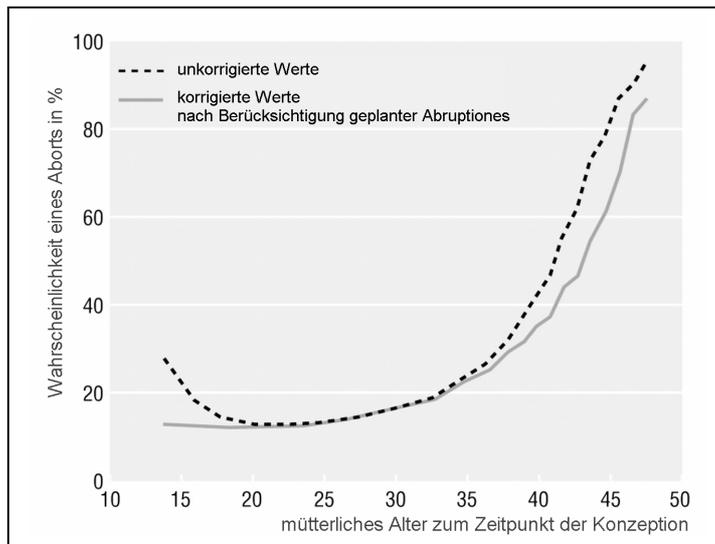


Abbildung 1:
Wahrscheinlichkeit
eines Spontanabortes
in Abhängigkeit vom
mütterlichen Alter
zum Zeitpunkt der
Konzeption (nach
Nybo Andersen et al.
2000)

1.3.2 Genetische Faktoren von Spontanaborten

Chromosomale Aberrationen sind eine wesentliche Ursache für die frühe Eliminierung einer Schwangerschaft. Die Rate der Chromosomenanomalien variiert in Abhängigkeit des Schwangerschaftsalters. Sie beträgt unter Frühaborten im Durchschnitt 50-60% (u. a. Boué et al. 1975, Eiben et al. 1990, Demjek et al. 1992, Gaillard et al. 1993). Der Anteil von Chromosomenaberrationen bei Aborten im 2. Trimenon beträgt 4-20%, wobei eine Abhängigkeit der Inzidenz chromosomaler Störungen von der Dauer der Fruchttretention nachzuweisen war. Mazerierte Feten wiesen in 17% einen pathologischen Karyotyp auf, gut erhaltene Feten hingegen nur in 4% (Gaillard et al. 1993).

Gesammelte Daten von fast 20000 karyotypisierten Spontanaborten zeigen, dass autosomale Trisomien mit ca. 58% die häufigste Anomalie sind, gefolgt von Monosomie X und Triploidien mit jeweils 15%, Tetraploidien mit 4,8% und strukturellen Aberrationen mit insgesamt 5,1%. Autosomale Monosomien wurden bisher nur sehr selten beobachtet. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand werden monosomale Konzeptionen nicht implantiert. Zum Zeitpunkt der Konzeption jedoch kommen ebenso viele Monosomien wie Trisomien vor, da es sich bei der Entstehung um einen reziproken Entstehungsmechanismus handelt. Die häufigste Trisomie der Autosomen ist die Trisomie 16 mit ca. 32%, gefolgt von der Trisomie 22 und 21 mit jeweils ca. 20% (Übersicht in Fritz 2002).

Die cytogenetische Abklärung von Aborten ist damit aus klinischen, therapeutischen und prognostischen Gründen indiziert. Es ist anzunehmen, dass innerhalb dieses

Kollektivs die Frequenz von chromosomalen Aberrationen unterschätzt wird, da nur in maximal 70% der Fälle eine konventionelle Chromosomenanalyse erfolgreich durchgeführt werden kann (Tab. 1).

Tabelle 1:
Häufigkeit von Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit des Gestationsalters. Auswertung von 631 Spontanaborten (Fritz 2002)

Schwangerschafts- wochen (p.m.)	Anzahl karyo- typisierter Aborte	Anzahl chromosomal auffälliger Aborte	cytogenetisch nicht analysierte Aborte
< 12	379	269 (71%)	12,5%
13 – 16	72	30 (41,7%)	17,2%
17 – 24	58	14 (24,1%)	31,8%
> 25	10	-	

Lediglich die Trisomien 13, 18 und 21 sowie Aneuploidien der Geschlechtschromosomen sind mit einer Entwicklung bis zur Geburt vereinbar. Für alle anderen numerischen Anomalien ist eine nahezu vollständige intrauterine Selektion bis zur Geburt gegeben. Infolgedessen nimmt die Häufigkeit von chromosomalen Veränderungen in Aborten mit zunehmendem Gestationsalter ab (Tab. 2, Jacobs 1990): Als weiterer Faktor wird eine genetische Prädisposition für ein Non-disjunction diskutiert. Untersuchungen zum Replikationsverhalten der Chromosomen bei Müttern nach Geburt eines Kindes mit Trisomie 21 weisen auf eine solche Prädisposition hin. Es scheint demnach eine Relation zwischen Verlust der Replikationskontrolle, Dysfunktion des Centromers sowie eine Prädisposition zur Non-disjunction zu bestehen (Amiel et al. 2000).

Tabelle 2:
Häufigkeit der verschiedenen chromosomalen Veränderungen bei Spontanaborten, Totgeburten und Neugeborenen (Jacobs 1990)

Population	Anomalien (%)						Summe abnormal
	45,X	Trisomie	Triploidie	Tetraploidie	Strukurelle Anomalien	Sonstiges	
Spontanaborte	8,6	26,8	7,3	2,5	2	0,7	47,9
Totgeburten	0,25	3,8	0,6	-	0,4	0,6	5,65
Neugeborene	< 0,05	0,3	-	-	0,25	0,02	0,57
Klinisch erkannte SS	1,3	4,31	1,1	0,38	0,76	0,15	0,8
Überlebenswahr- scheinlichkeit bis zur Geburt (%)	0,3	5,8	0	0	27	11,5	6

Im Vergleich zu Lebendgeburten sind Fehlgeburten mit einem hohen Anteil an Fehlbildungen belastet, insbesondere Neuralrohrdefekten, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Polydaktylien und Zyklopien. Mehr als die Hälfte aller Aborte gehen

mit einem aberranten Karyotyp einher (Hassold et al. 1980), wobei diese ebenfalls eine hohe Rate an phänotypischen Anomalien aufweisen (Kalousek et al. 1987, 1993, Philipp et al. 2003). In mehreren Studien über „missed abortions“ wurden insgesamt 262 Embryonen mittels Embryoskopie untersucht (Philipp & Kalousek 2002a, 2002b; Philipp et al. 2003). Die häufigsten beschriebenen Fehlbildungen sind Mikrocephalie, Extremitätenfehlbildungen, faciale Dysmorphien, Holoprosencephalie, Neuralrohrdefekte (insbesondere Anencephalie, Encephalocelen, Spina bifida), Gaumenspalten und allgemeine Wachstumsdisorganisation der Embryonen. Cytogenetische Untersuchungen ergaben am häufigsten Trisomien (59%), Monosomie X (23%), Polyploidien (13%) und in 5% Strukturanomalien. In Tabelle 3 wird der Zusammenhang zwischen morphologisch auffälligen Embryonen und aberranten cytogenetischen Ergebnissen dargestellt.

Tabelle 3:
Korrelation zwischen Morphologie und Karyotyp in „missed abortions“

	Philipp & Kalousek 2002a	Philipp & Kalousek 2002b	Philipp et al. 2003
Embryonen gesamt	19	10 *	233
Cytogenetik	15	8	221
aberranter Karyotyp total	9 (60%)	8 (100%)	165 (75%)
normaler Karyotyp total	6 (40%)	0	56 (25%)
Chromosomenanomalie in morphologisch normalen Embryos	20%	-	15/31 (48%)
Chromosomenanomalie in Embryonen mit isolierten Defekten	-	-	6/10 (60%)
Chromosomenanomalie in Embryonen mit kombinierten Defekten	70%	100%	98/114 (86%)
Chromosomenanomalie in Embryonen mit Wachstums- disorganisation	-	-	46/66 (70%)

* ausschließlich Embryonen mit Neuralrohrdefekten (Anencephalus, Encephalocеле, Spina bifida)

1.3.3 Entstehungsmechanismen von Aneuploidien / Polyploidien

Fehlverteilungen homologer Chromosomen geschehen häufig während der Keimzellreifung in Meiose I bzw. II. Aufgrund der großen Zahl von Zygoten mit chromosomalen Imbalancen lässt sich schließen, dass die Meiose ein sehr fehleranfälliger Prozess ist. Mögliche exogene Ursachen für eine erhöhte Aneuploidierate können beispielsweise ionisierende Strahlen, Rauchen, Alkoholkonsum, virale Infektionen und auch saisonale endokrinologische Schwankungen sein (Sperling 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die sensitivste

Phase der Oocyte gegenüber ionisierenden Strahlen der Zeitpunkt der Konzeption bzw. die Meiose II ist (Sperling et al. 1991, 1994, Mailhes & Marchetti 1994). Der offensichtlichste Faktor für ein gehäuftes Auftreten einer Non-disjunction sowohl in Meiose I und II ist ein erhöhtes mütterliches Alter. Insbesondere ab dem 35. Lebensjahr erhöht sich das Risiko für das Auftreten einer Trisomie. Hier zeigen die meisten cytogenetischen Studien eine klare Korrelation zwischen dem mütterlichen Alter und der Häufigkeit von Trisomien einschließlich der Trisomien für die Gonosomen. Im Gegensatz hierzu tritt die Monosomie X unabhängig vom mütterlichen Alter auf.

Aufgrund der Tatsache, dass Aneuploidien maternaler Herkunft vorherrschen und dem Fehlen des Verständnisses der menschlichen Meiose, wurden menschliche, nicht befruchtete Eizellen verstärkt cytogenetisch untersucht. Dabei lagen in 22,1% der untersuchten Eizellen chromosomale Aberrationen vor, wobei 10,8% aneuploide, 5,4% diploide und 2,1% strukturelle Aberrationen vorkamen (Tab. 4). Als Pathomechanismen zur Entstehung von Aneuploidien gilt ein Non-disjunction sowohl ganzer Chromosomen als auch einzelner Chromatiden (Pellestor et al. 2002).

analysierte Eizellen 1397	Eizellen gesamt (100%)
normaler Karyotyp 23,X	1088 (77,9%)
abnormaler Karyotyp	309 (22,1%)
hypohaploid	75
hyperhaploid	57
komplex aneuploid	12
extrem aneuploid	7
aneuploid	151 (10,8%)
diploid	75 (5,4%)
tetraploid	1 (0,07%)
strukturell abnorm	29 (2,1%)

Tabelle 4:
Häufigkeit chromosomaler
Imbalancen in cytogenetisch
untersuchten Eizellen
(Pellestor et al. 2002)

Eizellen-spezifische Gene spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der Eizellenentwicklung, und deren Wachstum, Fertilisation und frühe Embryonalentwicklung. Inzwischen sind eine Vielzahl von Genen identifiziert, die für eine korrekte Chromosomensegregation und für die Reparatur von DNA-Mismatches verantwortlich sind, u.a. *Spo11*, *Msh5* und *Mlh1* (Acevedo & Smith 2005). Ebenso spielen Centromerproteine bei der Segregation homologer Chromatiden in der Meiose eine wichtige Rolle. Mutationen in der Shugoshin-Proteinfamilie bewirken einen vorzeitigen Verlust der Bindung der Chromatiden am Centromer (Hamant et al. 2005). Die Entstehung einer Triploidie kann durch Diandrie oder Dispermie mit zwei Chromosomensätzen väterlicherseits und einem mütterlichen Chromosomensatz erklärt werden. Der sehr selten vorkommende 69,XXX-Karyotyp spricht für einen frühen

Entwicklungsstillstand, so dass der Abort eintritt, bevor die Schwangerschaft gesichert werden konnte. Gynoiden Triploidien dagegen sind charakterisiert durch zwei mütterliche und einen väterlichen haploiden Chromosomensatz.

Etwa 65% aller Tetraploidien weisen den Karyotyp 92,XXXX auf. Da die meisten Aborte mit einer Tetraploidie eine Gonosomenkonstellation XXXX oder XXXY zeigen, liegt ein Fehler während der ersten meiotischen Teilung der Eizelle vor (Wulf & Schmidt-Matthiesen 1985).

1.4 Parentale Herkunft chromosomaler Aberrationen - möglicher phänotypischer Effekt

Analysen mittels hochpolymorpher, chromosomenspezifischer Mikrosatelliten ermöglichen die Bestimmung der parentalen Herkunft chromosomaler Aberrationen. Diese zeigen, dass autosomale Trisomien überwiegend mütterlichen Ursprungs sind, wobei es aber bezüglich der einzelnen Chromosomen große Unterschiede gibt. So sind 90-95% der Trisomie 18-Fälle und nahezu 100% der Trisomie 16 mütterlichen Ursprungs (Kupke und Muller 1989, Nicolaidis & Petersen 1998). Lediglich 8,5% der Trisomie 21-, 11,9% der Trisomie 13- und 11,8% der Trisomie 15-Fälle sind väterlichen Ursprungs (Nicolaidis & Petersen 1998). In 50% der Trisomie 2-Fälle und 33,3% der Fälle mit einer Trisomie 8 konnte ebenfalls ein väterlicher Ursprung ermittelt werden (Hassold et al. 1996, Nicolaidis & Petersen 1998) (vgl. Tab. 5). Für die Inzidenz paternaler Trisomien scheint ein Zusammenhang zu der Größe der involvierten Chromosomen zu bestehen.

Trisomie	Ursprung Anzahl Fälle (%)	
	maternal	paternal
8	10 (66,7)	5 (33,3)
13	37 (88,1)	5 (11,9)
15	15 (88,2)	2 (11,8)
16	62 (100)	-
18	161 (91,5)	15 (8,5)
21	805 (91,5)	75 (8,5)
22	53 (96)	2 (4)

Tabelle 5: Parentaler Ursprung der häufigsten Aneuploidien bei Lebendgeborenen und Spontanaborten (Hassold et al. 1996, Nicolaidis & Petersen 1998)

Dass väterliche und mütterliche Genome funktionell nicht identisch sind, dokumentieren fetale Triploidien. Bei Vorliegen zwei väterlicher und einem mütterlichen haploiden Chromosomensatz (Diandrie), ist die Plazenta groß und weist zystische Veränderungen auf (Partialmole). Der Fetus selbst ist macrocephal und zeigt eine schwere intrauterine Wachstumsretardierung. Gynoiden Triploidien sind

charakterisiert durch eine kleine Plazenta ohne zystische Veränderungen und einem hypertrophen Fetus.

Der pathogene Effekt beruht auf einer unterschiedlichen Aktivität paternaler und maternaler Gene, ein Mechanismus der als *genomisches Imprinting* (Prägung) bezeichnet wird. Die parentale Herkunft einer Genom- bzw. Chromosomenmutation kann daher Einfluss auf die Penetranz und Expression und damit auf die phänotypische Manifestation eines genetischen Krankheitsbildes nehmen. Die meisten Gene unterliegen nicht einer elterlichen Prägung. Dies ist nur bei einer begrenzten Zahl einzelner Gene in definierten chromosomalen Bereichen von Bedeutung. Zwei wichtige Cluster mit geprägten Genen sind: a) 11p15.5 mit einer Größe von 1Mb mit Umfassung der Region für das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Maher & Reik 2000) und b) 15q11-q13 über eine Länge von 2,2Mb mit den Bereichen für das Prader-Willi- und Angelman-Syndrom (Meguro et al. 2001). Mehrere Untersuchungen belegen, dass nach assistierter Reproduktion (ICSI=Intracytoplasmatische Spermajektion) eine höhere Rate von maternalen Imprinting-Defekten auftreten. Dies gilt beispielsweise für das Angelman-Syndrom und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Cox et al. 2002, Gicquel et al. 2003, Ludwig et al. 2005).

Ebenso wird nach ICSI eine erhöhte Zahl chromosomaler de novo-Aberrationen und größerer angeborener Fehlbildungen beschrieben (Devroey & Van Steirteghem 2004). In einer Studie über 1586 Feten nach ICSI fanden sich in 3% (47 Feten) abnorme Karyotypen, wobei 1,6% (25) der Aberrationen neu entstanden waren. Von 22 vererbten strukturellen Anomalien wurden 17 vom Vater vererbt. In einem Fall mit einem 47,XXY-Karyotyp stammte das zusätzliche X-Chromosom ebenfalls vom Vater (Bonduelle et al. 2002).

1.5 Methoden zur Abklärung chromosomaler Ursachen in der Abortpathologie

1.5.1 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Mit der molekularcytogenetischen Methode der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) ist die Detektion spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe von markierten DNA-Sonden an Metaphasechromosomen oder Interphasekernen möglich. Die FISH hat die diagnostischen Möglichkeiten in der prä- und postnatalen Chromosomendiagnostik sowie auf dem Gebiet der Cytogenetik entscheidend verbessert. Dies gilt insbesondere für Chromosomenstörungen, die mit konventionellen cytogenetischen Methoden nicht oder nur schwer identifizierbar sind, wie z.B. die Identifizierung des genetischen

Ursprungs von Markerchromosomen und komplexen Translokationen. FISH ist grundsätzlich sensitiver als die konventionelle Cytogenetik beim Nachweis von Mikrodeletionssyndromen. Das sind klinische Syndrome, die auf submikroskopischen (< 3kb) Deletionen beruhen.

Chemisch gesehen ist die DNA ein linearer Polyester aus Desoxyribose und Phosphorsäure mit heterozyklischen Stickstoffbasen in der Seitenkette. Zwei solche DNA-Einzelstränge können durch Wasserstoffbrückenbindungen eine DNA-Doppelhelix ausbilden. Verglichen mit einer kovalenten Elektronenpaarbindung sind diese Wasserstoffbrücken schwache Bindungen, so dass durch Erwärmung auf Temperaturen um 70°C oder durch Zugabe organischer Lösungsmittel wie Formamid die Doppelhelix in zwei Einzelstränge getrennt werden kann. Dieser Vorgang wird Denaturierung genannt. Die Temperatur, bei der diese Separation des Doppelstranges stattfindet, wird als Schmelztemperatur bezeichnet.

Zwei DNA-Einzelstränge können nach einer Denaturierung wieder spezifisch zum Doppelstrang rekombinieren, wenn die Basensequenz der Einzelstränge zueinander komplementär ist. Diese spezifische Rekombination von DNA-Einzelsträngen verschiedener Herkunft zu einem Doppelstrang wird als Hybridisierung bezeichnet. Eine Hybridisierungsstelle kann dadurch nachgewiesen werden, dass man ein DNA-Molekül mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (siehe Abb. 2) und diesen nach erfolgter Hybridisierung durch eine geeignete Lichtquelle zur Fluoreszenz anregt. Setzt man als Ziel-DNA ein biologisches Präparat ein, so kann man durch diese spezifische Rekombination eine ganz bestimmte DNA-Sequenz, z.B. ein Chromosom oder einen Zellkern, nachweisen. Diese spezielle Hybridisierungsvariante wird Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung genannt.

Die FISH-Technik begründete Ende der 80iger Jahre die molekulare Cytogenetik. Durch neue Fluoreszenzfarbstoffe und sensitive Fluoreszenzmikroskopie konnten bald auch multiple Nukleinsequenzen direkt und präzise lokalisiert werden.

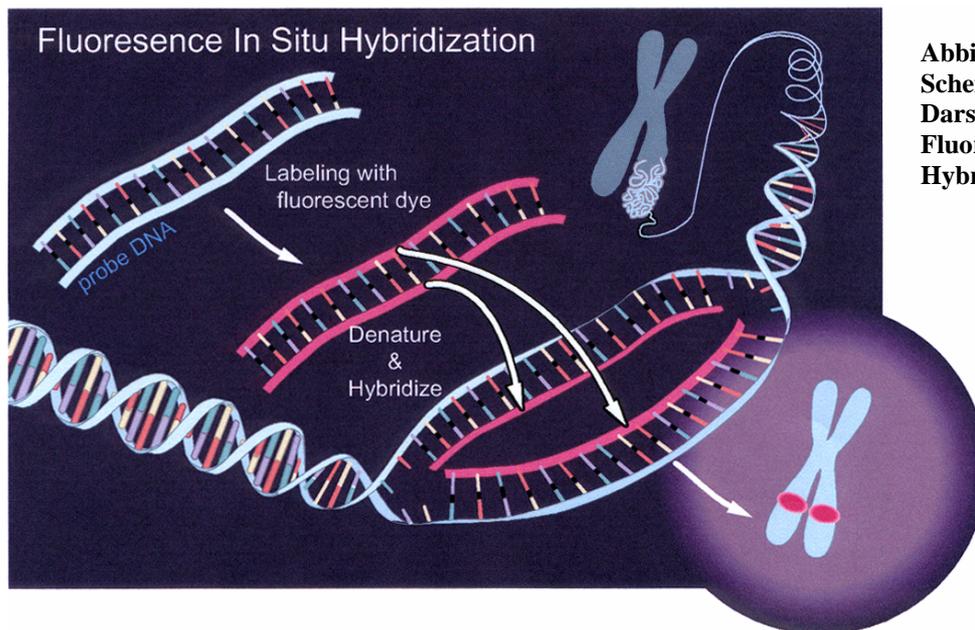


Abbildung 2:
Schematische
Darstellung einer
Fluoreszenz-in situ-
Hybridisierung

Eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Sonden für die cytogenetische Diagnostik steht heutzutage zur Verfügung (Abb. 3). Im Wesentlichen unterscheidet man 3 Typen von DNA-Sonden:

1. **Centromerspezifische Sonden (CEP):** Centromerspezifische Sonden binden sich an chromosomenspezifische hochrepetitive Satelliten-DNA. CEP-Sonden ermöglichen die Identifizierung von Markerchromosomen in Metaphasechromosomen oder den Nachweis numerischer Aberrationen im Interphasekern.
2. **Chromosome Painting Sonden:** Die Hybridisierung komplexer DNA durch Suppression repetitiver Elemente erlaubt es, individuelle Chromosomen oder Chromosomenabschnitte selektiv mit chromosomenspezifischen DNA-Pools (DNA-Bibliotheken) anzufärben. Chromosomenspezifische Sonden werden einzeln oder in 24-Farben-FISH-Experimenten (Multicolor-FISH) eingesetzt. Über M-FISH ist eine einfache und schnelle Identifizierung von chromosomalen Veränderungen insbesondere auch der Zuordnung des chromosomalen Ursprungs von Markerchromosomen in einem Versuchsansatz möglich.

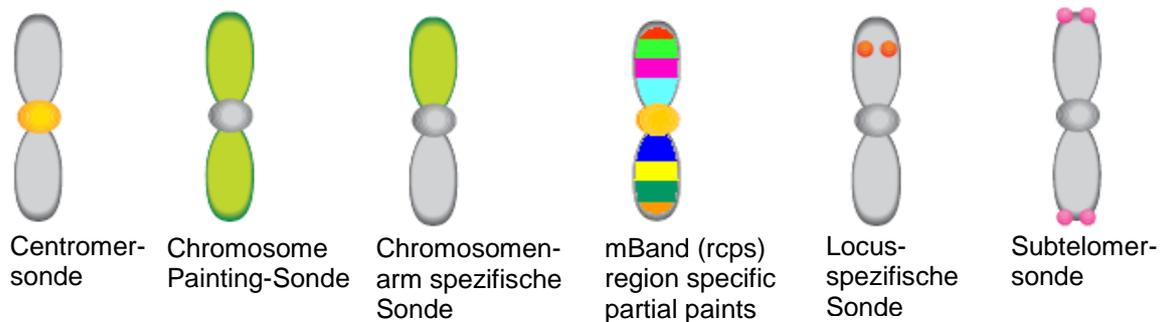
Noch spezifischere Aussagen über strukturelle Aberrationen einzelner Chromosomen erlaubt die mBand-FISH, eine Methode, bei der jedes Chromosom in einem eigenen Bandenmuster erscheint. Dabei werden regionenspezifische Bereiche eines Chromosoms auf dem Level der konventionellen Chromosomenbanden unterschieden. Diese Technik basiert auf dem Gebrauch unterschiedlicher

überlappender fluoreszenzmarkierter Mikrodissektionsbibliotheken, sogenannter „region specific partial paints“ (rscp).

3. **Locus spezific identifier (LSI-Sonden):** Mit Hilfe von locusspezifischen DNA-Sonden können subtile chromosomale Veränderungen durch Markierung einzelner Genorte aufgedeckt werden, die unterhalb des Auflösungsvermögens der konventionellen Cytogenetik liegen ($< 5\text{-}10\text{Mb}$). Die Sensitivität ist im Vergleich zur konventionellen Cytogenetik um das ca. 10fache erhöht. Locusspezifische Sonden werden gezielt für die genomische Lokalisation eines Gens, für die Detektion von Mikrodeletionen oder für den Nachweis chromosomaler Translokationen in Interphasezellkernen eingesetzt.

Subtelomer-Sonden sind spezifisch für den terminalen Abschnitt eines bestimmten Chromosomenarms (p/q) und dienen dem Nachweis von kryptischen terminalen Deletionen (Subtelomer-FISH) (vgl. Abb. 3).

Abbildung 3:
Verschiedene DNA-Sonden zum Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenveränderungen mittels FISH-Technik: Centromer-Sonden zur Bindung an repetitive Satelliten-DNA eines Chromosoms; Chromosomen- oder Chromosomenarm-spezifische Sonden (Chromosome Painting) zur Anfärbung eines bestimmten Chromosoms oder Chromosomenarms über die gesamte Länge; mBand zur Darstellung regionenspezifischer Bereiche; locusspezifische Sonden zur Markierung einzelner Genorte; Subtelomer-Sonden für die distalen Abschnitte einzelner Chromosomenarme



Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung ist eine spezifische und hoch sensitive Methode und bietet ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten für Diagnostik und Forschung. Der Nachweis kann sowohl an Metaphasechromosomen aus kultivierten Zellen als auch ohne Kultivierung direkt an Interphasezellkernen durchgeführt werden. Dabei kann die FISH-Methode auch solche Veränderungen aufdecken, die in der klassischen Cytogenetik nicht sichtbar sind. Da die LSI-Sonden in der Regel nur maximal wenige hundert Kilobasen und damit nur einen Bruchteil eines Chromosoms überspannen, ergeben sie vergleichsweise schwache Fluoreszenzsignale. Demzufolge werden hohe Anforderungen an die Sensitivität der FISH Mikroskopie gestellt (hohe Transmission, gutes Signal-Rausch-Verhältnis, hohe Auflösung und Farbtrennung).

1.5.2 Comparative Genomhybridisierung (CGH)

Während die Anwendung der FISH sowohl an Metaphasechromosomen als auch an Interphasekernen Kenntnis über die zu untersuchende Region voraussetzt, ermöglicht die in jüngster Zeit entwickelte Technik der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) komplette Genome auf chromosomale Veränderungen zu untersuchen. Die CGH wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen entwickelt (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993) und verbindet die Vorteile des molekularen Ansatzes, d.h. die Unabhängigkeit von der mitotischen Aktivität des zu untersuchenden Gewebes, mit den Vorteilen der Cytogenetik, nämlich der Darstellung des gesamten Chromosomenkompartiments. Somit bietet die CGH als Screeningmethode einen generellen Überblick über alle unbalancierten genetischen Veränderungen der zu untersuchenden DNA und ermöglicht eine Beurteilung der genomischen Veränderungen auf chromosomaler Ebene. Von besonderem Interesse ist, dass eine CGH auch an langjährig archiviertem Material durchgeführt werden kann, wobei auch sehr kleine Gewebeproben ausreichend sind. Im Bedarfsfall kann die DNA über eine PCR mit degenerierten Primern (DOP-PCR) universell vermehrt werden (vgl. Kap. 3.3.2.2), so dass für eine Analyse die DNA einiger Zellen ausreichend ist, um chromosomale Imbalancen gesichert zu erfassen (Lichter et al. 1996).

Anfänglich wurde die CGH ausschließlich als Screeningverfahren zur Aufdeckung von genetischen Imbalancen, bei der Suche nach involvierten Genen bei der Entstehung, Verständnis der Pathogenese und Progression von Tumoren und damit zur Klassifikation und Malignitätsbeurteilung in der Tumorcytogenetik eingesetzt (Bentz et al. 1995, Kallioniemi et al. 1995).

Im Laufe der letzten Jahre erfuhr die CGH allerdings auch in anderen diagnostischen Zusammenhängen, wie z. B. der Präimplantationsdiagnostik, der forensischen Wissenschaft, der Pränataldiagnostik oder der Fetalpathologie bei Fragestellungen aus der Reproduktionsmedizin, zunehmend an Bedeutung (Bryndorf et al. 1995, Hummel et al. 1999, Bartsch et al. 2001, Fritz et al. 2001, Delhanty 2005). Ebenso findet die CGH Anwendung in der Diagnostik von Patienten mit mentaler Retardierung und Dysmorphiezeichen mit normalem Karyotyp zur Aufdeckung submikroskopischer chromosomaler Rearrangements (Joly et al. 2001).

Im Rahmen der Fetalpathologie nimmt die Diagnostik und die ätiologische Zuordnung von Fehlbildungen eine zentrale Rolle ein, die bei nachfolgender genetischer Beratung Grundlage zur Abschätzung des Wiederholungsrisikos ist. Dem Verdacht auf eine chromosomale Aberration kann jedoch oftmals nicht nachgegangen werden, da eine

Autolyse oder eine vorangegangene Fixierung des fetalen Gewebes die Abklärung nicht zulässt (Dietze et al. 2004). Die Arbeitsgruppe von Bryndorf (1995) konnte erstmals nachweisen, dass mittels CGH numerische Chromosomenaberrationen in kultiviertem bzw. unfixiertem Placentagewebe sicher zu diagnostizieren sind. In der eigenen Arbeitsgruppe gelang retrospektiv der Nachweis einer Duplikation 2p bei zwei dystrophen Feten und einer Duplikation 1q bei einem makrocephalen Feten (Aviram-Goldring et al. 2000, Bartsch et al. 2001).

1.5.2.1 Methodischer Hintergrund der CGH

Die Methode der CGH basiert auf einer Markierung mit unterschiedlichen Fluorochromen von Test-DNA und Referenz-DNA. Definitionsgemäß wird die zu testende DNA mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (FITC) und die Referenz-DNA mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Texas Red) markiert. Bei den mit Fluorescein markierten Nukleotiden ist die emittierte Farbe abhängig von der genomischen Sequenz. G/C reiche Sequenzen erscheinen demnach mehr gelb als A/G reiche Sequenzen. Die Farbe der mit Texas-Red markierten Nukleotide wird jedoch gleichmäßig als blau/rot beschrieben. Jedes einzelne fluorochrommarkierte Nukleotid hat dabei sein eigenes Anregungsspektrum und seine spezifische Emission (Abb. 5).

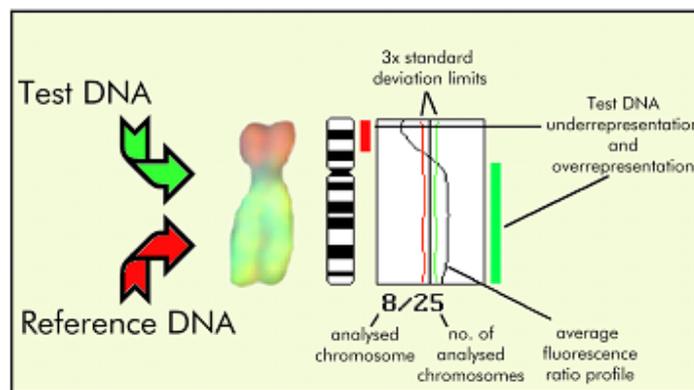
Zum Nachweis genetischer Imbalancen wird die zu testende DNA im Verhältnis 1:1 mit einer Referenz-DNA eines normalen männlichen Spenders gemischt. Diese DNA-Mischung wird an Metaphasechromosomen von gesunden männlichen Spendern hybridisiert. Das Vorgehen wird als *reverse in situ-Hybridisierung* bezeichnet, da bei diesem Verfahren nicht direkt die Chromosomen des zu untersuchenden Materials analysiert werden.

Bei der Anlagerung der DNA-Mischung an die korrespondierenden DNA-Abschnitte der Metaphasechromosomen konkurrieren die Anteile aus der Test- und Referenz-DNA um Bindung. Liegen alle Chromosomenabschnitte der Test- und Referenz-DNA im gleichen Verhältnis vor, so kommt es zu einer homogenen Mischanfärbung der Chromosomen. Sind jedoch in der Test-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA einzelne Chromosomenabschnitte überrepräsentiert, so färbt sich der betreffende Abschnitt des Metaphasechromosoms vermehrt in der Farbe der Test-DNA an. Fehlen in der Test-DNA Segmente, so überwiegt an der betreffenden Stelle die Färbung der Referenz-DNA. Die Fluoreszenzverteilung und -intensität an den hybridisierten Metaphasechromosomen wird mittels eines Bildanalyseprogramms für jedes Fluorochrom separat erfasst und in einem Fluoreszenzratioprofil verrechnet (siehe Abb. 4). Die

Ausprägung der Fluoreszenzunterschiede hängt dabei von der Größe des veränderten Chromosomenabschnitts sowie dem Anteil der veränderten Zellen in der Probe ab, aus der die Test-DNA gewonnen wurde. Die detektierbaren Veränderungen werden entweder als DNA-Gewinn oder –Verlust klassifiziert.

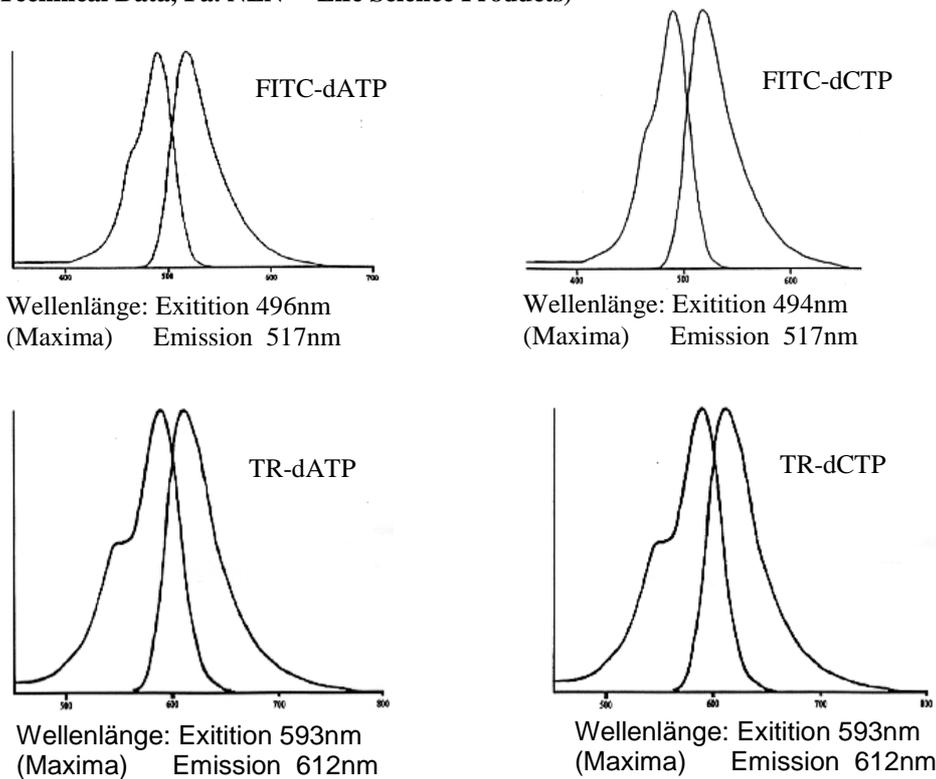
Abbildung 4:

Schematische Darstellung der vergleichenden Comparativen Genom-Hybridisierung (CGH): Test- und Referenz-DNA werden in einem Mischungsverhältnis von 1:1 auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Beide Proben konkurrieren um ihre spezifischen Bindungsstellen. Mittels digitaler Bildanalyse wird die Fluoreszenzverteilung und –intensität für jedes Fluorochrom separat erfasst und zu einem Fluoreszenzratio-Profil verrechnet. Bei gleichen Verhältnissen ergibt sich ein Profilwert von 1. Im Falle einer Über- bzw. Unterrepräsentation kommt es zu einem Abweichen des Fluoreszenzratioprofils von der Mittellinie. Ein einfacher Zugewinn (Trisomie) entspricht der Fluoreszenzratio von 3:2 (entsprechend 1.5:1) und ein einfacher Verlust (Monosomie) der Fluoreszenzratio von 1:2 (0.5:1). Mehrfache Zugewinne und Verlust ergeben entsprechend höhere oder niedrigere Ratiowerte (Rieder 1998).



Ausgeprägte genomische Imbalancen bewirken Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten, die am Mikroskop mit bloßem Auge erkennbar sind. Dagegen können kleinere Verschiebungen der Fluoreszenzfärbungen nur mit Hilfe einer rechnergestützten digitalen Bildanalyse der Farbzusammensetzung aufgedeckt werden (Forozan et al. 1997; Knuutila et al. 1998).

Abbildung 5:
Emissions- und Exitationsmaxima der entsprechenden fluorochrommarkierten Nukleotide
(Technical Data, Fa. NEN™ Life Science Products)



1.5.2.2 Sensitivität und Validität der CGH

Über CGH werden genetische Veränderungen auf chromosomaler Ebene lediglich als DNA-Zugewinne oder –Verluste im unbalanciertem Zustand erfasst. Sie lässt keine Aussagen zu balancierten Chromosomenveränderungen zu, die jedoch im Abortgeschehen eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Repetitive Sequenzen sind in hoher Zahl in allen Centromeren, Telomeren und einigen chromosomspezifischen Regionen wie 1p, 16p sowie den Chromosomen 19 und 22 vorhanden. Da die Länge dieser Regionen zwischen verschiedenen Individuen hochvariabel ist, können Abweichungen in der DNA der Test- und Referenzperson die CGH-Analyse stören (Weiss et al. 1999). Demzufolge werden die centromerischen und pericentromerischen Regionen sowie die kurzen (p-) Arme der akrocentrischen Chromosomen von einer CGH-Analyse ausgegrenzt (Kirchhoff et al. 1999). Des Weiteren sind Abweichungen der Fluoreszenzintensität (FI) in den Telomerbereichen der Chromosomen mit Vorsicht zu werten, da die FI graduell zu den Telomeren hin abnimmt (Kallioniemi et al. 1994). Bei der Detektion von Ringchromosomen und der Abklärung der genauen Bruchpunkte kann es hierbei zu Fehlinterpretationen kommen. Häufig treten auch falsch positive DNA-Zugewinne an den Chromosomenregionen

1p32→pter und 12q, sowie der Chromosomen 16, 19 und 22 auf. Da die Trisomie 16 eine der häufigsten Abortursachen ist, kann ein methodisch bedingter Zugewinn am Chromosom 16 ein falsch positives Ergebnis ergeben. Diese sind auf differente Hybridisierungseigenschaften der unterschiedlich markierten DNAs in GC-reichen Regionen zurückzuführen. Dieses methodische Problem, welches die CGH-Auswertung erschwert, kann durch eine reverse CGH, bei der die Test-DNA rot und die Referenz-DNA grün markiert ist, umgangen werden (Kallioniemi et al. 1994, Bryndorf et al. 1995, du Manoir et al. 1995).

Da die CGH-Analyse nur Änderungen der Anzahl eines DNA-Abschnitts in Relation zur durchschnittlichen Kopienzahl der Test-DNA erfasst, können Ploidie-Änderungen (zahlenmäßige Veränderungen eines haploiden Chromosomensatzes) nicht nachgewiesen werden. Triploidien bzw. Tetraploidien erzeugen keine Verschiebung im Fluoreszenz-Ratioprofil der einzelnen Chromosomen. Hinweise auf eine Ploidie-Mutation können allenfalls aus der relativen Ratio von grüner und roter Fluoreszenz erhalten werden, die über nachfolgende Untersuchungen (FISH mit locuspezifischen Sonden, Mikrosatellitentypisierung) zu bestätigen wären.

1.5.3 Mikrodissektion

Eine signifikante Limitierung der konventionellen cytogenetischen Bänderungstechniken ist, dass nicht alle cytogenetisch erkannten Aberrationen, wie z.B. Markerchromosomen oder unbalancierte Rekombinationen genau zu charakterisieren sind, insbesondere dann nicht, wenn das zu identifizierende Chromosomensegment keine charakteristischen Bänderungsstrukturen enthält. Im Rahmen der prä- und postnatalen cytogenetischen Diagnostik sowie in der Tumorcytogenetik nimmt die möglichst exakte Charakterisierung chromosomaler Aberrationen aber eine zentrale Rolle sowohl bei der ätiologischen Zuordnung von Fehlbildungen und Tumorentitäten als auch bei der genetischen Beratung als Grundlage zur Abschätzung eines Wiederholungsrisikos ein (z. B. Eggermann et al. 1996, Friedrich et al. 2001, Fritz et al. 2001).

Die Chromosomenmikrodissektion ist eine Methode, die es ermöglicht, von definierten Chromosomenregionen DNA zu erhalten. Sie stellt somit einen speziellen Aspekt der Zellchirurgie dar (Hagag & Viola 1993). Das bei der Dissektion isolierte Material bildet die Grundlage für vielfältige weitere Analysen, wie z.B. die Generierung spezifischer DNA-Sonden für die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung zur Abklärung chromosomaler Aberrationen. So befassen sich beispielsweise zahlreiche Publikationen mit der

erfolgreichen Charakterisierung von de novo Markerchromosomen in der pränatalen cytogenetischen Diagnostik (u.a. Meltzer et al. 1992; Müller-Navia et al. 1995, Hu et al. 2004). Die Isolierung spezifischer Zellpopulationen ermöglicht auch die retrospektive Analyse histologischer Präparationen, oder dient als Ausgangsmaterial für Genexpressionsstudien sowie gentechnologisch orientierte Forschungsvorhaben, beispielsweise für die Positionsklonierung zur Eingrenzung von Kandidatengen (Lüdecke et al. 1989, Walch et al. 2000, Burgess & Hazelton 2000).

Die ersten Mikromanipulationsinstrumente wie beispielsweise Mikronadeln wurden von DeFonbrune bereits 1949 entwickelt. Edström und Mitarbeiter (1964) nutzten diese Technik zur Isolierung subzellulärer Strukturen. Die Arbeitsgruppen von Scalenghe (1981) und Henning (1983) berichteten zu Beginn der 80er Jahre über die Anwendung der Methode der chromosomalen Mikrodissektion an Drosophila-Riesenchromosomen. 1986 erfolgte erstmals die Mikrodissektion eines menschlichen Chromosoms (Bates et al. 1986).

Eine Weiterentwicklung dieser mechanisch, manuell orientierten Mikrodissektion, die in hohem Maße von der Geschicklichkeit des Operators abhängig ist, ist die „Laser Capture Microdissection“ (LCM). Bei dieser Methode werden die ausgewählten Zellen mit Hilfe eines Lasers an einen Polymerfilm gebunden. Ein großer Vorteil ist, dass bei diesem Prozess das Gewebe nicht zerstört wird und die Morphologie der selektionierten Zellen erhalten bleibt. Die Präzision dieses Vorganges der LCM ist abhängig von dem optischen Auflösungsvermögen zur Identifikation der Targets. Zellstrukturen mit einer Größe von 3-5µm können isoliert werden. Die Entwicklung der LCM ermöglicht beispielsweise Untersuchungen von spezifischen Genexpressionsmustern von unterschiedlichen Geweben eines Patienten (Simone et al. 1998).

Methodische Voraussetzung und Ablauf einer Mikrodissektion

Grundvoraussetzungen sind:

- ein Invertoskop mit hoher Auflösung zur genauen Identifizierung der Chromosomen bzw. der Chromosomenbande.
- ein (manueller oder elektronisch gesteuerter) Mikromanipulator
Der Mikromanipulator steuert den Nadelhalter in der X-, Y- und Z-Achse. Die Dreiachsbewegung wird benötigt, um möglichst große Präzisionsbewegungen während des Dissektionsvorganges zu erreichen. Eine Hydraulikvorrichtung gestattet eine glatte und vibrationsfreie Bewegung.

- eine Apparatur für das Ausziehen der Mikronadeln („Pipettenpuller“)

Die Dissektionsnadeln werden mit Hilfe eines Pullers gezogen. Die Spitze muss eine Dicke von weniger als 0,5µm aufweisen und dennoch flexibel genug sein, um Druck auszuüben ohne zu brechen. Erreicht wird die Qualität optimalerweise durch eine Doppel-Pull-Methode, bei der die Nadeln in zwei Heizschritten gezogen werden.

Der methodische Ablauf lässt sich in die folgenden Schritte unterteilen (Abb. 6).

A: Präparation und Färbung geeigneter Metaphasechromosomen

Die Präparation, Färbung und Behandlung der Chromosomen für die Mikrodissektion hat Einfluss auf den gesamten Schneidevorgang. „Harte“ Chromosomen lassen sich präziser mikrodissezieren als „weiche“ Chromosomen. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn definierte Banden isoliert werden sollen (Senger et al. 1990). Die Härte der Chromosomen nimmt mit der Alterung in Ethanol und dem Trocknungsvorgang vor der GTG-Bänderung zu.

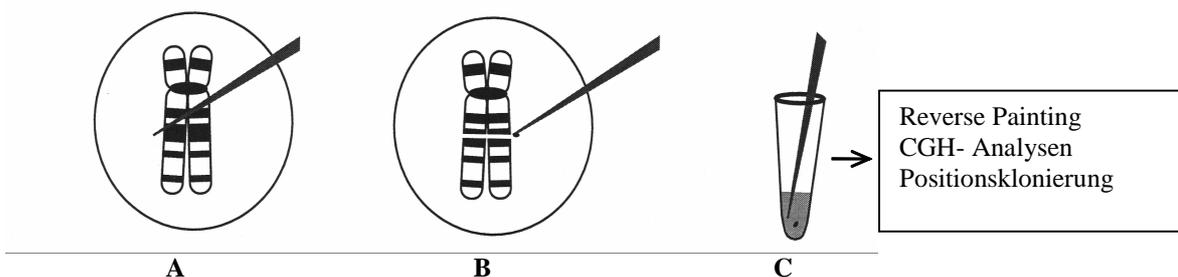
B: Dissektion der zu analysierenden Chromosomen/Chromosomensegmente mittels Mikronadeln über einen Mikromanipulator (B).

C: Sammeln der isolierten Fragmente in einem Reaktionsgefäß (C) zur weiteren Verwendung wie z.B. für die Generierung von DNA-Sonden.

Abbildung 6:

Schematische Darstellung der chromosomalen Mikrodissektion.

A: Identifizierung der gebänderten Chromosomen im Lichtmikroskop und Positionierung der Mikronadel; **B:** Herausschneiden der zu untersuchenden chromosomalen Region mit Hilfe der Mikronadel; **C:** Sammeln der chromosomalen Fragmente in einem Reaktionsgefäß für anschließende Untersuchungen



Die Mikrodissektion der zu untersuchenden Chromosomenregionen ermöglicht eine äußerst präzise cytogenetische Analyse aller Rearrangements (Markerchromosomen, balancierte bzw. unbalancierte Translokationen, Duplikationen, Deletionen und Insertionen) (Fritz et al. 2001, Sanchez-Garcia et al. 2001, Dietze et al. 2003).

Die Identifizierung unbekannter chromosomaler Rearrangements erfolgt dabei über eine FISH an Metaphasechromosomen eines gesunden Spenders. Der Begriff des *Reverse Chromosome Painting* wurde zuerst von Carter et al. (1992) geprägt. Hierfür wird die durch Mikrodissektion gewonnene DNA zunächst universell amplifiziert, in einer 2. PCR mit einem Fluorochrom markiert, mittels eines Trägerreagenz gefällt und als Sonde auf normale männliche Metaphasechromosomen für eine Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Die zugehörigen detektierten Signalpositionen erlauben die exakte Identifizierung von Chromosomenregionen, die in die Strukturveränderung involviert sind (Müller-Navia et al. 1996).

1.5.4 Mikrosatellitenanalyse zur Abklärung der parentalen Herkunft von Chromosomenaberrationen

Menschliche Satelliten-DNA besteht aus sehr langen Folgen tandemförmiger Wiederholungen von DNA-Sequenzen. Sequenzen dieser Art liegen im Allgemeinen zwischen den Genen oder innerhalb von Introns, werden nicht transkribiert und sind für die meisten heterochromatischen Bereiche im Genom verantwortlich (Strachan & Read 2005). Es gibt mehrere Hauptklassen direkter repetitiver Sequenzen (Tab. 6). Unter Mikrosatelliten-DNA versteht man eine kurze Folge tandemartiger Wiederholungen sehr einfacher Sequenzen von 1-12bp, die insgesamt meist kürzer als 0,1kb sind. Bei repetitiven Einheiten bestehend aus 2 Nukleotiden findet man häufig Folgen von CA (bzw. TG auf dem komplementären Strang). Diese nehmen 0,5% des Genoms ein und sind hochpolymorph. CT/AG- Wiederholungen erscheinen alle 50kb und haben einen Anteil von 0,2% im Genom. Repetitive Einheiten aus Tri- und Tetranukleotiden sind dagegen relativ selten, oft aber sehr polymorph und eher selten in codierenden Gensequenzen zu finden. Kommt es zur pathologischen Ausdehnung solcher Trinukleotid-Einheiten in codierenden Bereichen, können diese für Krankheitsbilder verantwortlich sein (z.B. Chorea Huntington, fragiles X-Syndrom).

Minisatelliten-DNA dagegen wird als mittellange Reihe (etwas 0,1-20kb) von kurzen sich direkt wiederholenden DNA-Sequenzen bezeichnet. Sie sind über größere Bereiche des Kerngenoms verteilt. Der größte Teil des Heterochromatins am Centromer besteht aus alphoider DNA mit einer Wiederholungseinheit von 171bp.

Tabelle 6:
Hauptklassen direkter repetitiver DNA- Sequenzen in der menschlichen DNA (nach Strachan & Read 2005)

Klasse	Größe der Wiederholungseinheit (bp)	Hauptsächliche Lokalisation auf den Chromosomen
Satelliten-DNA 100kb bis mehrere Megabasen lang	5-171	besonders an Centromeren
Satelliten 2 und 3	5	die meisten, möglicherweise alle Chromosomen
Satellit 1 (AT-reich)	25-48	Centromeren-Heterochromatin der meisten Chromosomen und andere Heterochromatin-Bereiche
α (alphan DNA)	171	Centromeren-Heterochromatin aller Chromosomen
β	68	Centromeren-Heterochromatin der Chromosomen 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22, Y
Minisatelliten (0,1-20kb)	9-64	alle Chromosomen, oft in Telomernähe alle Telomere
Hypervariable Familie	9-64	
Telomer- Familie	6	
Mikrosatelliten	12	verstreut auf allen Chromosomen, einige sehr kleine Bereiche mit sehr einfachen Sequenzen

Die Variabilität im menschlichen Genom ist weiterhin durch polymorphe DNA-Marker wie Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs), VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Polymorphismen (mittellange Minisatelliten-DNA von 5-64bp Länge), LINE (*long intersperced nuclear element*) und STR`s (*short tandem repeats* 8-25 Wiederholungen) charakterisiert. SNPs (*single nucleotid polymorphisms*) dagegen sind genetische Variationen in der Bevölkerung, die durch den Austausch einzelner Basen im Laufe der Evolution entstanden sind. Diese Marker finden hauptsächlich in der forensischen DNA-Analyse, bei der Kopplungsanalyse Abstammungsbegutachtung und Pharmakogenetik Anwendung. Bei der Pharmakogenetik werden zum einen neue Medikamente mit besserem Nutzen entwickelt und zum anderen geprüft, inwieweit die genetischen Anlagen den Erfolg einer Medikamententherapie beeinflussen.

Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Feststellung der parentalen Herkunft chromosomaler Aberrationen

Die zunehmende Entdeckung von hochinformativen Tri- und Tetranukleotidmarkern führte zu einer genomdeckenden Verteilung amplifizierbarer Loci. Dieser Schritt eröffnete die Möglichkeit der Erforschung phänotypischer Effekte chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit der parentalen Herkunft.

Aber auch bezüglich der Aufdeckung verschiedener Entstehungsmechanismen chromosomaler Aberrationen erweist sich die parentale Herkunftsbestimmung als hilfreich, da sich auf diese Weise der Elternteil festlegen lässt, bei dem die

Fehlverteilung stattgefunden haben muss. Davon ausgehend können ursächliche Faktoren wie z.B. im Falle der Trisomien ein erhöhtes mütterliches Alter untersucht werden.

Die meisten Informationen über die elterliche Herkunft von Chromosomenstörungen hat man aus Familienuntersuchungen von lebendgeborenen Probanden mit den häufig auftretenden Trisomien 13, 18 und 21 gewonnen. Über den elterlichen Ursprung der verschiedenen Aneuploidien in Spontanaborten ist relativ wenig bekannt und die Fallzahlen sind vergleichsweise gering. Generell zeigte sich, dass autosomale Trisomien überwiegend auf einen Segregationsfehler in der mütterlichen Gametogenese beruhen (Tab. 7).

Die Analyse von hochpolymorphen chromosomenspezifischen Mikrosatelliten erlaubte neben der Feststellung der parentalen Herkunft der Chromosomenaberration auch Aussagen über die Verteilung von crossing-over Ereignissen, die Rückschlüsse zulassen, in welchem Stadium sich das Non-disjunction ereignet haben muss.

Tabelle 7:

Parentaler Ursprung von einigen ausgewählten Aneuploidien in Spontanaborten (Lorda-Sanchez et al. 1992, Hassold et al. 1992, 1995, Fisher et al. 1993, 1995, Robinson et al. 1999).

Trisomie	n	Ätiologie des überzähligen bzw. fehlenden Chromosoms	
		maternal	paternal
13	10	8 (80%)	2 (20%)
15	59	51 (86%)	8 (14%)
16	62	62 (100%)	
20	3	3 (100%)	
21	22	22 (100%)	
22	55	53 (96%)	2 (4%)
45,X	52	43 (83%)	9 (17%)

Wegen der geringen Größenunterschiede ist zur Analyse der Mikrosatelliten eine gelelektrophoretische Auftrennung in einer hochauflösenden Polyacrylamidmatrix notwendig. Voraussetzung für parentale Zuordnung ist eine Heterozygotie der zu untersuchenden Loci. Bei einer Trisomie sind im fetalen Gewebe entsprechend den dreifach vorhandenen Chromosomen drei Allelbanden nachzuweisen. Bei Vorliegen von homozygoten Markern kann eine Auswertung auch anhand eines Dosis-Effekts erfolgen (vgl. auch Abb. 27).

1.6 Ziel der vorliegenden Dissertation

Das Ziel dieser Dissertation ist die retrospektive, möglichst genaue molekularcyto-genetische Charakterisierung von bisher nicht exakt zuzuordnenden Chromosomenstörungen von ätiologisch ungeklärten Aborten mit morphologisch auffälligen Feten. Mit diesem Projekt soll einerseits auf Phänotypenebene, andererseits auf molekularcyto-genetischer Ebene ein Beitrag zur Ursachenforschung von Entwicklungsstörungen während der Embryogenese geleistet werden. Denn erst die Kenntnis der genauen Herkunft überzähliger oder verloren gegangener Chromosomensegmente und die Bestimmung ihrer Bruchpunkte erlaubt eine Stellungnahme zur Frage der phänotypischen Manifestation und Prognose einer Chromosomenanomalie und ist im Rahmen einer Pränataldiagnostik häufig entscheidend für Fortführung oder Abbruch einer Schwangerschaft. Über die Korrelation mit den erhobenen klinischen Daten soll daher eine Aufstellung von prognostischen Kriterien angestrebt werden, die bei der genetischen Beratung Betroffener und ihrer Familien hilfreich sein können.

Insgesamt sollen 55 Abortfälle bearbeitet werden, deren jeweilige fetale Fehlbildungen einen begründeten Verdacht auf eine chromosomale Störung geben. Die Untersuchungen sollen an verschiedenen asservierten fetalen oder placentaren Gewebeproben erfolgen.

Ein wesentlicher Teil der Arbeit soll in der Evaluierung und Optimierung von Methoden zur DNA-Isolierung aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe als grundlegende Voraussetzung für die weiterführenden molekularcyto-genetischen und molekulargenetischen Methoden liegen. Es sollen einflussnehmende Parameter auf die Qualität der DNA evaluiert werden. Des Weiteren soll insbesondere die komplexe Methode der CGH-Analyse mit DNA aus archiviertem Abortgewebe optimiert werden, um retrospektiv den Nachweis von Chromosomenaberrationen zu ermöglichen. Anhand der ausgewählten fetalpathologischen Fälle sollen die Möglichkeiten, Probleme und Grenzen bei der Evaluierung von chromosomalen Aberrationen an Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material ermittelt werden.

Die Ergebnisse sollen möglichst mit weiteren molekularcyto-genetischen und molekulargenetischen Methoden überprüft werden. Wenn möglich, soll zudem die Abklärung der parentalen Herkunft der jeweiligen Chromosomenstörung erfolgen, um zu prüfen, ob die parentale Herkunft Einfluss auf den Manifestationszeitpunkt, Typ und Schweregrad sowie auf den Ausgang der Schwangerschaft nehmen kann.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien für die Puffer und Lösungen wurden in p.A.-Qualität bezogen. Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen ausschließlich von den folgenden

Firmen:

Gibco BRL (USA), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe).

Agarose	Gibco BRL, USA
Albumin Bovine (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Anti-Digoxigenin-Fluorescein Fab-Fragments	Boehringer, Mannheim
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bariumhydroxid	Merck, Darmstadt
Biotin-11-dUTP	Sigma, Deisenhofen
Biotinylated Anti-Avidin D	Vektor, USA
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma, Deisenhofen
Dextransulfat	Pharmacia, Wien
DNA 100 base pair Ladder	ROCHE, Mannheim
DNA Marker VIII	ROCHE, Mannheim
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Serva, Heidelberg
Euparal	Schmid, Köngen
Fluorescein Avidin DCS (Cell Sorter Grade)	Vektor, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt
Gellösung A	Roth, Karlsruhe
Gellösung B	Roth, Karlsruhe
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hering Sperm DNA (10mg/ml)	Promega, USA

Human COT 1-DNA	Invitrogen, Berlin
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalium-di-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Marabu Fixogum Rubber Cement	Erich Feucht GmbH, Tamm
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Riedel-de Häen, Seelze
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NP-40	Merck, Darmstadt
Nuclei Lysis Solution	Promega, USA
Polyoxyethylensorbitan Monolaurate (Tween20)	Sigma, Deisenhofen
Protein Precipitation Solution	Promega, USA
Salpetersäure 65%	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sodium Dodecyl Sulfate	BRL, USA
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Texas Red Avidin DCS	Vektor, USA
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypsin	DIFCO, USA
Vectashield Mounting Medium	Vektor, USA
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.2 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen, Puffer und Nährmedien werden, wenn nicht anders angegeben, mit entmineralisiertem Wasser angesetzt, autoklaviert oder sterilfiltriert. Der pH-Wert wird mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

2.2.1 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Antibiotikum / Antimycotikum-Lösung:	Gibco BRL, USA
Amphotericin (25µg/ml)	
Penicillin/Streptomycin (10.00 units/ml)	
Chang-Medium A, Supplement B	Laboserv, Gießen
Colcemid-Lösung (10µg/ml)	Boehringer, Mannheim
fetales Kälberserum	Gibco BRL, USA
L-Glutamin 200M (100x)	Gibco BRL, USA
Mc Coy's 5-Medium	Gibco BRL, USA
Natriumbicarbonat 7,5%	Gibco BRL, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (1x): (Trypsin 0,5%; EDTA 0,2%)	Biochrom, Berlin
Hypotone Lösung adhaerente Zellen: 0,5% NaCitrat / 75mM KCl (1:1, vol: vol)	
Suspensionskulturen: 75mM KCl	
PBS-Puffer: 8g NaCl; 0,2g Na ₂ HPO ₄ ; 0,2g KCl; 1,15g KH ₂ PO ₄ ; ad 1000ml A. bidest; pH 7,2	
Fixativ-Lösung: Ethanol/Eisessig (3:1, vol:vol)	

2.2.2 Puffer und Lösungen für die Chromosomen-Bänderung

GTG-Bänderung für die cytogenetische Diagnostik

Sörensen-Puffer: 38,8ml KH ₂ PO ₄ -Lösung; 61,2ml Na ₂ HPO ₄ -Lösung	
Natrium-di-hydrogenphosphat-Lösung: 11,8g Na ₂ HPO ₄ ad 1000ml A. bidest.	
Kalium-di-hydrogenphosphat-Lösung: 9,1g KH ₂ PO ₄ ad 1000ml A. bidest.	
Giemsa-Lösung: 8% in Sörensen-Puffer	
Trypsin: Lyophilisat resubstituieren mit 5ml A. dest., aliquotieren zu je 0,5ml und bei -20°C lagern	
Versen-Stammlösung: 0,2g EDTA ad 1000ml PBS-Puffer	
Versen-Trypsin-Gebrauchslösung: 30ml Versen-Stammlsg.; 0,5ml Trypsin	

GTG-Bänderung für die Mikrodissektion

Ethanol: 70%

Giemsa-Lösung: 30,6ml Na₂HPO₄ + 19,4ml KH₂PO₄ gut durchmischen und davon 4ml entnehmen + 4ml Giemsa zugeben

PBS-Puffer

Versen-Stammlösung

Versen-Trypsin-Gebrauchslösung: 50ml Versen-Stammlsg. + 833µl Trypsin (aliquotiert und bei -20°C gelagert)

2.2.3 Puffer, Lösungen, Sonden und Antikörper für die in situ-Hybridisierung

20xSSC: 350,4g NaCl + 176,4g Na-Citrat ad 2l A. dest.; pH 7,4

4xSSC: 20ml 20xSSC + 80ml A. dest.

2xSSC: 100ml 20xSSC + 900ml A. dest.

1xSSC: 50ml 20xSSC + 950ml A. dest.

0,1xSSC: 5 ml 20xSSC + 995ml A. dest.

Blockungslösung: 4xSSC/Tween/3%BSA: 20ml 4xSSC + 0,5ml Tween20 + 0,6g BSA, aliquotieren a 1ml und bei -20°C lagern

2xSSC/Tween: 10ml 20xSSC + 900ml A. dest. + 1,8ml Tween20

Natronlauge: 93ml A. dest. + 7ml NaOH 1 N

Mastermix: 11ml Formamid deion. + 2g Dextransulfat + 1ml 20xSSC vortexen

Anti-Avidin-FITC, Biotin konjugiert: Stocklsg. 1mg/ml A. bidest.; Gebrauchslsg. 1:200 verdünnt mit 4xSSC/Tween20/1% BSA (vol:vol:vol), Endkonz. 5µg/ml

Anti-Digoxigenin-Rhodamin-Fab-Fragment: Stocklsg. 200µg Lyophilisat/ml A. bidest.; Gebrauchslsg. 1:10 verdünnt; 1ml 4xSSC/Tween20 + 1%BSA (vol:vol:vol) Endkonz. 20µg/ml

Antikörper für Verstärkungsreaktion: Antidigoxigenin-FITC/-Rhodamin

DAPI: 70ml 4xSSC/Tween20 + 84µl DAPI-Stocklsg. (200µg/ml)

für M-FISH

24 Xcyte: 24 color probe mix (2x60µl)

Antikörper-Detektionsmix (B-tect): Blockungslösung (2x1000µl)

Detektion 1+3 (2x10µl)

Detektion 2 (2x5µl)

für CGH

Nicktranslationskit (Abbott Laboratories):

unmarkierte Nukleotide (dATP; dGTP; dCTP; dTTP; 0,3mM)

Nicktranslationspuffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100 mM MgSO₄), 1 mM DDT

Nicktranslationsenzym-Mix: DNA Pol 1, DNase 1 in 50% Glycerol

Markierte Nukleotide: FITC-dATP, FITC-dCTP, Texas Red-dATP, Texas Red-dCTP (1mM, Fa. NEN)

Human COT 1-DNA (1µg/ml)

Natriumacetat: 3M; pH 7,0

Formamid: 100% deionisiert mit Ionenaustauscher Dowex, pH 7,0, filtriert, aliquotiert und bei 4°C gelagert

Mastermix I: 4xSSC (10ml) / 20% Dextransulfat (2g)

Mastermix II: 11ml Formamid deion., 2g Dextransulfat, 1ml 20 x SSC; gevortext und gelöst bei 70°C; pH 7,0

männliche gesunde Referenz-DNA mit definierter Konzentration (1µg/ml)

Test-DNA

DNA-Sonden zur Verifizierung und weiteren Abklärung der Ergebnisse

Tabelle 8:

Sonden zur Abklärung und Verifizierung der ermittelten Karyotypen (bio = Biotin; dig = Digoxigenin; SG = Spektrum Green; SO = Spektrum Orange)

Sonden-Typ	Markierung	Firma	Fall- Nr.
Whole Chromosome Painting- Sonden			
WCP X	direkt markiert (SG)	Vysis	V-2351/02
WCP 6	direkt markiert (SO)	Vysis	V-2309/01
WCP 8	direkt markiert (SG)	Vysis	118/02
Centromer spezifische Sonden			
D4Z1	direkt markiert (SG)	Vysis	O-1910/01
D8Z1	direkt markiert (SO)	Vysis	118/02
D14Z1 / D22Z1	bio	Oncor	V-1771/95
D12Z1	direkt markiert (SG)	Vysis	V-1771/95
DXZ1	direkt markiert (SG)	Vysis	V-2351/02
Locus-spezifische Sonden			
WHSCR (4p16.3))	direkt markiert (SG)	Vysis	O-1910/01
D4S96	dig	Oncor	O-1910/01
D4S3359 (4ptel)	direkt markiert (SG)	Vysis	O-1910/01
GLI (12q13)	dig	Oncor	V-1771/95
D8S504 (8ptel)	direkt markiert (SG)	Vysis	118/02, V-2309/01
8qtel	direkt markiert (SO)	Vysis	11802
LSI21	direkt markiert (SO)	Vysis	O-2017/02
Telomer-spezifische Sonden			
All Human Telomeres	dig	Oncor	O-1919/01

2.2.4 PCR-Zusätze und Primer

Enzyme: AmpliTaq® DNA-Polymerase GeneAmp® + 10xPCR-Puffer + 50mM MgCl₂, Perkin Elmer AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase GeneAmp® + 10xPuffer (enthält MgCl₂), Perkin Elmer

dNTP-Stammlösung: DNA-Polymerisation-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Perkin Elmer

DOP- Primer: DopMueNa 5'-CCG-ACT-GCA-GNN-NNN-NAT-GTG-G-3'

Bio-11-dUTP: 50nmol, 1mM

BSA acetyliert: 10mg / 2ml A. dest. gelöst Stammlösung, Endkonz. 5ng/μl

Sammelpuffer: 1M MgCl₂ Stammlsg., Endkonz. 2,5mmol/l; 1M KCl Stammlsg., Endkonz. 50mmol/l; 1M Tris-HCl Stammlsg., 10mmol/l; Brj 0,1%; Gelatine 2%, Endkonz. 0,1 mg/ml

Replithempuffer: 1 M Tris-HCl Stammlsg., Endkonz. 200mM; 2M KCl Stammlsg., Endkonz. 1M; Tween Stammlsg., Endkonz. 0,1%; NP-40 Stammlsg., Endkonz. 1%

DOP PCR Master (ROCHE): DOP PCR Primer; steriles A. bidest.; DOP PCR Mastermix: 20mM Tris-HCl; 100mM KCl; 3mM MgCl₂ ; 0,01% Brij 35; je 0,4mM dATP+ dCTP+ dTTP+ dGTP und 25U Taq-Polymerase

CombiPol DNA Polymerase (Invitek):10xOptiPerform-Puffer ohne Mg²⁺ ; 50mM MgCl₂; 5xOptiZyme Enhancer; CombiPol Polymerase (4U/μl)

2.2.5 Lösungen und Reagenzien für die DNA-Isolierung

Kitsysteme:

All tissue DNA Kit (Fa. GEN-IAL, Troisdorf): Xylol; 100% / 70% Ethanol
Isopropanol

Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Fa. Invitek, Berlin): Xylol; RNase (20mg/ml)

nach Proteinausfällung: Xylol
100% / 70% Ethanol
Nuclei Lysis Solution (Promega)
Proteinase K (10mg/ml)
RNase (20mg/ml)
Protein Precipitation Solution (Promega)
3M Natriumacetat
Lineares Polyacrylamid (Sigma) 5mg/ml

QIAamp DNA Blood Maxi Kit

Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe

SE-Puffer: 75mM NaCl + 1mM Na₂-EDTA; pH 8,0

SDS: 10%iges Sodium Dodecyl Sulfate

NaCl (5M): 146,1g ad 500ml A. dest.

100% / 70% Ethanol eiskalt

2.2.6 Lösungen und Reagenzien für die DNA-Fällung

Ethanol: 70% / 100%

Mastermix: 50% Formamid/ 10% Dextransulfat/ 2xSSC

flüssiger Stickstoff

Natriumacetat: 3M; pH 7,0

Lineares Polyacrylamid (Sigma) 5mg/ml

2.2.7 Lösungen und Reagenzien für die Agaroseelektrophorese

1%iges Agarosegel

Agarose: 1g ad 100ml 1xTBE + 1µl Ethidiumbromid (1%)

Gel-/Laufpuffer: 10xTBE: 1,34M Tris-Base + 750mM Borsäure + 25mM EDTA,
81,17g Tris + 23,19g Borsäure + 4,65g EDTA ad 1l; pH 8,8

Gelladepuffer

0,25% Xylencyanol

0,25% Bromphenolblau

30% Glycerin

Molecular Weight Marker VIII

35µl Marker VIII (0,25µg/µl)

35µl 10xTBE

180µl A. dest.

100µl Bromphenolblau (20mg/ml)

2.2.8 Lösungen und Reagenzien für die Polyacrylamidgelelektrophorese

Zusammensetzung eines 8%igen Polyacrylamidgels (Gesamtvolumen 75ml)

Acrylamidlösung 30% (Gel A, Roth): 19,4ml

Bisacrylamidlösung (Gel B, Roth): 9,9ml

1xTBE-Puffer: 45,7ml (55,02 g/l Borat (Borsäure), 107,8g/l Tris (-base), 7,44g/l EDTA
ad 1000ml A. bidest, pH 8,0)

10% Ammoniumpersulfat: 750µl (0,45g APS + 4,5ml A. dest.)

TEMED (Tetramethyldiamin): 50µl

Reagenzien zur Silberfärbung

10% Essigsäure

Färbelösung: 0,2% Silbernitratlösung (800mg in 400ml A. dest.)

Entwicklungslösung: 100ml 30%ige Natriumcarbonatlösung + 485µl 37%iges

Formaldehyd

Gelfixierlösung: 20ml Glycerin (2%) + 280ml 96% Ethanol + 700ml A.dest.

100bp Ladder

5µl Marker 100bp (1µg)

25µl 10xPCR-Puffer

220µl A. dest. + 50µl (Bromphenolblau/Xylencyanol 20mg/ml)

2.3 Geräte und Zubehör

Nicht aufgeführt sind Werkzeuge und Geräte der Laborgrundausrüstung.

2.3.1 Geräte und Zubehör für die Mikrodisektion

Axiovert S100	Zeiss, Jena
Deckgläser (26x76mm/Dicke 1mm)	Menzel, Braunschweig
Glasstäbe (1mmx15cm)	Sarasota, England
Mikromanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg
Monitor (Trinitron)	Sony, Japan
Puller (Typ P10)	Narishige Group

2.3.2 Sonstige Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
Automated Gel Stainer	Pharmacia Biotech
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
Filtriereinheiten (steril)	
Sartolab V115	Sartorius, Göttingen
Sartolab V500	Sartorius, Göttingen
Fluorometer (TKO)	Hofer, USA
Gelelektrophoresekammer horizontal	Gibco BRL, USA
Gelelektrophoresekammer vertikal Model SA	Gibco BRL, USA
Gelelektrophoreseschlitten	AGS, Heidelberg
Gelkämme für Agarosegele	AGS, Heidelberg
Large Cellophane	Novex, USA
Magnetrührer Ikamag RO	Ika-Werk, Staufen

Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Jena
Axioskop MC 100, Axioplan 2	Zeiss, Jena
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle Typ MWD 2920	Bauknecht, Schorndorf
Omni Gene-Apparat	HPW Diagnostics, Rabenau
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer UV-160	Shimadzu, Japan
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Micro-Bio-Tec Brand,
Wertheim	
Power Supply	
High Voltage P30	Biometra
E442	Biotechnologie-Systeme, Heidelberg
Reaktionsgefäße	
Falcontubes (50ml)	Falcon, USA
Kryoröhrchen (1,5ml)	Nunc, Wiesbaden
Micro-Test-Tubes (1,5ml; 0,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	GFL, Münster
Software	
Ikarus	Metasystems, Altlußheim
Isis	Metasystems, Altlußheim
Spannungsgeber	Biometra, USA
Steril-Werkbank Laminar Air (Typ HB 2448)	Heraeus, Hanau
Thermocycler	MWG, Ebersbach
Tischzentrifugen	
Mikrozentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus, Hanau
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Biofuge 28RS	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe + Kühlaggregat	Bachhofer, Reutlingen
Waagen	
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Wärmeplatte	Heraeus, Hanau
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Kottermann
Zellkultureinweg-Material (steril)	Falcon, USA

3 Methoden

3.1 Untersuchungsgut

Das Institut für Klinische Genetik verfügt über eine Sammlung von mehr als 2000 fetalpathologischen Fällen und mehr als 2700 Frühaborten. Unter diesen wurden 55 Fälle ausgewählt, bei denen das fetale Fehlbildungs- bzw. Dysmorphiemuster eine chromosomale Störung vermuten ließ, bei denen die konventionell durchgeführte Chromosomenanalyse jedoch unzureichende Befunde ergeben hatte.

Bei dem Untersuchungsgut handelte es sich ausschließlich um zur Routinediagnostik eingesandtes Material. Bei der Bearbeitung patientenbezogener Daten wurde entsprechend den Richtlinien des Datenschutzes verfahren. Jede Probe wurde mit einer Kenn-Nummer versehen und nur unter dieser Etikettierung bearbeitet.

Die Aborte wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Ø Aus der autoptischen Beurteilung des Fetus ergab sich ein Verdacht auf eine chromosomale Aberration.
- Ø Konventionelle cytogenetische Diagnose hatte unzureichende Beurteilung hinsichtlich der diagnostizierten genetischen Imbalancen ergeben.
- Ø Primär sollten zunächst Aborte mit unbalancierten Translokationen und nicht identifizierten Markerchromosomen analysiert werden.
- Ø Es lag eine unbekannte Chromosomenstörung bei auffälliger Placentahistologie bzw. phänotypisch auffälliger Feten vor. Es konnte jedoch kein Zellwachstum des bei der Obduktion/Untersuchung des Abradats entnommenen Materials erzielt werden.

In 6 Fällen handelte es sich um Frühaborte der 6. - 12. SSW, in 39 Fällen um Spätaborte/intrauteriner Fruchttod zwischen der 14. – 38. SSW. In 9 Fällen lagen keine Informationen bezüglich der Schwangerschaftswoche vor. In einem Fall handelte es sich um ein Neugeborenes.

Die Untersuchung wurde an DNA aus Placentazotten, Amnion- oder fetalem Gewebe bzw. asservierten Chromosomensuspensionen und in einem Fall an EDTA-Blut durchgeführt. Der Einsatz der jeweiligen molekularcytogenetischen Techniken zur Abklärung der chromosomalen Störung war abhängig von der Art des asservierten Materials. Sie umfassten die Erhebung des chromosomalen Status mittels CGH (Kap. 3.3.2) einschließlich der Überprüfung der CGH-Ergebnisse mittels Mikrosatellitenanalyse (vgl. Kap. 3.4.6.1), bzw. die präzise Abklärung von

rearrangierten Chromosomen mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (Kapitel 3.3.1) und chromosomaler Mikrodissektion (vgl. Kapitel 3.3.3). Wenn möglich, sollte über eine molekulargenetische Markertypisierung die parentale Herkunft der Chromosomenstörung eruiert werden.

42 Fälle, von denen ausschließlich Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Verfügung stand, wurden über eine CGH/Mikrosatelliten-Analyse bearbeitet. In 11 Fällen stand natives Gewebe zur Verfügung. 2 Fälle, von denen eine Fibroblastenkultur bzw. eine Chromosomensuspension asserviert wurde, sollen über Mikrodissektion analysiert werden. Genaue Angaben zu den Fällen, Indikationen, Fehlbildungen und Art der Untersuchungen sind aus den Tabellen A-C im Anhang zu entnehmen.

3.2 Cytogenetische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

3.2.1.1 Langzeitkultur aus Amnionzellen und Abortgewebe

Zellen aus Fruchtwasser bzw. von Aborten wurden als Monolayer Kulturen in 50ml Gewebekulturflaschen (Fa. Falcon) in Chang Medium bei 37°C in einem 5% CO₂ Luftgemisch und bei annähernd 100% Luftfeuchtigkeit über 14 – 18 Tage kultiviert. Abortgewebe wurde vor Ansatz der Kultur zweimal in Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, anschließend mit einem Skalpell zerteilt und in eine Gewebekulturflasche überführt. Fruchtwasser wurde abzentrifugiert und die Zellen in Kulturflaschen überführt. Als Nährmedium wurden 5ml Chang Medium pro Ansatz verwendet. Routinemäßig wurde das Kulturmedium zweimal pro Woche durch frisches ersetzt, bis sich eine ausreichende Anzahl von Zellklonen gebildet hatte. Die Zellklone wurden dann durch Zugabe einer 0,05%igen Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst, vorsichtig zur Separation der Zellen suspendiert und auf zwei Flaschen verteilt (Split 1:1). In der Regel lagen nach 1-2 Tagen weiterer Kultur genügend teilungsbereite Zellen vor, deren Zellzyklus durch Zugabe des Mitosegiftes Colcemid (0,1µg/ml Medium) in der Metaphase unterbrochen wurde.

Colcemid (Desactethymethylcolchizin), ein Derivat des Colchizins, dem Gift der Herbstzeitlosen, hemmt in den sich teilenden Zellen die Ausbildung des Spindelapparates, so dass der Vorgang der Mitose blockiert wird. Die Chromosomen liegen in einer stark kontrahierten und spiralisierten Form vor, die bei der nachfolgenden Bänderung ihre Identifizierung ermöglicht.

Die adhärennten Zellen wurden anschließend durch Zugabe einer 0,05%igen Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Der gesamte Inhalt wurde nach Zugabe von einigen Millilitern Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10min bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment wurde in 5ml einer hypotonen Lösung (1% Na-Citrat-Lösung / 0.075M KCl-Lösung 1:1; v:v) resuspendiert und 20min bei 37°C inkubiert.

3.2.1.2 *Lymphocytenkultur*

Für die Kultivierung von Lymphocyten wurde venöses Blut verwendet, das durch Zusatz von Heparin an der Gerinnung gehindert wurde. Die Kultivierung der Lymphocyten erfolgte in 10ml McCoy's 5A-Medium, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum. Zur Pufferung im physiologischen Bereich wurden 0,2ml einer 7,5% Bicarbonatlösung und zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen des weiteren routinemäßig 0,1ml einer Antibiotika-Lösung (Penicillin/Streptomycin) dem Kulturmedium zugesetzt. Um eine ausreichende Anzahl von Metaphasen zu gewinnen, wurden die Lymphocyten mit PHA (Phytohämagglutinin) stimuliert, einem pflanzlichen Lektin, das aus *Phaseolus vulgaris* isoliert wird. Unter dieser Stimulation werden vorwiegend die T-Lymphocyten zum Wachstum angeregt. Die Kultivierung erfolgte für 3 Tage bei 37°C. Nach 72h wird der Zellzyklus durch Zugabe von 0,1µl Colcemid-Lösung (10µg/ml) in der Mitose unterbrochen und die Kultur für weitere 2h bei 37°C inkubiert.

Die Behandlung der Zellen mit einer hypotonen Lösung dient der verbesserten Spreizung und somit der Darstellbarkeit der Chromosomen. Durch die osmotische Flüssigkeitsaufnahme werden eine Zellschwellung und eine Dehnung der Zellwand erreicht.

3.2.2 Chromosomenpräparation

Im Anschluß an die hypotone Behandlung wurden die Zellsuspensionen abzentrifugiert (10min/800rpm) und durch Zugabe einer eisgekühlten Fixierlösung (Ethanol/Eisessig 1:3; v:v) fixiert und erneut für 10min bei 1000rpm abzentrifugiert. Dieser Fixiervorgang wurde dreimal wiederholt, wobei vor der letzten Zentrifugation die Zellen für 30min bei -20°C ruhten, um eine vollständige Fixierung zu gewährleisten. Die Zellsuspension wurde dann auf entfettete, kaltfeuchte Objektträger aufgetropft. Die Qualität der Präparate hinsichtlich der Zelldichte und Spreizung der Chromosomen wurde in einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Zeiss) überprüft. Die Objektträger wurden anschließend

24h bei 60°C inkubiert und konnten nach entsprechender Färbung für die cytogenetische Diagnostik verwendet werden.

3.2.3 Giemsa-Trypsin-Bänderung (GTG-Bänderung)

Zu Beginn wurden die Präparate für wenige Sekunden in einer gepufferten Bactotrypsinlösung bei 37°C inkubiert, anschließend kurz in Ethanol und in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Färbung erfolgte für 15min in einer 8%igen Giemsa-Lösung bei Raumtemperatur. Nach der Färbung wurde überschüssige Giemsa-Lösung unter Leitungswasser abgespült und die Objektträger luftgetrocknet (Tab. 9). Für die mikroskopische Auswertung wurden die Präparate mit Euparal, einem Kunstharz, eingedeckt. Die bei der Erstellung der Chromosomenpräparate anfallenden Ethanol/Eisessig fixierten Zellsuspensionen wurden bei -20°C gelagert und standen für weitere cytogenetische oder molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung.

Tabelle 9:
Ablauf der Giemsa-Trypsin-Bänderung (GTG)

Lösung	Zeit	Temperatur	Funktion
Trypsin-Versen-Lösung	4 – 6s	37 °C	Abbau von chromosomalen Proteinen
70 % Ethanol	10 – 20s	RT	Abstoppen der Trypsin-Reaktion
PBS-Puffer	ca. 30s	4 °C	Waschen
Giemsa-Lösung (8%)	5min	RT	Färbung
H ₂ O	ca. 10s	RT	Waschen
---	über Nacht	RT	Trocknen

Mittels hochauflösender Durchlicht-Mikroskope (Fa. Zeiss) wurden die gefärbten Präparate systematisch nach Metaphasen durchgemustert und ausgewählte Metaphasen bei einer 1000-fachen Vergrößerung analysiert. Um eine gesicherte Aussage über den Karyotyp machen zu können, wurden pro Gewebe mindestens 10 Giemsa-Trypsin (GTG) gebänderte Metaphasen gezählt und weitere 5 mit Hilfe eines Auswertcomputers karyotypisiert und dokumentiert. Die Formel für die schriftliche Niederlegung der Chromosomenbefunde richtet sich nach der internationalen Standardnomenklatur (ISCN 2005). Die Chromosomen-Präparationen, die Auswertung und Befundung wurden vom Labor für postnatale Cytogenetik des Institutes für klinische Genetik übernommen.

3.3 Molekularcytogenetische Methoden

3.3.1 Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FISH)

Die FISH mit kommerziell erhältlichen Sonden wurde zur Nachuntersuchung von strukturellen Chromosomenanalysen eingesetzt. Untersucht wurden Metaphasechromosomen aus kultiviertem Abortgewebe und Amnionzellen. Die zur FISH vorgesehenen Chromosomenpräparate wurden wie unter Punkt 3.3.2.3 (Tab. 19) beschrieben für die Hybridisierung vorbereitet.

3.3.1.1 Vorbereitung der Sonden und Hybridisierung

Die Vorbereitung der DNA-Sonden richtete sich nach der Art der Sonde sowie dem Hersteller (Tab. 10). Alle Sonden (10µl pro Ansatz) wurden durch Hitze denaturiert und anschließend auf die zuvor denaturierten Chromosomen aufgetragen, mit einem 22x22 mm² Deckglas luftblasenfrei eingedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank.

Tabelle 10:
Vorbereitung der Sonden für die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Sondenart	Firma	Ansatz	Vorbereiten	Auftrag
CEP centromer- spezifische DNA- Sonden	Oncor	8µl Mastermix 1µl Heringssperm-DNA 1µl DNA-Sonde	denaturieren für 5 min bei 70-80°C, anzentrifugieren, auf Eis bis zum Auftrag inkubieren	bei 37°C auf Wärmeplatte
Telomersonden	Oncor	10µl aufgetaute Sonde entnehmen, Ansatz anzentrifugieren	denaturieren für 10min bei 72°C, danach sofort auf Eis stellen	bei 37°C auf Wärmeplatte
LSI locusspezifische DNA-Sonden	Oncor	10µl aufgetaute Sonde entnehmen, Ansatz anzentrifugieren	vorwärmen bei 37°C für 5min, denaturieren für 10min bei 72°C, danach sofort auf Eis stellen	bei 37°C auf Wärmeplatte
WCP-, LSI-, CEP-, Subtelomer- Sonden	Vysis	7µl Puffer + 1µl A. dest + 1µl Sonde	denaturieren für 5min bei 73°C; auf Heizplatte bei 37°C bis zum Auftrag lagern	bei 37°C auf Wärmeplatte

3.3.1.2 Fluoreszenz-Detektion und Waschung von indirekt markierten Sonden

Die Biotin markierten Sonden mussten durch die Bindung von Fluorochrom markiertem Avidin (Avidin-FITC bzw. Texas-Red) nachgewiesen werden. Die Detektion der Digoxigenin markierten Sonden erfolgte über Fluorochrom gekoppelte monoklonale Antikörper. Die Waschung erfolgte wie unter 3.3.2.4. beschrieben. Zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindungen der Detektionsreagenzien wurden unspezifische Bindungsstellen mit Rinderserumalbumin (BSA, 3%) gesättigt; anschließend erfolgte die eigentliche Detektion durch Auftrag mit 50µl Antikörperlösung und Inkubation für 60min bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Ungebundene Antikörper wurden durch wiederholte Waschschritte mit 2xSSC-Puffer/Tween20 bei RT entfernt. Die Chromosomen wurden mittels 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI-Lösung) für 5min bei RT gegengefärbt und mit Antifade (Vectashield) eingedeckt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Eine Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte bietet Tabelle 11. Die hybridisierten Meta- und Interphasen wurden an einem Zeiss-Epifluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filterkombinationen analysiert und ausgewertet.

Tabelle 11:
Detektion und Waschung nach Hybridisierung indirekt markierter Sonden – Arbeitsschritte

Lösung	Zeit	Temperatur	Funktion
2 x SSC	2x5min	RT	Entfernung der Deckgläser
1 x SSC	5min	72 – 74°C	stringente Waschung zur Entfernung ungebundener Sonden-DNA
3% BSA-Lösung	5min	RT	Blockung unspezifischer Bindungsstellen
Avidin-FITC Avidin-Texas-Red	60min	37°C	Fluorochrom markierter Primärantikörper für Biotin markierte DNA-Sonden
Anti-Digoxigenin-FITC Anti-Digoxigenin-Rhodamin	60min	37°C	Fluorochrom markierter Primärantikörper für Digoxigenin markierte DNA-Sonden
2 x SSC / Tween	2x5min	37°C	Waschen
DAPI	5min	RT	Gegenfärbung der Chromosomen
A. dest.	ca. 1min	RT	Waschen
	15min	37°C	Lufttrocknen der Objektträger
Vectashield		RT	Eindecken mit 24x60mm Deckgläschen

In Fällen mit zu schwachem Fluoreszenzsignal, insbesondere nach Verwendung der All Human Telomeres-Sonde, konnte dies über einen Brückenantikörper verstärkt werden (Tab. 12).

Tabelle 12:
FISH: Signalverstärkung mit Sekundärantikörpern - Arbeitsschritte

Lösung	Zeit	Temperatur	Funktion / Bemerkungen
4xSSC/Tween/3% BSA	5min	RT	Blockung
Rabbit-Anti-Sheep (Kreuzreaktivität mit Antikörper der Ziege)	30min	37°C in feuchter Kammer	Brückenantikörper für Digoxigenin markierte Sonden
2xSSC/Tween	2x5min	37°C	Waschen
4xSSC/Tween/ 3% BSA	5min	RT	Blockung
Goat-Anti-Rabbit-FITC	30min	37°C	Fluorochrom markierter Antikörper für Digoxigenin markierte Sonden
2xSSC/Tween	2x5min	37°C	Waschen
DAPI	5min	RT	Gegenfärbung der Chromosomen
A. dest.	1min	RT	Abspülen der Objektträger
	15min	37°C	Lufttrocknen der Objektträger
Vectashield		RT	Eindecken mit 24x60mm Deckgläschen

3.3.1.3 Multicolor-FISH (M-FISH)

Die 24-Farben-FISH ermöglicht die simultane Darstellung der 22 Autosomen und der Geschlechtschromosomen des menschlichen Genoms in jeweils unterschiedlichen Farben. Diese 24 Farben-FISH-Paints erlauben die Untersuchung des gesamten Chromosomensatzes und sind insbesondere für Zellen mit komplexen Umbauten, die mit klassischen Bänderungsverfahren nicht vollständig aufgeschlüsselt werden können, geeignet.

Um 24 unterschiedliche Farben zu erhalten, wurden die über Flow-sorting oder Mikrodissektion hergestellten chromosomenspezifischen Painting-Sonden über ein Set von 5 verschiedenen Fluorochromen (Alexa 228→grün, Spektrum orange, Texas Red, Cy5→gelb und DEAC →blau) kombinatorisch markiert. Jedes Chromosom weist durch die einzigartige Fluorochromkombination ein hochcharakteristisches Emissionsspektrum auf, das eine genaue Zuordnung der Chromosomen ermöglicht. Für die Versuche wurde der M-FISH-Kit der Firma Metasystems verwendet.

Die Vorbehandlung der Objektträger und deren Denaturierung erfolgten wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben. 12µl des Probengemisches pro Spot wurden für 5min bei 75°C denaturiert, 30min bei 37°C inkubiert und anschließend auf die denaturierten Metaphasechromosomen aufgetragen und für 2-4 Tage hybridisiert.

Mit Ausnahme von Fluorochrom Cy5 waren alle Nukleotide direkt mit dem jeweiligen Fluorochrom gekoppelt. Cy5 wurde über Avidin-Cy5 mit Signalverstärkung visualisiert.

(Arbeitsschritte siehe Tab. 13). Die Chromosomen wurden mit DAPI gegengefärbt, luftgetrocknet und mit Vectashield eingedeckt. Die Präparate wurden am Computer über ein spezielles Programm (ISIS-MFISH der Firma Metasystems, Altlußheim) ausgewertet.

Tabelle 13:
M-FISH: Detektion der Biotin-markierten Sonden - Arbeitsschritte

Lösungen / Menge	Zeit	Temperatur	Funktion
Blockungsreagenz	15min	37°C	Blockung
4xSSC/Tween	1min	RT	Waschen
Mix aus 50µl, Blockungsreagenz und 1µl Detektion 1+3	30min	37°C	Detektion zur Signalverstärkung von Cy5
4xSSC/Tween	2x3min	RT	Waschen
Mix aus 50µl, Blockungsreagenz und 1µl Detektion 2	30min	37°C	Signalamplifikation
4xSSC/Tween	2x3min	RT	Waschen
Mix aus 50µl, Blockungsreagenz und 1µl Detektion 1+3	30min	37°C	Detektion
4xSSC/Tween	2x3min	RT	Waschen
DAPI	5min	RT	Gegenfärbung

3.3.2 Comparative Genomhybridisierung (CGH)

3.3.2.1 Markierung der genomischen DNA über Nicktranslation

Für eine CGH-Analyse wurde die genomische DNA mittels Nicktranslation markiert (Rigby et al. 1977). Hierzu wurde ein eigens für diese Anwendung optimierter vorgefertigter Reagentiensatz verwendet (Nicktranslation Kit, Fa. Vysis). In dem Reaktionsgemisch für die Nicktranslation befand sich zum einen die zu markierende Ausgangs-DNA und zum anderen das für die Reaktion notwendige Puffersystem, Wasser, Nukleotide und das Enzymgemisch. Die Fluorochrom markierten Nukleotide (Fa. NEN) wurden wie in Tabelle 14 beschrieben dem Reaktionsgemisch zugesetzt.

Bei der Nicktranslation führt man in einen DNA-Strang Brüche (*nicks*) mit Hilfe einer geeigneten Endonuclease wie die Desoxyribonuclease I, isoliert aus dem Pankreas der Kuh, ein. Auf diese Weise entstehen freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Dabei wird die DNA in Fragmente von 500-1500bp geschnitten. Die exponierte Bruchstelle dient dann als Ausgangspunkt für eine weitere Reaktion, bei der über die DNA-Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase I von E. coli am 3'-Hydroxylende des Bruchs neue Nukleotide eingeführt werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide im Reaktionsgemisch angeboten. Gleichzeitig baut die 5' → 3'-Exonuclease-

Aktivität desselben Enzyms auf der anderen Seite des Bruchs weitere Nukleotide ab. Auf diese Weise wird die Bruchstelle langsam in 5' → 3'-Richtung auf der DNA entlang verschoben („transloziert“). Für eine effektive Markierung der DNA ist ein ausgewogenes Verhältnis der Reaktion von DNase und Polymerase notwendig. Wird die Reaktion bei einer relativ niedrigen Temperatur von etwa 15°C durchgeführt, so schreitet die Reaktion nur soweit fort, bis die alte Nukleotidsequenz vollkommen erneuert ist. Obwohl also bei diesen Temperaturen keine Nettosynthese erfolgt, kann man so über die beschriebene Reaktion die unmarkierten Nukleotide durch markierte ersetzen.

In der Tabelle 14 ist die Zusammensetzung der Nukleotid-Mixe der jeweiligen Markierungsart dargestellt. Pro zu markierende DNA wurden 10µl des dNTP-Mix in die Reaktion eingesetzt.

Tabelle 14:
Nicktranslation zur Markierung gesamtgenomischer DNA (Nicktranslation Kit Fa. Vysis; markierte Nukleotide Fa. NEN)

	FITC- dNTP- Mix für Test- DNA	TEXAS RED- dNTP- Mix für Referenz- DNA
dATP	2,7µl	2,7µl
FITC-dATP	0,4µl	-
TEXAS RED-dATP	-	0,4µl
dCTP	2,7µl	2,7µl
FITC-dCTP	0,4µl	-
TEXAS RED-dCTP	-	0,4µl
dTTP	4µl	4µl
dGTP	4µl	4µl
Gesamt	14,2µ	14,2µl
Einsatz in die Reaktion	10,0µl	10,0µl

1µg der jeweiligen DNA in einer Lösung wurden unter Zugabe der mitgelieferten Mischung aus DNase und DNA-Polymerase I für 2 h bei 15°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10min gestoppt.

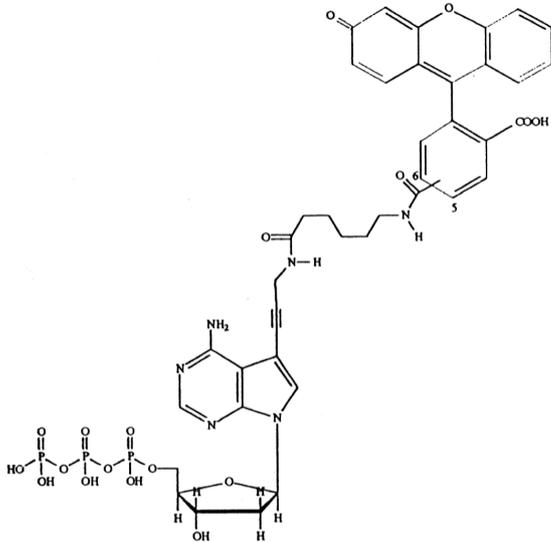
Die Abbildung 7 zeigt die Moleküle der einzelnen Fluorochrom markierten Nukleotide und ihre chemische Formel.

Abbildung 7:

Molekülstruktur der Fluorochrom markierten Nukleotide (aus Technisches Datenblatt, Fa. NEN™)

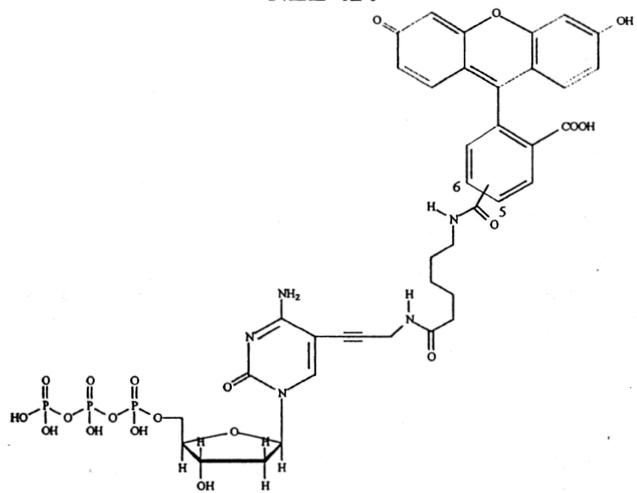
a) FITC-dATP: $C_{41}H_{41}N_6O_{19}P_3$

**Fluorescein-12-dATP
NEL-465**



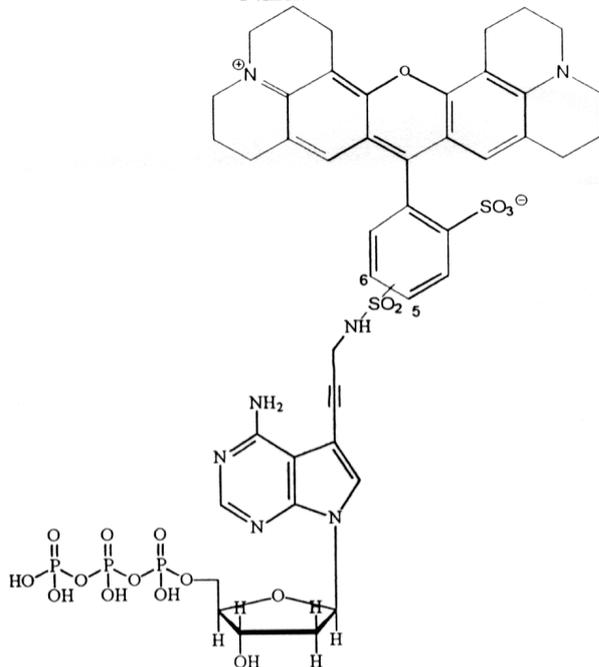
b) FITC-dCTP: $C_{39}H_{40}N_5O_{20}P_3$

**Fluorescein-12-dCTP
NEL-424**



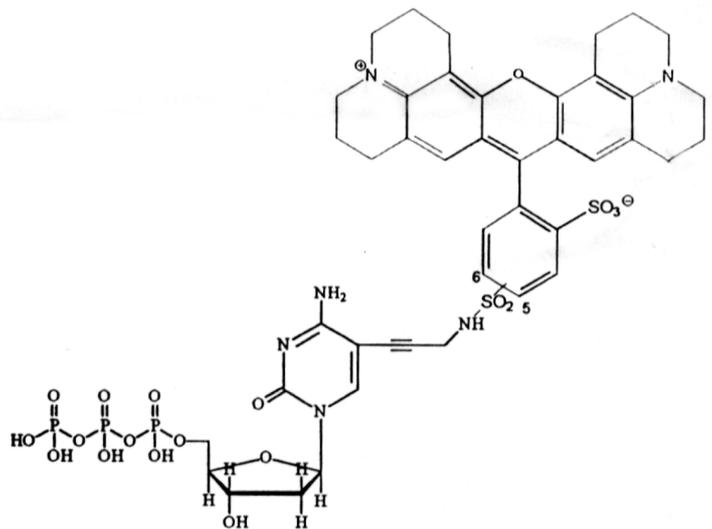
c) TR-dATP: $C_{46}H_{51}N_7O_{18}P_3S_2$

**Texas Red®-5-dATP
NEL-471**



d) TR-dCTP: $C_{44}H_{50}N_6O_{19}P_3S_2$

**Texas Red®-5-dCTP
NEL-426**



3.3.2.2 Markierung der genomischen DNA über DOP-PCR

Die DOP-PCR dient der universellen Amplifikation gesamtgenomischer DNA (siehe auch Kap. 3.4.6.3). Diese Art der Vor-Amplifikation ist Grundlage für die weiterführende Markierungsreaktion mit Fluoreszenzmarkern und nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten.

Der hierfür verwendete DOP PCR Master (Fa. ROCHE) enthält die Reagenzien für die Durchführung einer PCR in Form eines vorgemischten, doppelt-konzentrierten Mastermixes (siehe Kap. 2.2.4) und den degenerierten Oligonukleotid-Primern mit der Sequenz

5'-OH CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G OH- 3'

Für eine vergleichende Genomhybridisierung waren 2 PCR-Reaktionen, zum einen die universelle Amplifikation und zum anderen die Markierungsreaktion der zu testenden DNA, notwendig. Für die erste Amplifizierungsreaktion gesamtgenomischer DNA wurden je nach Konzentration und Degradationsgrad der Ausgangs-DNA zwischen 1 und 10µl (50-100ng/µl) als Template eingesetzt (Tab. 15). Die Reaktionsbedingungen sind für die Verwendung mit genomischer DNA optimiert worden. Der PCR-Ansatz wurde auf Eis pipettiert, gut durchmischt und nach den Bedingungen in Tabelle 16 amplifiziert.

DOP PCR Mastermix	25µl
A. dest.	21,5µl
Primer (4µmol/l)	2,5µl
Template-DNA	1,0µl

Tabelle 15:
DOP-PCR: Reaktionsansatz für 1. PCR mit degenerierten Primern (Protokoll von ROCHE)

Tabelle 16:
Thermostyklus-Bedingungen für 1. DOP PCR unter wenig stringenten Bedingungen (nach Protokoll von ROCHE)

	Denaturierung		Annealing		Elongation		Anzahl (n)
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	
Zyklus 1	95°C	5min					1
Zyklus 2	94°C	1min	30°C	1,5min	72°C	3min	5
Zyklus 3	94°C	1min	62°C	1min	72°C	2min	35
Zyklus 4					72°C	7min	1

Ein Aliquot des PCR generierten DNA-Pools wurde einer erneuten PCR unterworfen und mittels Fluoreszenz markierter Nukleotide (FdUTP-Spectrum Green, Fa. Vysis) markiert. Das Reaktionsgemisch entsprach Tabelle 17, die Zyklusbedingungen sind Tabelle 18 zu entnehmen.

DOP PCR Mastermix	25µl
A. dest.	20,5µl
DOP-Primer (4µmol/l)	2,5µl
FdUTP 1mM	1,0µl
Template-DNA	1,0µl

Tabelle 17:
DOP-PCR: Reaktionsansatz für
Markierungs-PCR (2. PCR) mit
Fluorescein markiertem Nukleotid
(nach Protokoll von ROCHE)

Tabelle 18:
Zyklus-Bedingungen für die Markierungs-PCR nach dem Protokoll von ROCHE

	Denaturierung		Annealing		Elongation		Anzahl (n)
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	
Zyklus 1	95°C	5min					1
Zyklus 2	94°C	30sec	62°C	30sec	72°C	1,5min	35
Zyklus 4					72°C	7min	1

Das Ergebnis der DOP-PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Kap. 3.4.7.1). Im Idealfall war ein homogener „DNA-Schmier“ im Bereich von 300-800bp zu sehen (vgl. auch Abb. 14 Kap. 4.2.1).

3.3.2.3 Herstellung der Hybridisierungsmischung und Hybridisierung

Ca. 400ng über Nicktranslation bzw. DOP-PCR markierte Test- und Referenz-DNA wurden in gleichen Verhältnissen gemischt, mit 15µg COT 1-DNA (Fa. Invitrogen) versetzt und nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetatlösung mit eisgekühltem 100% Ethanol präzipitiert.

Nach Auswaschen des Natriumacetats mit eisgekühltem 70%igem Ethanol wurde das Pellet in 10µl 100% deionisierten Formamid bei 37°C über Nacht auf einem Schüttelblock gelöst und anschließend in 10µl Mastermix (4xSSC + 20% Dextransulfat) aufgenommen. Diese Hybridisierungsmischung wurde dann bei 75°C im Wasserbad für 10min denaturiert und zur Reduktion der Hybridisierung unspezifischer, repetitiver DNA-Sequenzen bei 37°C für 30min im Wasserbad inkubiert (Präannealing).

Diese DNA-Mischung wurde dann auf Objektträger aufgetragen, auf denen sich denaturierte Metaphasechromosomen PHA-stimulierter Lymphocyten eines gesunden männlichen Spenders befanden. Die Denaturierung der Chromosomen erfolgte nach dem Protokoll von Fritz und Mitarbeitern (Fritz et al. 1998). Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Alle Inkubationen fanden in Küvetten statt.

Tabelle 19:
Denaturierung der Chromosomenpräparate - Arbeitsschritte

Lösung	Zeit	Temperatur	Funktion
Alkoholreihe (100%, 70%, 50%, 30%)	je 2min	RT	Rehydrierung
0,1xSSC	2min	RT	Rehydrierung
2xSSC	2min	RT	Rehydrierung
2xSSC	30min	70 – 80°C	Verbesserung der Chromosomenstruktur
0,1xSSC	1min	RT	Äquilibrieren
0,07N NaOH	1min	RT	Denaturierung
0,1xSSC	1min	4 °C	Stoppen und Waschen
2xSSC	1 min	4 °C	Waschen
Alkoholreihe (30%, 50%, 70%,100%)	2min	RT	Dehydrierung
	10min	RT	Lufttrocknen

Nach dem Abdecken mit einem Deckglas und luftdichter Versiegelung der Chromosomenpräparate mittels Gummilösung (Fixogum, Marabu) wurden die Objektträger bei 37°C für 3-5 Tage in einer feuchten Kammer inkubiert.

3.3.2.4 Waschung der hybridisierten Objektträger

Nach Entfernen der Deckgläser in 2xSSC wurde die überschüssige Sonden-DNA durch stringente Waschungen (1xSSC-Puffer bei 75°C für 5min) entfernt. Die Chromosomen wurden anschließend mit DAPI (700ng/ml 4'-6'-Diamino-2-Phenylindol) für 5min bei Raumtemperatur gegengefärbt. Abschließend wurden die Objektträger nach Trocknung mit Eindeckmedium (Vectashield®, Fa. Vector-Laboratories) eingedeckt (siehe Tab. 20).

Tabelle 20:
Waschung der hybridisierten Objektträger - Arbeitsschritte

Lösung	Zeit	Temperatur	Funktion / Bemerkungen
2 x SSC	2 x 5min	RT	Entfernung der Deckgläser
1 x SSC	5min	72 – 74°C	stringente Waschung zur Entfernung ungebundener Sonden-DNA
DAPI	5min	RT	Gegenfärbung der Chromosomen
A. dest.	ca. 1min	RT	Waschen
	15min	37°C	Trocknen der Objektträger
Vectashield		RT	Eindecken mit 24x60mm Deckgläschen

3.3.2.5 Auswertung der CGH mit digitaler Bildanalyse

Die Auswertung erfolgte an einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) mit Hilfe eines computergestützten digitalen Bildanalysesystems (ISIS, Fa. MetaSystems). Das Mikroskop war mit einem 100W Quecksilberdampfbrenner und der Filterkombination Nr. 1 nach Prof. Dan Pinkel (AHF Analysetechnik, Tübingen, Germany) ausgestattet. Bei dieser Filterkombination waren die Anregungsfilter von Strahlenteiler und Sperrfilter unabhängig wählbar. Dadurch konnten die für die jeweiligen Fluorochrome benötigten Anregungswellenlängen gewechselt werden, während Strahlenteiler und Sperrfilter in Position blieben. Auf diese Weise kam es nicht zu dem Bildversatz, wie er bei dem Wechsel von kompletten Filtersets zu beobachten war. Die Filterkombination erlaubte die selektive Darstellung von DAPI-, FITC- und Texas Red-Fluoreszenzen sowie mittels eines Doppelbandfilters die zweifarbige Darstellung von FITC und Texas Red und mittels eines Triplebandpassfilters die dreifarbige Ansicht von DAPI, FITC und Texas Red.

Die mittels DAPI in Q-Bandendarstellung gefärbten Metaphasechromosomen, sowie die Fluoreszenzen der mit Texas Red und FITC markierten Referenz- bzw. Test-DNA, wurden mit einer mit einem hochempfindlichen Photochip ausgestatteten elektronischen Kamera (charged-coupled device-, CCD-Kamera, Fa. IMAC) als Grauwerte separat aufgenommen. Von jeder Metaphase wurden 3 monochrome Bilder aufgenommen, ein Bild pro Fluoreszenzkanal. Jedes Bild hat einen spezifischen Informationsgehalt. Das DAPI-Bild dient der Chromosomenidentifizierung, das FITC-Bild repräsentiert die Test-DNA und das TRITC-Bild stellt die Referenz-DNA dar (Roth et al. 1996). Anhand der DAPI-gefärbten Metaphasechromosomen wurden die Chromosomengrenzen manuell festgelegt. Die Chromosomen einer Metaphase wurden anschließend in einem Karyogramm geordnet. Die Fluoreszenzintensitäten (FI) der Fluorochrome FITC und Texas Red wurden getrennt in kurzen (p-) und langen (q-) Arm über die Länge der einzelnen Chromosomen ermittelt. Die Fluoreszenzen Grün zu Rot wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergab sich über die Länge des jeweiligen Chromosoms ein Profil der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten (VFI). Anschließend wurde für jede Metaphase ein Histogramm der Werte der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten erstellt.

Auf der Basis dieses Histogramms erfolgte für jeden Chromosomentyp einer Metaphase eine Normalisierung der Profile der VFI (NVFI). Anschließend wurde für jeden Chromosomentyp der Mittelwert der NVFI aus mehreren Metaphasen einschließlich der Standardabweichungen ermittelt und als Profil über die Länge des jeweiligen

Chromosoms dargestellt (vgl. Abb. 4 in Kap. 1.5.2.1). Zur Ermittlung von Über- und Unterrepräsentationen wurde der Schwellenwert auf die dreifache Standardabweichung festgesetzt. Dies entspricht einem Konfidenzintervall von etwa 99%. In einigen Fällen war es notwendig, mit definierten theoretischen Grenzwerten für eine Über- bzw. Unterrepräsentation auszuwerten. Unter der Annahme von einem 50%igen Normalanteil in der Testprobe wurde die Fluoreszenzratio von 0,75 als Monosomie und 1,25 als Trisomie definiert. Dementsprechend stellen sich Tetrasomien durch eine Ratio von 1,5 bzw. Pentasomien durch eine Ratio von 1,75 dar. Dies entspricht einem Konfidenzintervall von etwa 95%.

Mindestens 10, in der Regel jedoch 20 Chromosomen eines Typs wurden für die CGH analysiert. Die Ergebnisse wurden für jedes Chromosom in Bezug auf das jeweilige Chromosomen-Ideogramm grafisch dargestellt. Die Regionen der chromosomalen Imbalancen in der Test-DNA wurden mittels Balken verdeutlicht. Dabei wurde gemäß internationaler Übereinkunft Rot für Unter- und Grün für Überrepräsentation gewählt. Alle Berechnungen und grafischen Aufbereitungen der Ergebnisse erfolgten computergestützt mit einem Software-Paket für Farbkaryotypisierung (ISIS-CGH, Fa. MetaSystems).

Aberrante Befunde wurden nach dem internationalen System für die Nomenklatur cytogenetischer Befunde beschrieben (ISCN 2005).

3.3.3 Mikrodissektion

Die für die chromosomale Mikrodissektion notwendigen Arbeitsmittel wie Petrischale, Nadelhalter und Nadeln wurden vor Gebrauch unter UV-Licht sterilisiert. Soweit möglich erfolgten alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank. Alle Lösungen wurden autoklaviert bzw. steril filtriert, um Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Chromosomenpräparaten wurde die Chromosomensuspension auf Deckgläschen aufgetropft. Die Deckgläschen wurden zuvor 24h zur Entfettung in 25%iger HCl aufbewahrt, mit A. dest. abgespült, in 100%igem Ethanol für 10min überführt, erneut mehrmals mit A. dest. gespült und bis zum Auftropfen der Chromosomensuspension bei 4°C gelagert. Je nach Menge der asservierten Chromosomensuspension wurden pro Fall 2-4 Deckgläser präpariert. Die Qualität der Metaphasechromosomen bezüglich der Größe, Spreitung der Chromosomen sowie Anzahl der Metaphaseplatten wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop geprüft. Die GTG-Bänderung der Chromosomenpräparate erfolgte wie unter Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Die Dissektion wurde mit einem Inverse-Mikroskops (Axiovert S100) durchgeführt. Die umgekehrte Anordnung der Objektive und des Kondensors ermöglichten den größtmöglichen Arbeitsabstand, so dass die geschnittenen Fragmente von oben aufgenommen werden konnten. Die Hydraulikvorrichtung für die Steuerung der Nadel war rechtsseitig oberhalb des Drehtisches angebracht und mit einem Joystick verbunden, der die Nadelbewegung in allen drei Ebenen zuließ. Das Schneiden wurde bei 1000facher Vergrößerung mittels einer Vorwärtsbewegung der Nadel vollzogen. Die Fragmentaufnahme geschah über eine Rückwärts-Hochbewegung der Nadel, so dass das dissezierte Fragment an der Nadelspitze hängen blieb. Nun wurde die Nadel aus dem Nadelhalter ausgespannt und das Fragment in das Eppendorf- Tube, in dem sich 20µl Sammelpuffer befanden, überführt. Diese Prozedur wurde je nach Qualität und Quantität der vorhandenen Metaphasen mehrmals wiederholt.

Die im Sammelpuffer gesammelte chromosomale DNA wurde einer universellen Amplifikation unterzogen (vgl. Kap. 3.4.6.3) und über eine 2. PCR-Reaktion mit Biotin-11dUTP markiert, welches mit dTTP um den Einbau in die DNA konkurriert. Um den Einbau von Biotin-markierten Nukleotiden zu erleichtern, wird dies im Überschuss zugegeben. Mit diesem Einbau wird eine spezifische Detektion der amplifizierten DNA bei der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (vgl. Kap. 3.3.1.2) ermöglicht.

In der Regel wurden 6µl des über DOP-PCR generierten DNA-Pools in eine Markierungs-PCR zur weiteren Amplifizierung und Markierung eingesetzt (Tab. 21). Die Zyklusbedingungen sind Tabelle 22 zu entnehmen. Sämtliche Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert, um einen vorzeitigen Start der PCR zu vermeiden. Der Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte und ihre Quantifizierung erfolgten über eine Agarosegelelektrophorese.

Replitherm-Puffer	0,75 µl
dATP, dGTP, dCTP (200µmol/l)	je 3µl
dTTP (100µmol/l)	0,15µl
Primer DopMueNa* (2µmol/l)	0,3
Bio-11dUTP (100µmol/l)	1,5µl
Taq-Polymerase	0,5µl
DNA	6µl
H ₂ O	7,9µl
MgCl ₂ (2,5µmol)	1,5µl

Tabelle 21:
Reaktionsansatz für
Markierungs-PCR
(*DOP-Primer nach
Müller- Navia et al.
1995)

Tabelle 22:
DOP-PCR: Zyklusbedingungen für Markierungs-PCR

	Denaturierung		Annealing		Elongation		Anzahl (n)
	(Temp.)	(Zeit)	(Temp.)	(Zeit)	(Temp.)	(Zeit)	
Zyklus 1	94°C	1min	56°C	1min	72°C	2min	20

Die amplifizierte DNA wurde durch Zugabe von 1µl einer Trägerreagenz (Lineares Polyacrylamid, GenElute LPA, Sigma) gefällt (siehe auch Kap. 3.3.2.3), in Mastermix aufgenommen und als DNA-Sonde für eine Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung eingesetzt.

Die Vorgehensweise entspricht der wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die Biotinmarkierte Sonden-DNA wurde mittels an einem Antikörper gebundenen grünen Fluoreszenzfarbstoff FITC detektiert (vgl. Kap. 3.3.1.2) Die Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop erlaubte eine entsprechende Zuordnung der chromosomalen Aberration und ermöglichte die Bestimmung unbekannter Strukturaberrationen oder die Herkunft von Markerchromosomen.

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe

Die Gewinnung möglichst hochmolekularer DNA aus Formalin fixierten, paraffiniertem Gewebe bildet den Grundstein und somit den kritischsten Parameter für alle sich anschließenden molekularcytogenetischen Untersuchungen.

Zunächst wurden histologische Gewebeschnitte unterschiedlicher Gewebe eines Obduktionsfalles in der Standard-HE-Färbung unter einem Lichtmikroskop auf ihre Zelldichte sowie den Autolysegrad hin überprüft, um das am besten geeignete Gewebe für die folgende DNA-Extraktion auszuwählen.

Von diesen wurden 5-10 Gewebeschnitte mit einer Schnittdicke von je 5µm mittels eines Schlittenmikrotoms von einem Paraffingewebeblock abgehobelt und in ein steriles Eppendorfcup (1,5ml) überführt. Bei diesem Arbeitsschritt musste sehr sorgfältig und sauber gearbeitet werden (Schutzkittel, Handschuhe), um eine Kontamination der DNA zu vermeiden. Für jeden neuen Fall wurde die Mikrotomklinge erneuert und der Arbeitsplatz mit Alkohol gereinigt.

Die DNA wurde nach 3 unterschiedlichen Methoden extrahiert, um die Effizienz hinsichtlich DNA-Menge- und Qualität zu vergleichen.

3.4.1.1 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe nach Proteinausfällung

Die Paraffingewebeschnitte wurden unter Zugabe von 1ml Xylol zur Entparaffinierung für 30min bei Raumtemperatur stehengelassen und alle 5min für ca. 30s gevortext.

Nach Zentrifugation (5min/13000rpm/RT) wurde das Xylol vom Gewebe abpipettiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zum Auswaschen des Xylols wurde das Gewebepellet in 1ml 100% unvergällten Ethanol für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen und abzentrifugiert (5min/13000rpm/RT). Der Alkohol wurde entfernt und dieser Waschschrift wiederholt. Im Anschluss daran wurde das Pellet in 200µl „Nuclei Lysis Solution“ (Fa. Promega) aufgenommen. Die noch vorhandenen Proteine wurden durch Zugabe von 50µl Proteinase K (10mg/ml) und 50µl RNase (20mg/ml) in einer anschließenden 12-stündigen Inkubation auf einem Wärmeschüttelblock bei 65°C verdaut. Die Proteine wurden durch Zugabe von 70µl „Protein Precipitation Solution“ (Fa. Promega), 20sec vortexen und 5min bei 4°C präzipitiert. Nach Zentrifugation (5min/13000rpm/RT) wurde die im Überstand befindliche DNA gefällt. Hierfür wurden 10µl Natriumacetat (3M; pH 7,0), 1ml 100% reinstes Ethanol, und 1µl LPA (Lineares Polyacrylamid, Konzentration 5 mg/ml, Fa. Sigma) dazugegeben und anschließend bei -80°C für 30-60min inkubiert. LPA, ein so genanntes Transportpolymer, wurde zur besseren Fällung von kleinen DNA-Mengen hinzugefügt. Nach Zentrifugation (30min/13000rpm/4°C) wurde das DNA-Pellet 2x mit 70% vergälltem Ethanol gewaschen und getrocknet. Abschließend wurde die gewonnene DNA in 50µl hochgereinigtem Wasser gelöst. Eine Zusammenstellung der einzelnen Arbeitsschritte bietet Tabelle 23.

Tabelle 23:
DNA-Isolierung aus Formalin fixiertem und paraffiniertem Gewebe nach Proteinausfällung

Schritt / Funktion	Lösungen / Menge	Zeit	Temperatur	Anzahl der Schritte / Bemerkungen
Entparaffinierung	Xylol 1000µl	30min	RT	2x
Waschung	100% Ethanol 1000µl	5min	RT	2x
Proteinverdau	Nuclei Lysis Solution 200µl Proteinase K 50µl RNase 50µl	ü.N.	65°C	1x; Schüttelblock
Proteinpräzipitation	Protein Precipitation Solution 70µl	5min	4°C	1x; auf Eis
Zentrifugation zur Proteinfällung		5min	RT	DNA im Überstand
DNA-Fällung	Natriumacetat 1/10 Vol. 100% Ethanol 2,5 Vol. LPA 1µl	1h	-80°C	1x
Zentrifugation zur DNA-Fällung		30min	4°C	1x; Kühlzentrifuge
DNA waschen	70% Ethanol	2min	RT	
DNA lösen	A. dest. 50µl	ü.N.	4°C	

3.4.1.2 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe mittels All-tissue DNA-Kit (Fa. GEN-IAL)

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde zunächst mit 100%igem Ethanol entparaffiniert und dann in 2 Volumen Lyse 1-Lösung, 1/10 Volumen Lyse 2-Lösung und 2/100 Volumen Proteinase K (10mg/ml) bei 65°C lysiert. Das Lysat wurde mit 75% (v/v) Lyse 3-Lösung versetzt, gemischt und zur Unterstützung der Proteinpräzipitation kurz bei -20°C gekühlt. Bei der anschließenden Zentrifugation wurden Zellreste, Proteine, Kohlenhydrate u.ä. pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin befindliche DNA mit 0,8 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Nach der Zentrifugation (10min/13000rpm) wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol von Salzen gereinigt. Das Ethanol wurde vollständig entfernt, die DNA getrocknet und in sterilem A. dest. gelöst (Tab. 24).

Zur Entfernung von RNA konnte im Anschluss ein RNase A-Verdau durchgeführt werden. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/100Volumen RNase A für 30min bei 37°C inkubiert und die enzymatische Reaktion durch Temperaturerhöhung (65°C/5min) gestoppt. Danach wurde die DNA erneut gefällt.

Tabelle 24:
DNA-Isolierung aus Formalin fixiertem und paraffiniertem Gewebe mittels All-tissue DNA-Kit (Fa. GEN-IAL)

Schritt / Funktion	Lösungen / Menge	Zeit	Temperatur	Anzahl der Schritte / Bemerkungen
Entparaffinierung	100% Ethanol 1000µl	10min	65°C	1x
Waschung	100% Ethanol 1000µl	5min	RT	2x
Proteinverdau	Lyse 1 500µl Lyse 2 50µl Proteinase K 20µl RNase 50µl	ü.N.	37°C	1x
Proteinpräzipitation	Lyse 3 375µl	20s 5min	RT -20°C	Vortexen Verbesserung der Proteinpräzipitation
Zentrifugation zur Proteinfällung		20min	RT	13000rpm; DNA im Überstand
DNA-Fällung	Isopropanol 0,8 Vol.	15min	RT	13000rpm; Pelletierung der DNA
DNA waschen	70% Ethanol 300µl	2min	4°C	
DNA lösen	A. dest. 50µl	ü.N.	4°C	

3.4.1.3 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe mittels Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Fa. Invitex)

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst mit Ethanol (100%) entparaffiniert und mittels Lysis-Puffer G lysiert und dem Enzym Proteinase K (10mg/ml) verdaut (3h bei 52°C). Anschließend wurden 200µl Binding-Puffer-T zugegeben und alles gevortext. Das Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert und zentrifugiert, um die DNA an die Matrix zu binden. Proteine und RNA wurden durch die nachfolgenden Waschschrirte mit dem Waschpuffer von der Säule gelöst. Die so gereinigte DNA wurde nun mit einem Puffer höherer Ionenstärke von der Säule eluiert (Überblick über die durchgeführten Schritte in Abb. 8 und Tab. 25).

Abbildung 8:
Darstellung der Arbeitsschritte der DNA-Extraktion aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe mittels Invisorb Spin Tissue Mini Kit (nach Fa. Invitex)

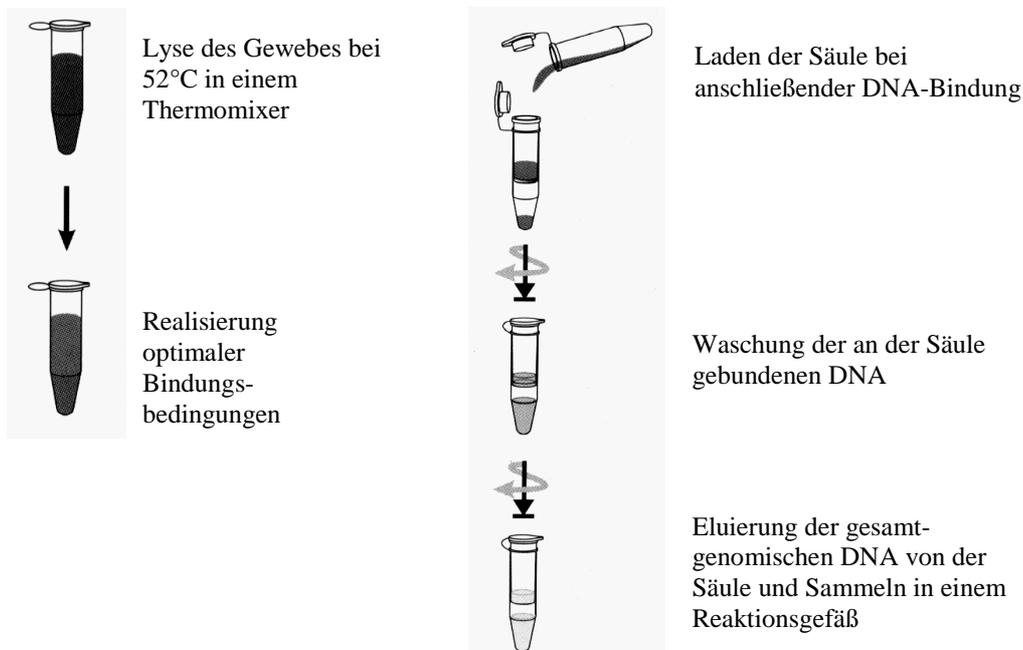


Tabelle 25:
DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und paraffiniertem Gewebe mittels Invisorb Spin Tissue Mini Kit

Schritt / Funktion	Lösungen / Menge	Zeit	Temperatur	Anzahl der Schritte / Bemerkungen
Entparaffinierung	Xylol 1000µl	30min	RT	2x
Waschung	100% Ethanol 1000µl	5min	RT	2x
Proteinverdau	Lyse-Puffer G 400µl; Proteinase K 40µl	3h	52°C	1x; DNA im Überstand
RNase-Verdau	RNase A (20mg/ml) 20µl	5min	RT	
DNA-Bindung	Binde-Puffer T 200µl	10s	RT	Vortexen; Gemisch auf Säule übertragen
Waschung	Waschpuffer 400µl; 300µl; 200µl	1min	RT	3x
Eluierung der DNA	Eluierungspuffer D 50µl	3min	52°C	Zentrifugation; Sammeln der eluierten DNA

3.4.2 DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe

Der Zellaufschluss des nativen Gewebes erfolgte durch Zerkleinern mit dem Mörser unter flüssigem Stickstoff, bis eine pulverartige Konsistenz erreicht wurde. Das zerkleinerte Gewebe wurde in PBS-Puffer aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren (5min/3000rpm/RT) wurde der Überstand dekantiert und das Gewebepellet in einem Gemisch aus 5ml SE-Puffer (zur Lyse der Zellkerne), 10 μ l des eiweißspaltenden Enzyms Proteinase K (10mg/ml) und 500 μ l SDS resuspendiert. Dieser Schritt diente dem Verdau der Zellmembranen und der Freisetzung der DNA aus dem Zellkern. Die Proteolyse erfolgte bei 37°C im Schüttelbad über Nacht. Hierbei wurden auch die Nukleasen irreversibel inaktiviert. Dies ist von essentieller Bedeutung, damit die aus dem Zellkern stammenden DNAsen nicht die freigesetzte DNA verdauen.

Nach Inkubation über Nacht wurden die Proben mit weiteren 5ml SE-Puffer versetzt und für 10min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurden 2ml einer 5M NaCl-Lösung zugegeben und sofort die Lösungen durch Vortexen für 15sec vermischt. Die proteinogenen Zelltrümmer wurden durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen ausgefällt und von der DNA durch Abzentrifugation getrennt (15min/3000rpm/RT). Der Überstand mit der darin enthaltenen DNA wurde in ein neues Zentrifugerröhrchen überführt. Die DNA wurde mit 30ml auf -20°C gekühltem 96% Ethanol gefällt. Durch vorsichtiges Schwenken des Zentrifugerröhrchens bildete sich im optimalen Fall eine genügend große Menge zusammenhängender DNA-Fäden, die mit Hilfe einer über einer Bunsenbrennerflamme gebogenen Pipettenspitze "geangelt" und in ein Eppendorfcup überführt wurde. Dort erfolgte ein zweimaliges Auswaschen mit 70%igem Ethanol.

Anhand der ausgefallten DNA-Menge wurde die zuzugebende Menge an A. dest. (zwischen 300-600 μ l) abgeschätzt. Das vollständige Lösen der DNA erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4°C (Tab. 26).

Tabelle 26:

DNA-Isolierung aus nativ eingefrorenem Gewebe über Aussalzmethode (laborinternes Protokoll)

Schritt / Funktion	Lösungen / Menge	Zeit	Temperatur	Anzahl der Schritte / Bemerkungen
Gewebezerkleinerung	flüssiger Stickstoff	1min	-198°C	
Waschung	1xPBS 50µl	2min	RT	1x
Zentrifugation		10min	RT	1x; Überstand dekantieren
Proteinverdau	SE-Puffer 5ml 10% SDS 500µl Proteinase K 50µl	ü.N.	37°C	Schüttelwasserbad
Proteinpräzipitation	SE-Puffer 5ml	10min	55°C	
	5M NaCl 2,5ml	15sec	RT	1x; vortexen
Zentrifugation zur Proteinfällung		15min	RT	DNA im Überstand
DNA-Fällung	100% Ethanol 30ml	5 min	4°C	
DNA waschen	70% Ethanol 200µl	2min	RT	
DNA lösen	A. dest. 300-600µl	ü.N.	4°C	

3.4.3 DNA-Isolierung aus Blut

Genomische DNA lässt sich aus den kernhaltigen Leukocyten menschlichen Blutes extrahieren. Zur DNA-Präparation aus venösem Vollblut wurde der QIAamp DNA Blood Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet.

In ein 50ml Zentrifugationsröhrchen wurden 500µl Protease pipettiert und 10ml Vollblut dazugegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 12ml AL-Puffer zur selektiven Lyse der Erythrocyten. Durch gutes Mischen wird eine homogene Lösung erzielt. Das Gemisch wurde anschließend für 10min bei 70°C zum Proteinverdau inkubiert. Durch Zugabe von 10ml 100%igem Ethanol und vortexen der Lösung wurde die Effektivität der späteren Bindung der DNA an die Säulenmatrix verbessert. Je eine Hälfte des Gesamtgemisches wurde nun nacheinander in ein „Maxi Spin Column“ – Röhrchen überführt und zentrifugiert (3min/3000rpm). Dabei bindet die DNA als negativ geladenes Molekül an der als Anionenaustauscher funktionierenden Säulenmatrix. Die weniger negativ geladenen Proteine und RNA dagegen wurden durch die nachfolgenden Waschschrte mit den Puffern AW1 und AW2 von der Säule gelöst. Die so gereinigte DNA wurde nun mit einem Puffer (AE) höherer Ionenstärke von der Säule eluiert. Die Tabelle 27 gibt einen Überblick über die durchgeführten Schritte.

Tabelle 27:**DNA-Gewinnung aus Vollblut mit QIAamp Blood Maxi Kit (Fa. Qiagen)**

Schritt / Funktion	Lösungen / Menge	Zeit	Temperatur / Drehzahl
Zellyse	Protease 500µl AL-Puffer 12 ml	3x5sec	RT
Proteinverdau		10min	70°C
Erhöhung der DNA-Bindungseffizienz	100% Ethanol 10ml		RT
Bindung der DNA an Anionenaustauscher durch Zentrifugation		3min	RT; 3000rpm
Waschung + Proteineluierung durch Zentrifugation	AW1-Puffer 5ml AW2 – Puffer 5ml	1min 15min	RT; 5000rpm RT; 5000rpm
DNA-Eluierung	AE-Puffer 1ml	5min	RT; 5000rpm

3.4.4 DNA-Isolierung aus fixierter Chromosomensuspension

DNA aus asservierten Chromosomensuspensionen wurde mit der Methode nach Li et al. (1995) gewonnen. Hierzu wurde das Zellpellet mit Carnoy's Fixativ im Verhältnis 1:1 bis 1:5 verdünnt. Circa 100µl der verdünnten Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend abzentrifugiert (5min/13000rpm/4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 200µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5min/13000rpm/RT). Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet luftgetrocknet, in 20µl hochgereinigtem A. dest. aufgenommen und für 30min bei Raumtemperatur gelöst. 2-3µl dieser Lösung wurden dann direkt als Template-DNA für PCR-Reaktionen eingesetzt.

3.4.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde photometrisch bei dem Absorptionsmaximum der DNA von 260nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und einer Schichtdicke einer Küvette von 1cm entspricht eine Absorption (OD) von 1,0 einer DNA-Doppelstrangkonzentration von 50µg/ml (Sambrook et al. 1989). Eine Probe der zu bestimmenden DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:50 mit A. dest. verdünnt. Nach Kalibrierung des Nullwertes mit H₂O wurde die Differenzabsorption der Probe gegen H₂O gemessen. Um Aufschluss über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen oder RNA zu erhalten, wurde auch die OD bei 280nm bestimmt. Bei proteinfreien DNA-Proben liegt das Verhältnis von OD 260 zu OD 280 zwischen 1,8-2,0. Werte größer als 2,0 weisen auf RNA-Rückstände, Werte kleiner als 1,7 auf Proteinverunreinigung hin.

3.4.6 DNA-Amplifikation

3.4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die sequenzielle in vitro Amplifikation von DNA werden Reaktionszusätze in Form von Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), zwei gegenläufige Primer bekannter Sequenz, ein Puffersystem, Wasser und eine DNA-Polymerase zum komplementären Strangaufbau benötigt. Die für eine PCR angepassten Reaktionsbedingungen, speziell die Annealingtemperatur der Primer (Tab. 28 und 29), sorgen für Qualität und Quantität der PCR-Ausbeute.

Sämtliche Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert. Insbesondere für die Amplifikation von Mikrosatelliten hat sich ein `touch-down` Protokoll als vorteilhaft erwiesen. Um eine möglichst spezifische Primeranlagerung zu erzielen, ist in den ersten Zyklen die Annealing-Temperatur für die Primer zu erhöhen. Die Annealing-Temperatur wurde in den nachfolgenden Zyklen schrittweise gesenkt, um eine möglichst hohe Ausbeute an Amplifikaten zu erhalten (Tab. 29). Der Nachweis der Amplifikate und ihre Quantifizierung erfolgte über eine Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.4.7.1). Alle PCR-Produkte wurden für spätere Analysen bei -20°C aufbewahrt.

10x Puffer	2,5µl
dNTPs (100µmol/l)	0,25µl
Primer (100pmol/µl) vorwärts	0,5µl
rückwärts	0,5µl
Amplitaq Taq-Polymerase	0,5µl
DNA (50ng/µl)	1,0µl
H ₂ O (variabel)	19,75µl
Gesamt	25,0µl

Tabelle 28:
Reaktionsansatz für PCR mit spezifischen Primern

Tabelle 29:
Standard der Zyklus-Bedingungen für PCR mit spezifischen Primern (touch-down Protokoll)

	Denaturierung		Annealing		Elongation		Anzahl (n)
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	
Zyklus 1	94°C	5min					1
Zyklus 2	96°C	15sec	61°C	40sec	72°C	40sec	3
Zyklus 3	96°C	15sec	59°C	40sec	72°C	40sec	3
Zyklus 4	96°C	15sec	57°C	40sec	72°C	40sec	3
Zyklus 5	96°C	15sec	55°C	40sec	72°C	40sec	30
Zyklus 6					72°C	2min	1
Zyklus 7					35°C	30min	1

Tabelle 30:

Auflistung der Fälle mit durchgeführter Mikrosatellitenanalyse unter Angabe der Fragestellung, des verwendeten Gewebes und den jeweils untersuchten Chromosomen

Fall	Gewebe	Chromosom(en)	Fragestellung
O-1893/01	Chromosomensuspension/ Blut der Eltern	2	Ausschluss einer Uniparentalen Disomie für Chromosom 2
O-1910/01	Gefrorener Muskel/ Blut der Eltern	4	Bruchpunktbestimmung; parentale Herkunft des deletierten Chromosoms
O-1919/01	Gefrorener Muskel/ Chromosomensuspension der Eltern	2	Bruchpunktbestimmung; Ausschluss einer Uniparentalen Disomie für die Chromosomen 2; parentale Herkunft des Markerchromosoms
O-2065/03	Gefrorener Muskel Blut der Eltern	1, 7, 11, 12, 13	Nachweis einer Triploidie; parentale Herkunft des überzähligen haploiden Chromosomensatzes
118/02	Chromosomensuspension Blut der Eltern	8	Bruchpunktbestimmung; parentale Herkunft des aberranten Chromosoms
S-41/02	Formalin fixierte Lunge Blut der Eltern	18	parentale Herkunft der Trisomie 18
V-2309/01	Gefrorene Abortzotten/ Blut der Eltern	6, 8	Ausschluss einer Uniparentalen Disomie für die Chromosomen 6 und 8; parentale Herkunft der Translokation
V-2317/01	Formalin fixierte Abortzotten/ Blut der Eltern	1, 2, 5, 13, 16, 18	Nachweis einer Triploidie; parentale Herkunft des überzähligen haploiden Chromosomensatzes
V-2370/02	Gefrorene Abortzotten/ Blut der Eltern	8, 13	parentale Herkunft der Trisomie 13; Nachweis einer Chromosomen-aberration am Chromosom 8

3.4.6.2 *PCR mit spezifischen Primern mittels CombiPol DNA Polymerase Kit von Invitek*

Zur Verbesserung der Amplifikationsergebnisse von DNA, die nach dem Protokoll für die Standard-PCR entweder eine nur geringe oder keine Amplifikation zeigte, wurde zusätzlich der CombiPol DNA Polymerase Kit (Fa. Invitek) angewandt. Das im Kit enthaltene Enzymgemisch beinhaltet einen Cocktail aus rekombinanter Taq DNA-Polymerase mit thermostabiler Korrekturlese-Eigenschaft und anorganischer Pyrophosphatase von *Thermus thermophilus*. Weiterhin sind in dem Kit optimierter Reaktionspuffer, $MgCl_2$ sowie ein PCR-Verstärkungszusatz (Enhancer) enthalten. Mit diesem so genannten Enhancer soll eine hohe Prozessivität, Geschwindigkeit und Extensionsstabilität der Enzyme während der PCR-Reaktion erreicht werden (Tab. 31). Die Zyklusbedingungen sind in Tabelle 29 aufgelistet.

10x Puffer	2,5µl
dNTPs (100µmol/l)	0,5µl
Primer (100pmol/µl) vorwärts	0,5µl
rückwärts	0,5µl
MgCl ₂	1,25µl
Enhancer	5,0µl
CombiPol DNA Polymerase	0,4µl
DNA (50ng/µl)	1,0µl
H ₂ O (variabel)	13,35µl
Gesamt	25,0µl

Tabelle 31:
Reaktionsansatz für PCR
mit spezifischen Primern
mittels CombiPol DNA
Polymerase Kit

3.4.6.3 *Degenerate oligonukleotide primed-PCR (DOP-PCR) für die Mikrodissektion*

Eine Modifikation der ursprünglichen PCR-Amplifikation von singulären Sequenzen der Target-DNA stellt die DOP-PCR („degenerate oligonucleotide primed PCR“) dar, bei der mit Hilfe von sogenannten degenerierten Primern eine statistische und repräsentative Amplifikation von unbekanntem DNA-Templates erfolgt (Telenius et al. 1992, Tab. 32). Daher kann sie zur Amplifikation von mikrodisezierten Chromosomen oder zur vergleichenden Genomhybridisierung bei wenig Ausgangsmaterial verwendet werden. Für Hybridisierungsexperimente können DOP-PCR amplifizierte DNA-Fragmente nichtradioaktiv beispielsweise mit Fluoreszenzmarkern markiert werden. Die DOP-Primer besitzen definierte Enden am 5´ und 3´ Ende. In der Mitte liegt eine Random-Hexamer-Sequenz, die alle möglichen Kombinationen der Nukleotide A, C, G und T abdeckt.

Die Sequenz des Primers lautet:

5´-CCG-ACT-GCA-GNN-NNN-NAT-GTG-G-3´.

Die 6 degenerierten Positionen ermöglichen einen Pool von 4⁶-Primer verschiedener Sequenz. Der Reaktionsansatz für eine DOP-PCR ist in Tabelle 32 zu finden. Als Template-DNA dienen die im Sammelpuffer befindlichen dissezierten DNA-Fragmente (vgl. Kap. 3.3.3).

Im Gegensatz zur PCR zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen laufen die ersten Zyklen der DOP-PCR unter wenig stringenten Temperaturbedingungen ab.

Nach initialer Denaturierung bei 93°C folgten 8 Zyklen bei 94°C für 1min, 30°C für 1,5min mit einer 4 minütigen Transition von 30°C à 72°C und Elongation bei 72°C für 3min. Die folgenden 28 Zyklen liefen unter stringenten Bedingungen ab (Denaturierung bei 94°C 1min, Annealing bei 56°C 1min, Elongation bei 72°C 3min). Das Ergebnis der DOP-PCR wurde mit einer Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. Kapitel 3.4.7.1).

Im Idealfall ist ein homogener „Schmier“ im Bereich von 300bp bis 2000bp zu sehen. Die PCR-Produkte wurden bis zur späteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Tabelle 33 gibt einen Überblick über die PCR-Bedingungen.

10x Puffer	3,0 μl
dNTPs (100 $\mu\text{mol/l}$)	2,4 μl
Primer* (4 $\mu\text{mol/l}$)	1,2 μl
BSA acetyliert (5ng)	1,0 μl
Taq-Polymerase	0,5 μl
DNA (gesamter Präamplifikations-Ansatz)	20 μl
H ₂ O	18,9 μl
MgCl ₂ (2,5mmol/l)	3,0 μl

Tabelle 32:
Reaktionsansatz für PCR mit degenerierten Primern nach Mikrodissktion (*DOP-Primer nach Müller-Navia et al. 1995)

	Denaturierung		Annealing		Elongation		Zyklen
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Anzahl (n)
Zyklus 1	93°C	3min					1
Zyklus 2	94°C	1min	30°C 45°C	1min 1min	72°C	3min	8
Zyklus 3	94°C	1min	56°C	1min	72°C	3min	28
Zyklus 4					72°C	10min	1

Tabelle 33:
Zyklusbedingungen für DOP-PCR nach Mikrodissektion

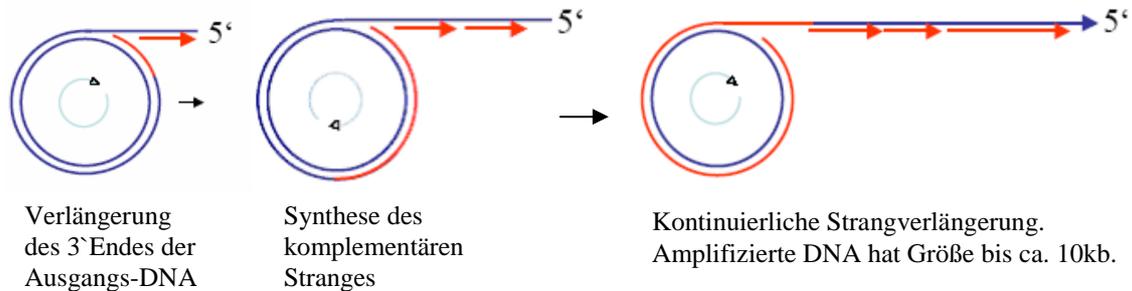
3.4.6.4 DNA-Amplifikation mittels GenomiPhi Amplification Kit

Mit dem GenomiPhi DNA Amplification Kit (Fa. Amersham Biosciences) können, ausgehend von kleinen bis kleinsten DNA-Mengen, gesamte Genome universell über einen `Rolling Circle`-Mechanismus amplifiziert werden. Die bei dieser Methode verwendete Phi29 DNA-Polymerase amplifiziert die Template-DNA exponentiell mittels Strangverschiebung. Dabei werden am 3` OH-Ende der Ausgangs-DNA Nukleotide ansynthetisiert. Der komplementäre Strang wird kontinuierlich verlängert und kann nun länger werden als der Ausgangs-Strang (Abb. 9). Die Korrekturlese-Eigenschaft dieser speziellen DNA-Polymerase bewahrt die originale genetische Sequenz.

Als Template-DNA wurde 1 μl (10ng) gesamtgenomische DNA eingesetzt und mit 9 μl GenomiPhi Sample Buffer gemischt. Das Gemisch wurde 3min bei 95°C denaturiert und danach sofort auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden 9 μl Reaktions-Puffer und 1 μl GenomiPhi Enzym-Mix zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nun 16-18h bei 30°C inkubiert. Die Amplifikation wurde bei 65°C für 10min gestoppt und die Proben auf Eis gestellt.

Zur Überprüfung des Amplifikationsergebnisses wurden 5µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. In der Regel war ein DNA-Schmier >1100bp zu finden (vgl. auch Abb. 17 in Kap. 4.2.2).

Abbildung 9:
Amplifikation genomischer DNA mittels Phi29 Polymerase über `Rolling Circle`-Mechanismus (GenomiPhi, Amersham Biosciences)



3.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.4.7.1 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gelsysteme sind die Standardmethode für die Trennung und Identifizierung von linearen DNA-Fragmenten. Agarosegele werden verwendet, wenn man große Poren für die Analyse von Molekülen über 10nm Durchmesser benötigt. Gele mit Porengrößen von 150nm werden durch 1% und bis 500nm durch 0,16% Agarose erzielt. Tabelle 34 gibt eine Übersicht über die Trennbereiche und die entsprechenden Agarosekonzentrationen (Gassen & Schrimpf 1999).

Agarose wurde durch Aufkochen in einer Pufferlösung gelöst und durch Abkühlung geliert. Dabei bilden sich aus dem Polysaccharid-Sol Doppelhelices aus, die sich in Gruppen seitlich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern.

Agarosekonzentration [% (w/v)]	Kettenlänge [kb]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabelle 34:
Trennbereiche für lineare DNA-Fragmente in Agarosegelen (nach Gassen & Schrimpf 1999)

Um den Zustand der DNA aus den verschiedenen asservierten Geweben, d.h. ihren Degradationsgrad beurteilen zu können, wurden 5µl DNA-Lösung auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurde Agarose (4g in 200ml 1xTBE-Puffer) durch Kochen gelöst und nach Abkühlung mit 2µl Ethidiumbromid (10µg/ml) versetzt. Durch

diesen in die DNA interkalierenden Farbstoff lässt sich doppelsträngige DNA bis etwa 20ng bei einem Auftrag von 4µl nachweisen (Datenblatt DNA-Längenstandard XIV, ROCHE 2001). Anschließend wurde das Gel in einen vorbereiteten waagerechten Gelschlitten gegossen. Ein in den Schlitten eingehängter Kamm (1mm) sparte dabei die Ladetaschen aus. Nach ca. 20min war das Gel vollständig auspolymerisiert und konnte in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Nach Entfernung des Kammes wurden die mit Ladepuffer versehenen DNA-Proben und der Längenstandard (Marker VIII, Fa. Boehringer-Mannheim) in die Taschen pipettiert. Bei einer Spannung von 90V und einer Laufzeit von ca. 45min erfolgte die Auftrennung der negativ geladenen DNA von der Kathodenseite auf die Anodenseite bis zur gewünschten Laufstrecke. Nach der Elektrophorese wurde die aufgetrennte DNA auf einem UV-Transilluminator bei 312nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Neben der Größenidentifizierung der Produkte durch den Vergleich mit dem Längenstandard ermöglichte das Gelbild anhand der Bandenintensität eine Abschätzung der Produktmenge.

Der Nachweis der DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe, der Nicktranslationsprodukte sowie der amplifizierten PCR-Produkte und ihre Quantifizierung erfolgte über ein Agarosegel in verschiedenen Konzentrationen (1%; 1,2%; 2%).

3.4.7.2 *Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)*

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wird für die Auftrennung von DNA-Fragmenten <1000bp verwendet. Durch Variation der Acrylamidkonzentration kann der Trennbereich für unterschiedliche Fragmentlängen optimiert werden (Tab. 35). Zur Trennung doppelsträngiger DNA-Moleküle werden native Gelsysteme verwendet. Da sich die Größe zweier Allele um nur zwei Basenpaare unterscheiden kann, ist ihre Auftrennung in einer hochauflösenden Acryl-Matrix zur genauen Auswertung notwendig. Nach der PCR wurden die Produkte gelelektrophoretisch auf einem 8%igen, nicht denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt.

Tabelle 35:

Trennbereich für DNA-Fragmente in nativen Polyacrylamidgelen (nach Sambrook et al. 1989) ¹Die Zahlen geben in etwa die Größe (in bp) der Fragmente doppelsträngiger DNA an, deren Wanderungsverhalten dem des Farbstoffs entspricht.

Acrylamidkonzentration [%]	Kettenlänge [bp]	Bromphenolblau ¹	Xylencyanol ¹
5,0	80-500	260	65
8,0	60-400	160	45
12,0	40-200	70	20
20,0	6-100	45	12

Gießen der Gele und Probenauftrag

Ein Gel setzt sich aus insgesamt 4 Komponenten zusammen: Gel-Lösungen A und B (Fa. Roth), 1xTBE-Puffer, 10%iges Ammoniumpersulfat und TEMED.

Zur Vorbereitung gehörte die Reinigung der beiden Glasplatten und des 0,8mm dicken Spacers mit Wasser und anschließend 96%igem Ethanol. Die Glasplatten mit den am Rand aufgesetzten Spacern, welche die Geldicke vorgeben, wurden aufeinander gelegt und der untere Rand zum Auslaufschutz mit Klebeband abgeklebt. Die Längsseiten der Glasplatten wurden durch Klammern zusätzlich abgedichtet. Die Gel-Lösung wurde in den Spalt zwischen den schräg gehaltenen Glasplatten möglichst luftblasenfrei eingegossen. Am oberen Ende wurde ein 20 zähliger Plastikamm zur Formung der Geltaschen eingelegt. Das Gel lagerte bis zur vollständigen Auspolymerisierung in der Horizontalen für mindestens 1-1½ Stunden.

Nach Auspolymerisation wurden die seitlichen Klammern und das Klebeband entfernt. Das Gel wurden in die horizontale Gelkammer eingespannt. In die obere sowie untere Kammer kamen als Laufpuffer etwa 200ml 1xTBE. Der Kamm wurde nun entfernt und die Taschen sofort mit Hilfe einer Spitze durchgespült, um nichtpolymerisierte Acrylamidreste und Luftblasen, die den Lauf stören könnten, aus den Geltaschen zu entfernen. Um eine möglichst gleichmäßige Temperatur auf der Geloberfläche von ca. 50°C zu erhalten, erfolgte ein Vorlauf der Elektrophorese bei 35 Watt für ca. 20 Minuten. Zur Probenvorbereitung wurde die zuvor anhand des Agarosegelergebnisses bestimmte Menge des PCR-Produkts (in der Regel zwischen 0,5-5µl) entnommen und mit A. dest. auf 6µl aufgefüllt. Zu diesem Probenansatz wurden 2µl Ladepuffer, bestehend aus 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol und 30% Glycerol pro Probenansatz hinzugegeben.

Zur Abklärung der Produktgrößen wurde in den beiden äußersten Taschen ein 100bp DNA-Ladder aufgetragen. Zur besseren Auftrennung ließ man die Proben mit 10 Watt

aus den Taschen ins Gel hineinlaufen und steigerte nach 10 Minuten für die restliche Laufzeit die Leistung auf 35 Watt.

Über die den Proben beigemischte Farbkomponente konnte die Auftrennung der Produkte verfolgt werden. Bromphenolblau wanderte in einem 8%igen PAGE eine Höhe von 45bp, während Xylencyanol als Farbmarker ungefähr die Laufstrecke der 160bp Fragmente anzeigte (siehe Tab. 35). Erfahrungswerte zeigten, dass für eine genaue Auftrennung der PCR-Produkte von einer Länge von 120-170bp eine Laufzeit von etwa 2 Stunden und bei Produkten mit 200-350bp ca. 3 Stunden erforderlich waren. Es war wichtig, für die einzelnen Produkte die optimale Laufzeit zu ermitteln, da bei zu langer Laufzeit unscharfe Banden resultierten und bei zu kurzer die Auftrennung der einzelnen Allele nicht ausreichend war.

Silberfärbung

Um die Nachteile einer radioaktiven Laborarbeit zu umgehen (Strukturbelastung, hohe Kosten für die Entsorgung der Abfälle), wurde zum sensiblen Nachweis der aufgetrennten Allele die Silberfärbung angewandt. Diese bietet gegenüber anderen Nachweismethoden die zusätzlichen Vorteile einer kostengünstigen und relativ einfachen Handhabung. Zudem entspricht die Sensitivität in etwa derjenigen einer radioaktiven Markierung (Bassam et al. 1991).

Die Silberlösung musste immer frisch vor jedem Färbevorgang angesetzt werden, während die Ammoniumpersulfatlösung maximal eine Woche bei 4°C haltbar ist. Die Entwicklerlösung (30%iges Natriumcarbonat) wurde als Stammlösung angesetzt und auf eine 3%ige Lösung vor jedem Färbegang frisch verdünnt. Die Stopp- und Fixierlösungen konnten zur Vereinfachung der Methode in größeren Mengen angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Färbeschritte

Das Gel wurde nach einer Laufzeit von 2-3 Stunden vorsichtig in die Färbewanne überführt. Mittels Tröpfchentest wurden die Färbelösungen auf ihre richtige Funktionsweise getestet. Dazu wurden auf einem Objektträger jeweils einen Tropfen Silbernitrat- und Natriumcarbonatlösung gemischt. Innerhalb weniger Sekunden zeigte sich eine Schwarzfärbung. Blieb diese aus oder benötigte mehr als 10 Sekunden, musste die Qualität der Chemikalien und des Aqua bidest sowie die Reinheit der Gefäße überprüft werden.

Die weiteren Schritte wurden in einer vollautomatischen Färbereinheit (Fa. Pharmacia Biotech) durchgeführt. Nach Entfernen des 10%igen Ethanol wurde das Gel zweimal

für 3min mit A. dest. gespült. Danach erfolgte die Zugabe der Silbernitratlösung. Nach 20min Färben wurde diese nach mehrmaligem Spülen mit A. dest. durch die Entwicklerlösung ersetzt. Dabei musste das Gel genau beobachtet werden, um den richtigen Farbton der Banden abzuspannen. Danach wurden die Stopp-, Essig- und Fixierlösungen in beschriebener Reihenfolge und Zeitdauer ausgetauscht (Tab. 36) Die Gesamtdauer eines Färbeprozesses betrug ungefähr 90 Minuten.

Lösung	Zeit	Schritt
10% Ethanol	1x5min	Waschung
1% HNO ₃	2x3min	Vorbereitung für Färbung
0,2% AgNO ₃	1x20min	Aufnahme des Silbernitrats
A. dest.	3x1min	Auswaschung überschüssiges Silbernitrat
3% NaCO ₃ + Formaldehyd	3x1min	Färbung der Banden; 3. Schritt individuell nach Färbedauer
10% CH ₃ COOH	1x3min	Waschung
A. dest.	1x5min	
Gel-Fix-Lösung	1x20min	Stabilisierung und Fixierung des Gels

Tabelle 36:
Färbeprotokoll zur Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Nach sichtbar werden der Banden wurde das Gel auf eine optimale Größe zugeschnitten. Dann wurden zwei Blätter Celophanfolie in der Fixierlösung eingeweicht, zwischen die das Gel möglichst ohne Luftblasen gelegt und zum Trocknen in einen Plastikrahmen für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur eingespannt wurde. Danach war das Gel gut zu handhaben und konnte mit Edding-Stift beschriftet und ausgewertet werden.

Auswertung eines Polyacrylamidgels

Über den Vergleich mit dem Längenstandard wurde die Größe der Amplifikationsprodukte überprüft. Beim Vorliegen einer Heterozygotie (dialeles System) für den entsprechenden Locus ergaben sich zwei unterschiedlich große Banden pro Elternteil, so dass sich die Allelverteilung im zu untersuchenden fetalen Gewebe exakt ermitteln ließ (siehe Fallbeschreibung Kap. 4.4.1.3, Abb. 27). Im ungünstigsten Falle lagen beide elterlichen Banden auf einer Höhe. Aufgrund der Homozygotie war dann eine Auswertung bezüglich der parentalen Herkunft nicht möglich.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden 55 Fälle, die einer konventionellen cytogenetischen Analyse nicht bzw. nur unzureichend zugänglich waren, mit molekularcytogenetischen und molekulargenetischen Methoden untersucht. Einen Überblick über die Fälle bietet die Tabelle C im Anhang. Die Untersuchungen wurden an DNA aus Placentazotten, Amnion, verschiedenen fetalen Geweben, Blut oder asservierter Chromosomensuspension durchgeführt. Sie umfasste die Erhebung des chromosomalen Status mittels CGH in 51 Fällen, die präzise Abklärung von rearrangierten Chromosomen mittels Mikrodissektion in 2 Fällen sowie die Durchführung von FISH- und Mikrosatelliten-Analysen in insgesamt 11 Fällen. Anhand der in 10 Fällen durchgeführten Markertypisierung konnte in allen Fällen die Chromosomenstörung und in 8 Fällen deren parentale Herkunft eruiert werden.

In 51/55 Fällen wurde eine CGH-Analyse zur Abklärung der Abortursache bzw. Fehlbildungen von Feten durchgeführt. In 42/51 der Fälle (82,4%) konnte ein Ergebnis über CGH erzielt werden, während in 9 Fällen (17,6%) kein Ergebnis mittels CGH zu erreichen war.

In 10/51 Fällen wurden zusätzlich zur CGH molekularcytogenetische und molekulargenetische Methoden angewendet, um das bereits vorhandene Ergebnis zu verifizieren und zu präzisieren.

4/55 Fälle wurden nicht mit der Comparativen Genomhybridisierung, sondern ausschließlich mittels FISH und/oder Mikrosatellitenanalyse bzw. Mikrodissektion auf ihre chromosomale Aberration hin untersucht.

Im Allgemeinen war der Einsatz der jeweiligen molekularcytogenetischen Techniken zur Abklärung der Chromosomenstörung abhängig von der Art des asservierten Materials. Fälle, bei denen ausschließlich Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Verfügung stand, wurden über CGH, wohingegen Fälle, in denen eine Fibroblastenkultur bzw. Chromosomensuspension asserviert wurde, über Mikrodissektion sowie FISH analysiert.

4.1 DNA-Isolierung aus asserviertem Fetal- oder Abortgewebe

Die Grundvoraussetzung für das Gelingen molekularcytogenetischer Analyseverfahren ist eine gut erhaltene und in ausreichender Menge vorhandene genomische DNA. In Tabelle E im Anhang sind alle Fälle mit Lagerungszeit in Formalin, Autolysegrad des Gewebes und DNA-Fragmentlänge aufgelistet. Insgesamt wurden 6 verschiedene Methoden zur Isolierung von DNA aus asserviertem Abortgewebe angewendet (Tab. 37).

Tabelle 37:
Übersicht der verwendeten Methoden zur DNA-Isolierung an verschieden asservierten Geweben

Gewebe	Methode	Anzahl bearbeiteter Fälle
Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe	- nach Proteinausfällung (vgl. 3.4.1.1)	42
	- All-tissue DNA-Kit (vgl. 3.4.1.2)	6
	- Invisorb Spin Tissue Mini Kit (vgl. 3.4.1.3)	6
		Gesamt: 51
nativ eingefrorenes Gewebe	- Aussalzmethode (vgl. 3.4.2)	10
Blut	- QIAamp DNA Blood Maxi Kit (vgl. 3.4.3)	1
fixierte Chromosomen-suspension	- nach Li et al. 1995 (vgl. 3.4.4)	2

4.1.1 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe

Als Untersuchungsgut dienten Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebelöckchen unterschiedlichen Alters. Für eine CGH-Analyse war es erforderlich, doppelsträngige DNA zu isolieren.

Zum Vergleich der Effizienz wurde DNA nach 3 unterschiedlichen Methoden (All-tissue DNA-Kit, Invisorb Spin Tissue Mini Kit, Proteinausfällung) in 6 Fällen parallel isoliert. Hierbei wurden von den einzelnen Fällen vorrangig Gewebe mit hoher Zelldichte und minimaler Autolyse gewählt.

Beim Vergleich der drei Methoden zeigte sich, dass über die Proteinausfällung die größte DNA-Menge mit gutem Reinheitsgrad gewonnen werden konnte. Die sowohl mit dem All-tissue DNA-Kit als auch Invisorb Spin Tissue Mini Kit behandelten Gewebe wiesen im Verhältnis zur Methode der Proteinausfällung eine insgesamt zu niedrigere DNA-Konzentration sowie Reinheit auf (Tab. 38). Nach Auftrennung der DNA-Isolate auf ein Agarosegel zeigte sich in allen Fällen ein Bandenschmier von maximal 100bp-500bp.

Die Ratiowerte von 0,2-4,9 deuteten auf Verunreinigung mit Proteinen und RNA hin, welche auf den vorgegebenen, für Formalin fixierte Gewebe vermutlich zu kurzen Enzymverdau zurückgeführt werden dürfte. Die DNAs, die mittels All tissue Kit und Invisorb Spin Tissue Mini Kit isoliert wurden, eigneten sich daher nicht zum direkten Einsatz für die CGH über Nicktranslation, sondern mussten zuvor gereinigt und wegen der geringen Ausbeute universell amplifiziert werden (siehe Kap. 3.4.6.3 oder Kap. 3.4.6.4). Wie die späteren Ergebnisse zeigten, erschwerten die hohen Verunreinigungen mit Proteinen und RNA die für eine CGH notwendigen Markierungsverfahren. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen DNA aus formalinfixiertem Gewebe vorrangig durch Proteinausfällung isoliert. Insgesamt wurde in 42 Fällen DNA über die Methode der Proteinausfällung gewonnen. Die Qualität und Quantität der DNA wurde anhand der photometrischen Konzentrationsbestimmung sowie der Fragmentgröße im Agarosegel ermittelt (Tab. 38, Abb. 10).

Tabelle 38:
Methodenvergleich zur DNA-Extraktion aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe: Angaben zur DNA-Konzentration und Reinheit

Fall	Gewebe	DNA-Konzentration (ng/µl)			Ratio A260:A280		
		nach Protein- ausfällung	All-tissue DNA-Kit	Invisorb Spin Tissue Mini Kit	nach Protein- ausfällung	All-tissue DNA-Kit	Invisorb Spin Tissue Mini Kit
O- 535/88	Lunge	1203,2	0	32,5	1,60	1,06	1,00
	Leber	3205,0	6,8	42,2	1,53	0,45	1,23
O- 944/91	Haut	77,7	12,7	27,4	1,50	0,68	1,35
	Gehirn	227,0	10,5	16,4	1,43	0,50	0,98
O- 1173/93	Lunge	1120,1	0	52,2	1,62	0,72	1,10
	Leber	2585,3	38,9	63,9	1,60	1,921	1,19
O- 1362/95	Lunge	1521,3	10,9	30,5	1,58	4,24	1,18
	Niere	131,3	26,8	75,2	1,58	2,01	1,12
O- 1485/96	Lunge	1499,8	3,0	48,7	1,57	0,21	1,20
O- 1488/96	Lunge	303,2	26,2	46,8	1,46	2,28	1,60
	Haut	914,7	40,2	23,9	1,56	4,86	1,38

Anhand der Untersuchungsergebnisse konnte eine Klassifizierung der DNA bezüglich ihrer Fragmentgröße vorgenommen werden. Ausgehend von einer erfolgreichen CGH-Analyse kristallisierten sich 3 Stufen bezüglich der DNA-Qualität heraus (vgl. auch Tab. D im Anhang):

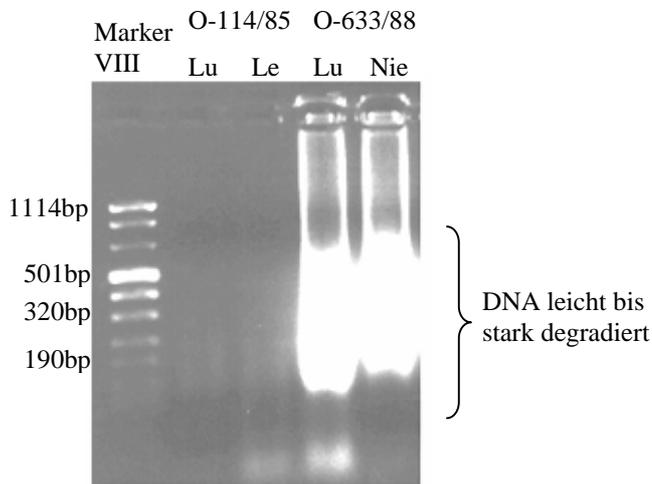
- Ø DNA-Längen-Optimum: 200bp-1000bp und mehr
- Ø DNA leicht degradiert: 200bp-700bp
- Ø DNA stark degradiert: 100bp-500bp und weniger

In insgesamt 26/42 Fällen (61,9%) konnte aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben DNA gewonnen werden, die ein DNA-Optimum aufzeigten, während 10 Fälle (23,8%) leicht degradierte DNA aufwiesen. In 6 Fällen (14,3%) konnten keine für eine CGH-Analyse ausreichend großen DNA-Fragmente isoliert werden. Die fortgeschrittene Degradierung der DNA nach einer Fixierung von ca. 2 Jahren im Vergleich zur DNA mit einer Fixierungsdauer von ca. 1,5 Monaten ist Abbildung 10 zu entnehmen.

Abbildung 10:

DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben

Fall 114/85: Spätabort mit fortgeschrittener Mazeration der Haut sowie Autolyse der inneren Organe; 2 Jahre Lagerungszeit in Formalin; DNA in der Größenordnung von 150-250bp; O-633/88: 3 Monate Lagerungszeit in Formalin; DNA in der Größenordnung 150-800bp; Lu=Lunge; Le=Leber; Nie=Niere)



4.1.2 DNA-Isolierung aus frischem und nativ eingefrorenem Gewebe

In insgesamt 10 Fällen wurde DNA aus nativ eingefrorenem Gewebe nach Gewebeaufschluss unter Stickstoff (vgl. Kapitel 3.4.2) isoliert. In allen 10 Fällen wurde DNA in ausreichender Menge mit sehr guter Qualität und einer DNA-Länge im Bereich von 300bp bis >1500bp gewonnen (Tab. 39, Abb. 11).

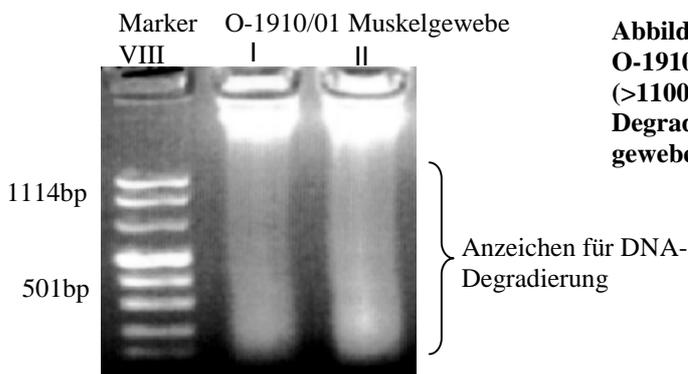


Abbildung 11:

O-1910/01: überwiegend hoch-molekulare DNA (>1100bp) mit Anzeichen von DNA-Degradierung aus nativ eingefrorenem Muskelgewebe in zwei verschiedenen Ansätzen (I+II)

Tabelle 39:

DNA-Konzentration und Reinheit nach DNA-Extraktion aus verschiedenen nativ eingefrorenen Geweben (I+II entsprechen verschiedenen Extraktionsansätzen)

Fall	Gewebe	DNA-Konzentration ng/ μ l	Ratio A260:A280
O-1842/00	Zunge I	732,9	1,50
O-1896/01	Zotten I	471,6	1,59
	Muskel I	512,9	1,56
O-1910/01	Muskel II	524,2	1,76
O-1919/01	Zotten I	363,8	1,57
O-1946/02	Zunge II	966,8	1,53
	Zotten II	1440,6	1,54
O-2051/03	Muskel II	744,9	1,54
O-2065/03	Zunge	757,5	1,51
FBK137	Zotten I	1201,5	1,68
V-2309/02	Zotten I	398,7	1,69
V-2370/02	Zotten I	370,1	1,51

4.1.3 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

In einem Fall wurde aus EDTA-Blut eines Neugeborenen DNA für eine CGH-Analyse isoliert. In 4 weiteren Fällen wurde DNA aus EDTA-Blut von Eltern für eine vergleichende Mikrosatellitentypisierung mittels QIAamp Maxi Kit gewonnen. In allen Fällen konnte hochmolekulare DNA mit einer Länge von 300bp bis ca. 2kb gewonnen und problemlos in PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Die Ratiowerte lagen im Bereich von 1,5-1,8 (Abb. 12).

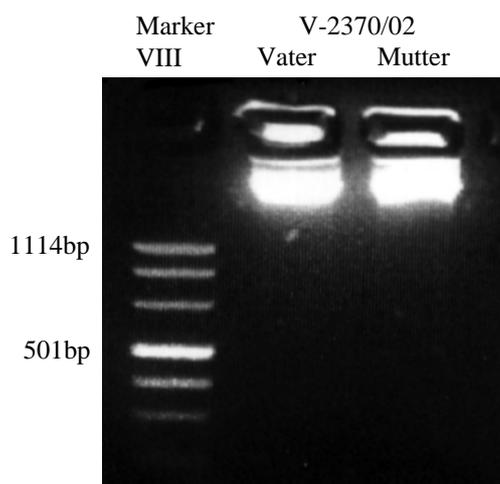


Abbildung 12:
V-2370/02: hochmolekulare DNA (>1kb) aus EDTA-Blut ohne Hinweis auf DNA-Degradierung

4.1.4 DNA-Isolierung aus fixierter Chromosomensuspension

In 3 Fällen wurde DNA aus asservierter Chromosomensuspension isoliert. In diesen Fällen sollte eine molekulargenetische Diagnostik Aufschluss über Entstehungsmechanismen, Herkunft von Markerchromosomen oder Präzisierung cytogenetischer Befunde erbringen. Die über diese Methode isolierte DNA war in Quantität gut geeignet für eine Mikrosatellitentypisierung.

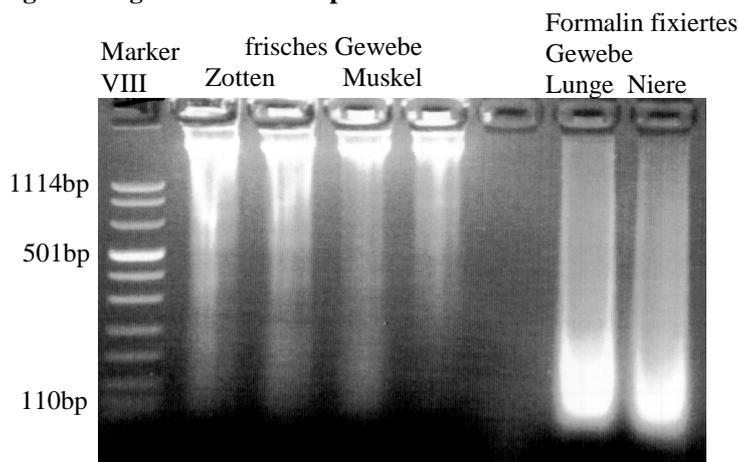
4.1.5 Vergleich der verschiedenen Methoden zur DNA-Isolierung

Grundsätzlich ließ sich mit allen angewandten Methoden DNA gewinnen. Im Gegensatz zu DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben erzielte die DNA aus Blut oder frischem bzw. nativ gefrorenem Gewebe in den nachfolgenden molekularcytogenetischen Untersuchungen klare und reproduzierbare Ergebnisse.

Im Falle Formalin fixierter Gewebe konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Formalinfixierungsdauer und der DNA-Fragmentgröße besteht. Abbildung 13 zeigt gesamtgenomische DNA isoliert aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe im Vergleich zu DNA, die aus nativem Gewebe gewonnen wurde. Die DNA aus frischem Zotten- und Muskelgewebe hat eine Länge von >1100bp. DNA nach dreiwöchiger Formalinfixierung ist bereits hochgradig degradiert (DNA-„Schmier“ mit einer Gesamt-Fragmentlänge zwischen 100-1100bp). Der größte Teil der DNA zeigt jedoch eine Länge zwischen 100-300bp.

Abbildung 13:

O-1896/01: 2%iges Agarosegel; Spur 1-4 höhermolekulare DNA aus nativem Gewebe mit Fragmentlängen von >1100bp (Zotten und Muskel in je 2 Ansätzen). Spur 6+7 degradierte DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Lungen- und Nieren Gewebe mit Fragmentlängen von 100-300bp



4.2 DNA-Amplifikation

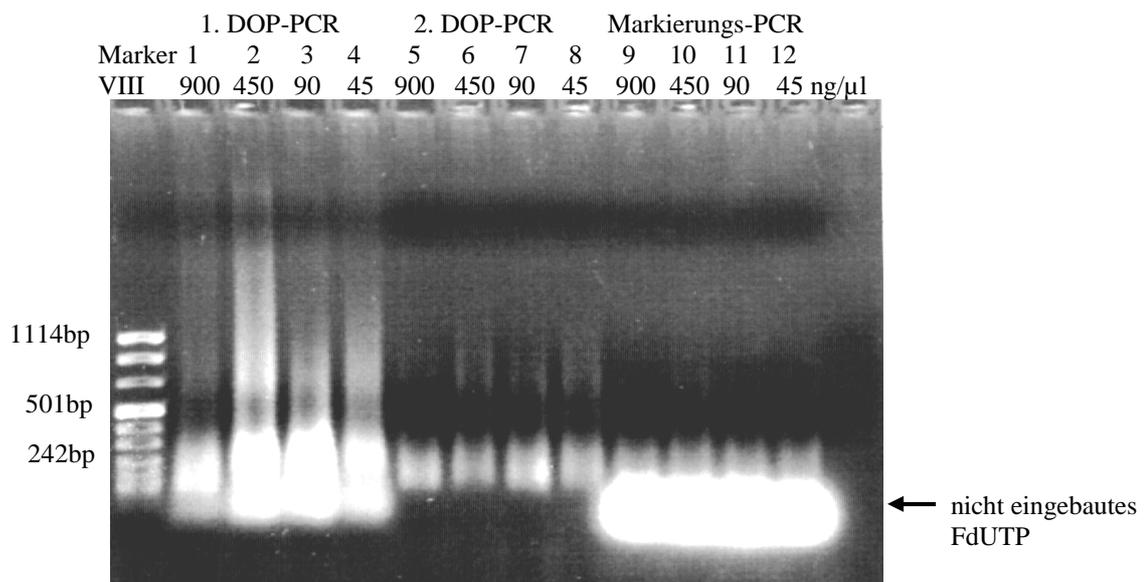
4.2.1 Universelle DNA-Amplifikation mit DOP-PCR von ROCHE

Für die universelle Amplifikation gesamtgenomischer DNA wurde ein Kit-System der Firma ROCHE (DOP Master) getestet. Zur Etablierung dieses Verfahrens wurde aus EDTA-Blut isolierte DNA in verschiedenen Konzentrationen (900, 450, 90, 45ng/µl) eingesetzt. Hierzu wurden 2 unterschiedliche methodische Vorgehensweisen durchgeführt, um die Effizienz der Schritte miteinander zu vergleichen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen.

Im ersten Versuchsteil wurde die aus nativem Blut gewonnene Test-DNA entsprechend den Reaktions- und Zyklusbedingungen der Amplifikation nach Mikrodissektion universell amplifiziert (siehe Kapitel 3.4.6.3, Tab. 32). Anschließend wurden jeweils 1µl PCR-Produkt in eine weitere DOP-PCR eingesetzt, welche nach den Reaktions- und Zyklusbedingungen des ROCHE-Protokolls durchgeführt wurde (siehe Kap. 3.3.2.2, Tab. 15). 1µl dieses PCR-Produktes wurde nun in eine Markierungs-PCR eingesetzt (siehe Kap. 3.3.2.2, Tab. 17). Alle drei PCR-Reaktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 14). Dazu wurden jeweils 5µl PCR-Produkt auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

Abbildung 14:

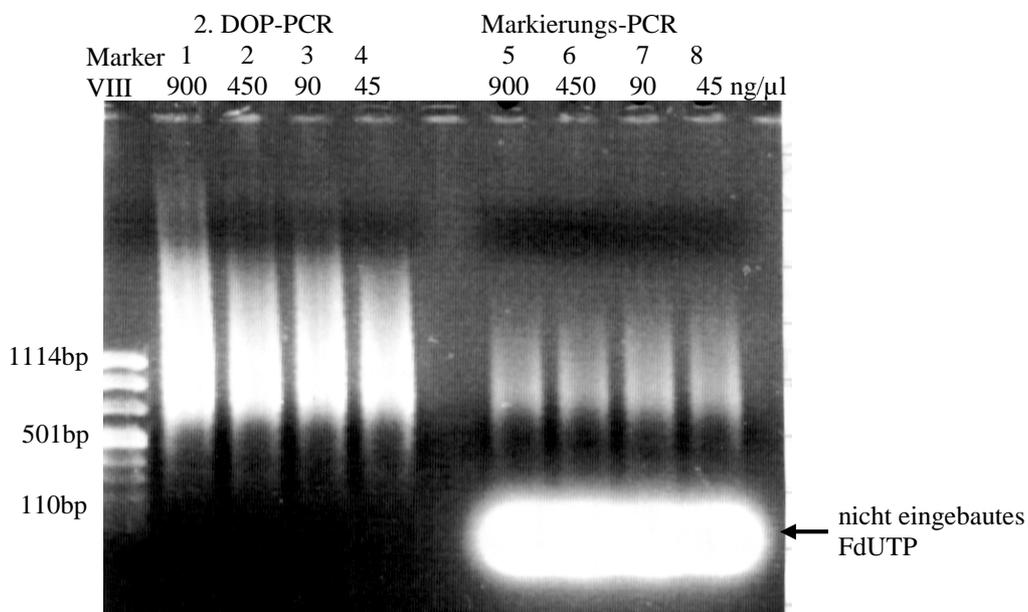
1,2%iges Agarosegel mit PCR-Produkten einer Test-DNA in verschiedenen Konzentrationen (900ng/µl, 450ng/µl, 90ng/µl und 45ng/µl) nach 1. DOP-PCR (Spuren 1-4) und 2. DOP-PCR (Spuren 5-8) und anschließender Markierungs-PCR (Spuren 9-12)



Es konnte in allen Ansätzen eine Amplifikation nachgewiesen werden. Mit jeder weiteren PCR-Reaktion zeigte sich jedoch eine kontinuierliche Abnahme der Fragmentgröße. Nach der 1. DOP-PCR betrug die Fragmentgröße ca. 100-1100bp mit einem Hauptanteil zwischen 100bp und 400bp. Nach der 2. DOP-PCR nahm die Fragmentgröße deutlich ab (100-800bp) mit einem Hauptanteil bei 100-300bp. Nach der Markierung der DNA mit FdUTP in der 3. PCR lag die Größe der DNA-Fragmente überwiegend zwischen 100-300bp (Abb. 14).

Im zweiten Versuchsteil wurde dieselbe genomische Test-DNA direkt in der 2. DOP-PCR amplifiziert und in einer Markierungs-PCR mit FdUTP markiert (Tab. 17; Kap. 3.3.2.2). Damit sollte eine Abnahme der Fragmentgröße verhindert werden. In allen Ansätzen ließ sich eine Amplifikation nachweisen, wobei die Fragmentgröße der amplifizierten DNA im Bereich von 300 bis >1500bp lag. Nach der Markierungs-PCR waren Fragmentgrößen im Bereich von 300-1000bp zu verzeichnen (Abb. 15), so dass sich diese Vorgehensweise als günstiger erwies und daher für die Amplifikation von DNA aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe herangezogen wurde.

Abbildung 15:
1,2%iges Agarosegel mit PCR-Produkten einer normal weiblichen Test-DNA in verschiedenen Konzentrationen (900ng/µl, 450ng/µl, 90ng/µl und 45ng/µl) nach 2. DOP-PCR (Spuren 1-4) und anschließender Markierungs-PCR (Spuren 5-8)

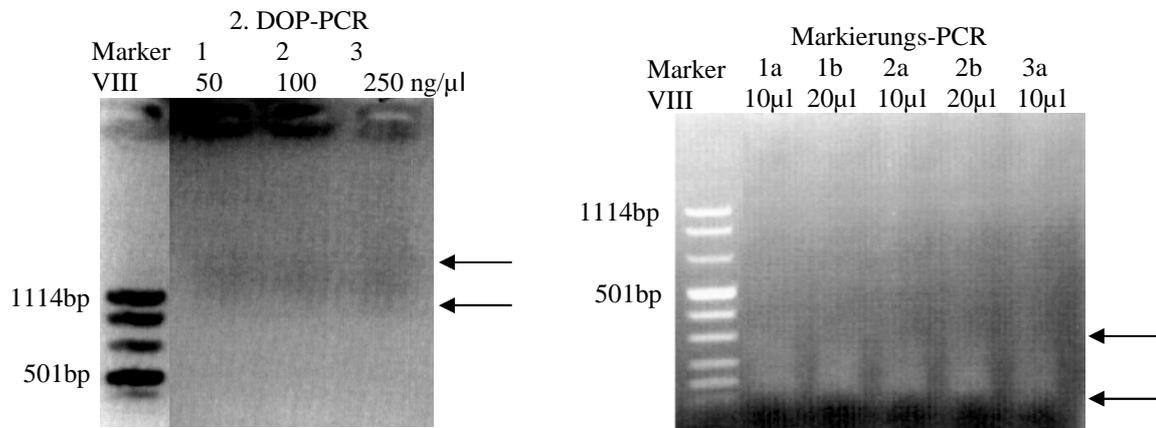


Im Fall V-2309/01 wurde dieses Verfahren an DNA aus Formalin fixiertem Gewebe mit drei verschiedenen DNA-Konzentrationen (50, 100 und 250ng/μl) angewendet. Um zu prüfen, welche DNA-Menge am geeignetsten zur Erhöhung der Amplifikationsrate war, wurden jeweils 10μl und 20μl aus der 2. DOP-PCR in die Markierungs-PCR eingesetzt. Unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge war die Ausbeute insgesamt geringer als bei DNA aus nativem Blut. Die Größe der PCR-Produkte lag im Bereich von ca. 1000bp. Nach Markierungs-PCR trat eine deutliche Verkürzung der Fragmente auf (Bereich 200-500bp). Tendenziell war eine stärkere Amplifikation bei den Proben mit 20μl zu beobachten (Abb. 16).

In 5 Fällen (O-101/85; O-574/88; O-955/91; O-1173/93; O-1485/96) war entweder die Ausbeute nach DNA-Isolierung gering oder die Markierung der DNA über Nicktranslation erbrachte ein negatives Ergebnis, so dass vor dem eigentlichen Markierungsverfahren eine Präamplifikation vorgeschaltet werden musste.

Abbildung 16:

V-2309/01: 1,2%iges Agarosegel mit PCR-Produkten verschiedener Konzentrationen (50ng/μl, 100ng/μl, 250ng/μl) nach 2. DOP-PCR (Spuren 1-3) und anschließender Markierungs-PCR mit je 10μl und 20μl eingesetztem Amplifikat aus der 2. DOP-PCR (Spuren 1a=10μl und 1b=20μl; Spuren 2a=10μl und 2b=20μl; 3a=10μl); Pfeile markieren Fragmentgröße der PCR-Produkte



4.2.2 Universelle DNA-Amplifikation mit GenomiPhi DNA Amplification Kit

Die Polymerase des Bacteriophagen Phi29 leitet die Reproduktion der DNA gleichzeitig an mehreren Stellen auf der denaturierten linearen DNA ein. Während der Synthese wird durch eine Strangverlagerung neu synthetisierte einzelsträngige DNA erzeugt. Weitere Primer binden an den verlagerten DNA-Strängen und erzeugen Doppelstrang-DNA. Erzielt werden damit Fragmente mit großer Länge. Angewendet wurde dieses Verfahren an 7 Fällen, bei denen die Ausgangskonzentration zu niedrig für eine direkte

CGH-Analyse war. In allen Fällen konnte eine Amplifikation erreicht werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgte photometrisch. Die Beurteilung der DNA-Fragmentlänge wurde über ein 1%iges Agarosegel erreicht (Abb. 17). In allen Fällen konnte hochmolekulare DNA >1500bp nachgewiesen werden (Tab. 40).

Tabelle 40:

Universelle DNA-Amplifikation mit GenomiPhi: Vergleich der DNA-Ausgangskonzentration und Fragmentlänge mit der DNA-Konzentration, Reinheit und Fragmentlänge nach Amplifikation

Fall	Gewebe	DNA-Ausgangskonzentration (ng/µl)	Fragmentlänge vor Amplifikation	DNA-Konzentration nach Amplifikation	Ratio-Werte OD260: OD280 nach Amplifikation	Fragmentlänge nach Amplifikation
O-515/88	Niere	20,0	100-1100bp	1144,2	1,47	>1500bp
	Trachea	190,0	100-1100bp	1059,2	1,45	>1500bp
O-643/88	Niere	200,0	200-1200bp	895,2	1,58	>1500bp
O-944/91	Lunge	320,0	100-600bp	1170,9	1,40	>1500bp
O-1362/95	Niere	130,0	200-700bp	1172,8	1,43	>1500bp
306/03	Blut	100,0	>1500bp	1062,4	1,45	>1500bp
V-1738/94	fetales Gewebe	6,1	200-700bp	906,9	1,27	>1500bp
V-2307/01	Zotten III	762,0	>1500bp	987,6	1,33	>1500bp

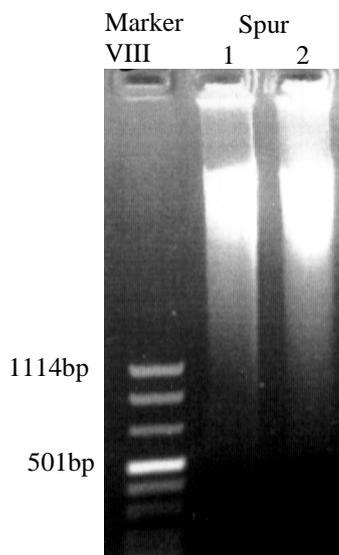


Abbildung 17:

O-515/88: 2%iges Agarosegel mit DNA nach universeller Amplifikation mittels „GenomiPhi DNA Amplification Kit“ von Amersham Biosciences. In die Amplifikationsreaktion wurden jeweils 10ng Template-DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben eingesetzt. Spur 1 Niere; Spur 2 Trachea.

Beim Vergleich der beiden Methoden zur universellen DNA-Vermehrung nach DOP-PCR (Fa. ROCHE) bzw. GenomiPhi (Fa. Amersham Biosciences) erwies sich die Amplifikation der DNA mittels GenomiPhi-Methode bezüglich Quantität und Qualität als effektiver. Bei der DOP-PCR wurde die DNA mit jeder weiteren PCR zunehmend fragmentiert und lag letztlich im Bereich von 100-300bp. Für eine homogene Hybridisierung bei einer CGH-Analyse sind jedoch Fragmentlängen ab 300bp bis

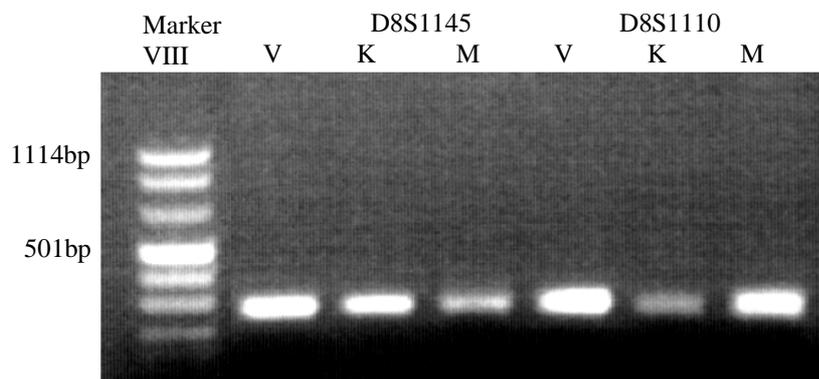
mindestens 800bp erforderlich. Die Fragmentlänge der DNA nach GenomiPhi betrug jedoch in allen Versuchen über 1500bp.

4.2.3 Mikrosatellitentypisierung

An insgesamt 10 Fällen wurde eine Mikrosatellitentypisierung mit chromosomenspezifischen Primern durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.6.1). Die Amplifikation erfolgte mittels AmpliTaq® Polymerase (Applied Biosystems). Die Erfolgsrate mit diesem System lag bei ca. 90%. Die PCR-Produkte wurden hinsichtlich ihrer Größen und Quantität über ein 2%iges Agarosegel überprüft. Sichtbar wurden hierbei Fragmente definierter Größe. In Abbildung 18 wird dies exemplarisch für den Fall 118/01 veranschaulicht.

Abbildung 18:

Fall 118/01: 2%iges Agarosegel mit PCR-Produkten von Chromosom 8-spezifischen Primern D8S1145 und D8S1110 (V=Vater; K=Kind; M=Mutter)



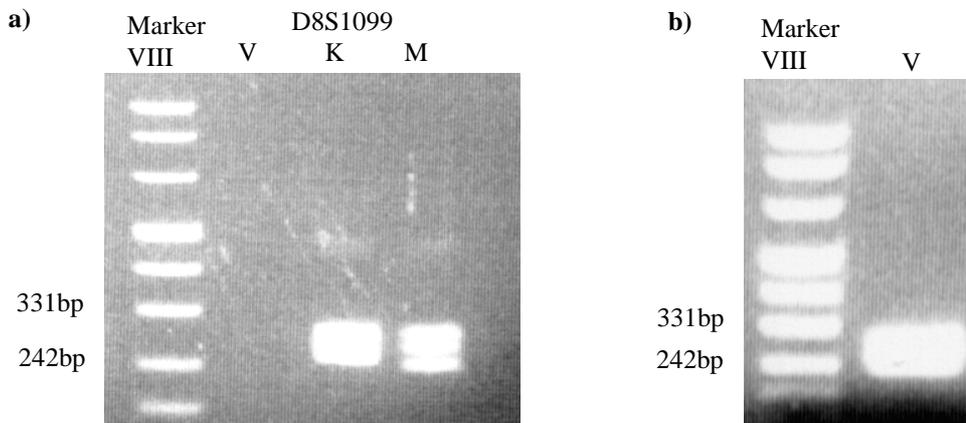
In 10% der Fälle konnte keine DNA mit der AmpliTaq® Polymerase amplifiziert werden. Ursächlich hierfür dürfte degradierte und zum Teil hochvernetztes Template-DNA sein. Demzufolge wurde die DNA in ein optimiertes und mit einem Enhancer ausgestattetes PCR-System (CombiPol DNA-Polymerase, Fa. Invitex) eingesetzt. In Variation mit Veränderungen der eingesetzten DNA-Menge und längeren Annealing- und Extensionszeiten (siehe Kapitel 3.4.6.2) während der PCR-Zyklen konnten Verbesserungen erreicht werden. In Abbildung 19 ist die Amplifikation des Primers D8S1099 von Fall 118/02 mit den PCR-Systemen AmpliTaq® und CombiPol DNA Polymerase gegenübergestellt.

Abbildung 19:

Fall 118/02: 2%iges Agarosegel mit PCR-Produkten für den Locus D8S1099

a) AmpliTaq®-Polymerase: spezifische Amplifikation bei Kind und Mutter; keine Amplifikation beim Vater.

b) CombiPol DNA Polymerase: Amplifikation nach Wiederholung der PCR mit väterlicher DNA



Der Vergleich der beiden Methoden zur spezifischen DNA-Vermehrung zeigte, dass aufgrund des im Kit enthaltenen Enhancers und verbesserter DNA-Polymerase-Aktivität Amplifikationen auch bei unzureichender DNA-Qualität zu verzeichnen waren.

4.3 Korrelation zwischen Formalinfixierung und DNA-Qualität

Wie die Ergebnisse der CGH-Analysen zeigten, ist die Grundvoraussetzung für eine CGH-Analyse zur Abklärung chromosomaler Imbalancen eine DNA mit einer Mindestgröße von mindestens 200 bis >1200bp. Nach Markierung der DNA über Nicktranslation kann in diesen Fällen ein homogenes, nicht granuläres Hybridisierungsmuster erzielt werden (Abb. 20).

In insgesamt 42 Fällen konnte ein Ergebnis über CGH erzielt werden. In 9/42 Fällen (21,4%) lag frisches bzw. nativ eingefrorenes Gewebe vor. In allen Fällen konnte DNA mit im Optimum liegender Qualität (300->1200bp) isoliert werden.

In 33 der 42 Fälle (78,6%) lag DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben vor.

In 26/33 Fällen (78,8%) konnte DNA im Optimum (200->1200bp) isoliert werden. In 7/33 Fällen (21,2%) war die DNA mit Fragmentlängen von 200-700bp leicht degradiert.

In 9/33 Fällen (17,6%) konnte kein aussagekräftiges Ergebnis über CGH erzielt werden.

3 der 9 Fälle (33,3%) wiesen leicht degradierte DNA (200-700bp) und 6 Fälle (66,7%) stark degradierte DNA (150-500bp) auf. Einen Überblick über die Korrelation zwischen DNA-Fragmentgröße und CGH-Erfolg aller analysierten Fälle gibt die Abbildung 21.

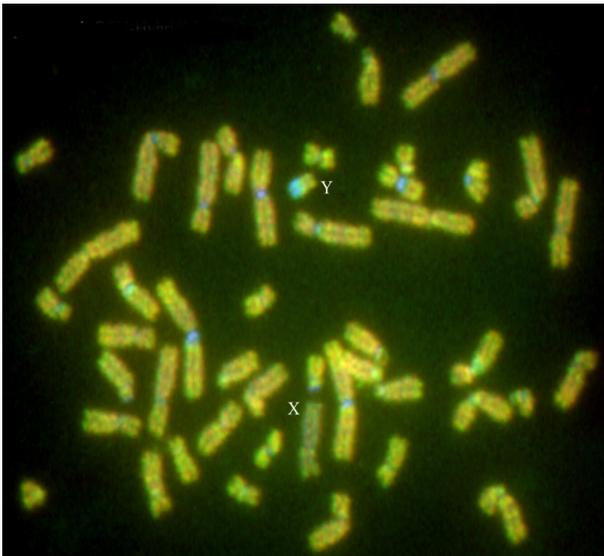
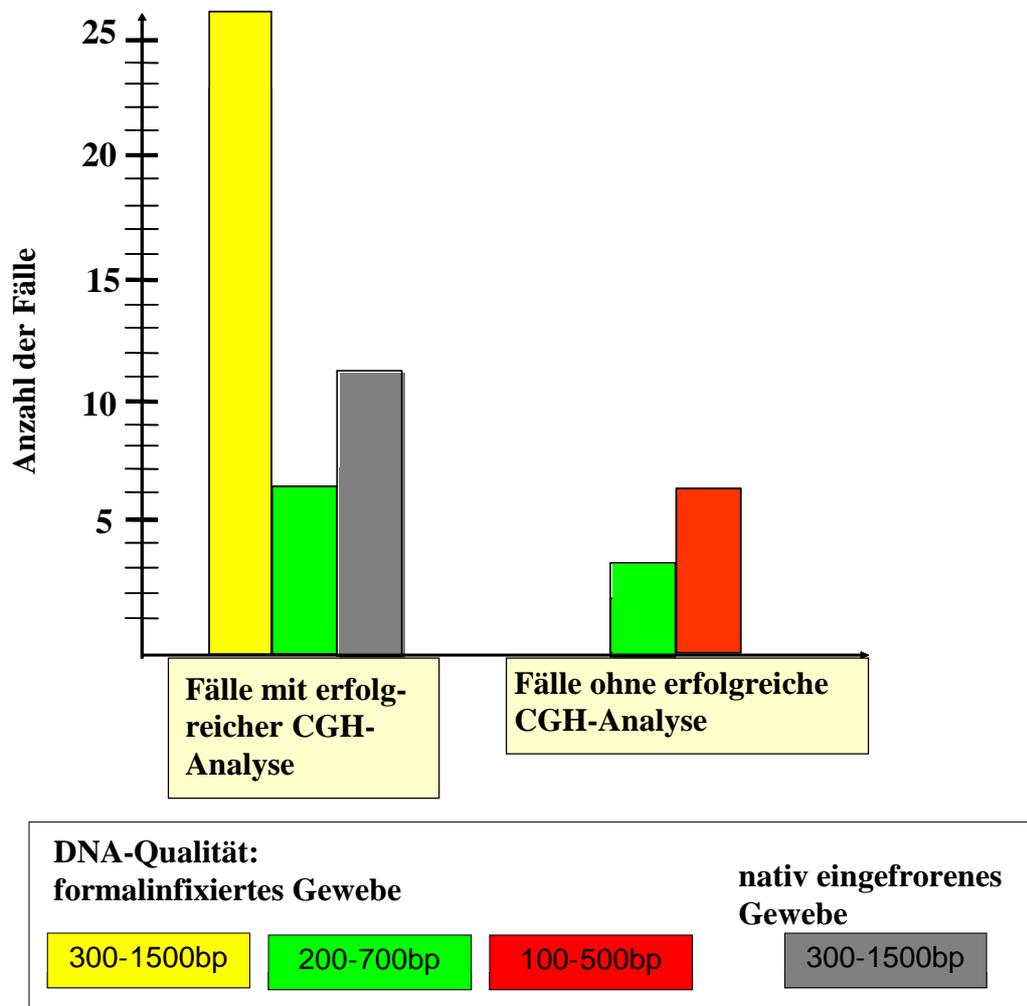


Abbildung 20:
 O-684/89: Metaphase nach CGH; DNA-Fragmentlänge nach Nicktranslation betrug 150-1100bp; Hybridisierung zeigt homogenes Muster; Kennzeichnung der Geschlechtschromosomen.

Abbildung 21:
 Korrelation zwischen erfolgreicher CGH-Analyse und Größe der isolierten DNA-Fragmente



Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen Formalinfixierungsdauer und der DNA-Fragmentgröße in Kombination mit vorangegangener Mazeration / Autolyse des zu testenden Gewebes untersucht. Der Autolysegrad wurde in folgende 4 Klassen unterteilt:

Ø I: Mazeration der Haut

§ Ia: beginnende Mazeration der Haut

§ Ib: fortgeschrittene Mazeration der Haut

Ø II: Autolyse der inneren Organe

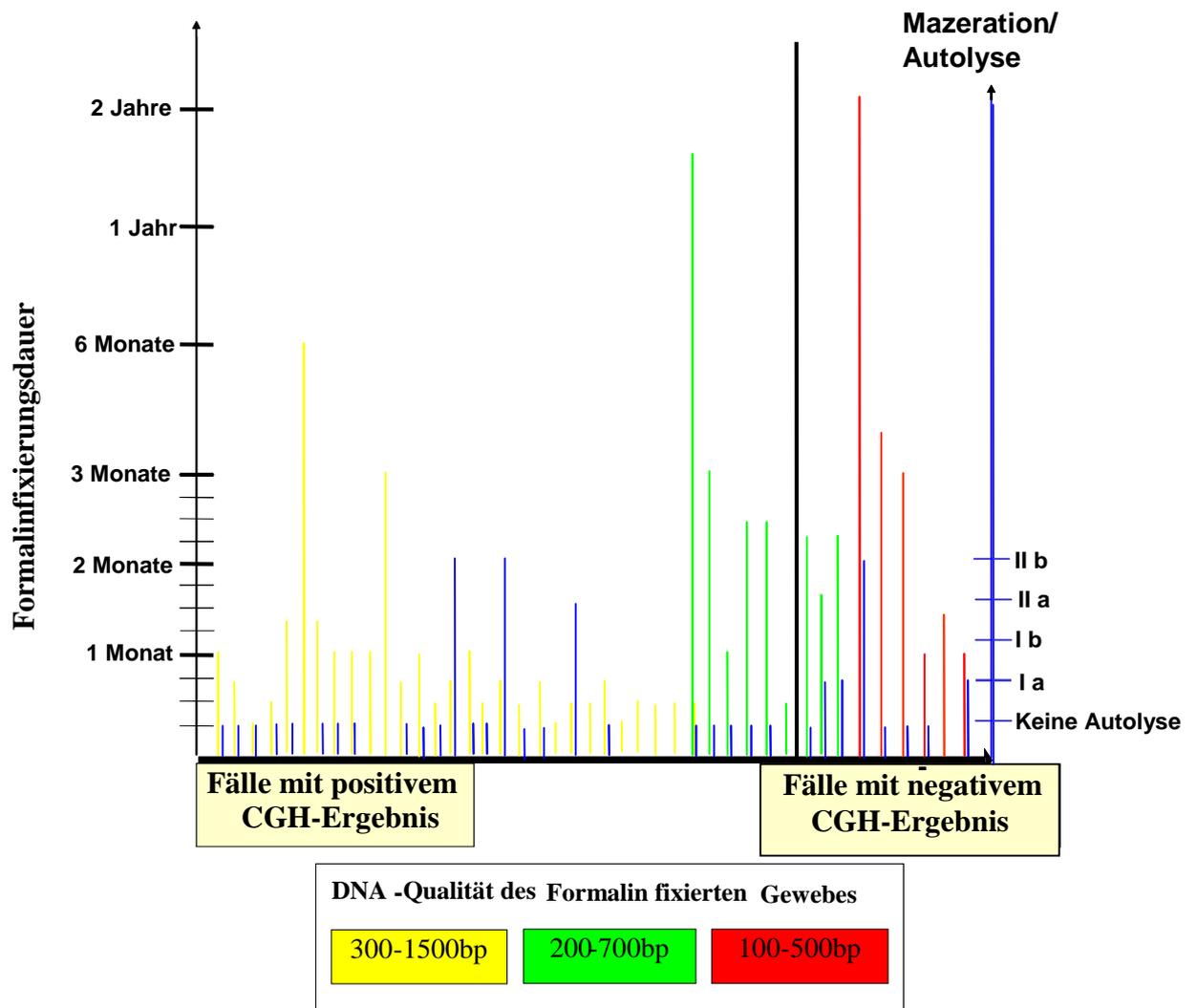
§ IIa: beginnende Autolyse der inneren Organe

§ IIb: fortgeschrittene Autolyse der inneren Organe

Es konnte eine stark positive Korrelation zwischen Dauer der Formalinfixierung und der Degradierung der DNA nachgewiesen werden. Vorangegangene autolytische Prozesse der Feten bzw. des Abortmaterials zeigten jedoch keine direkte Korrelation zur Qualität einer CGH-Analyse (vgl. Abb. 22).

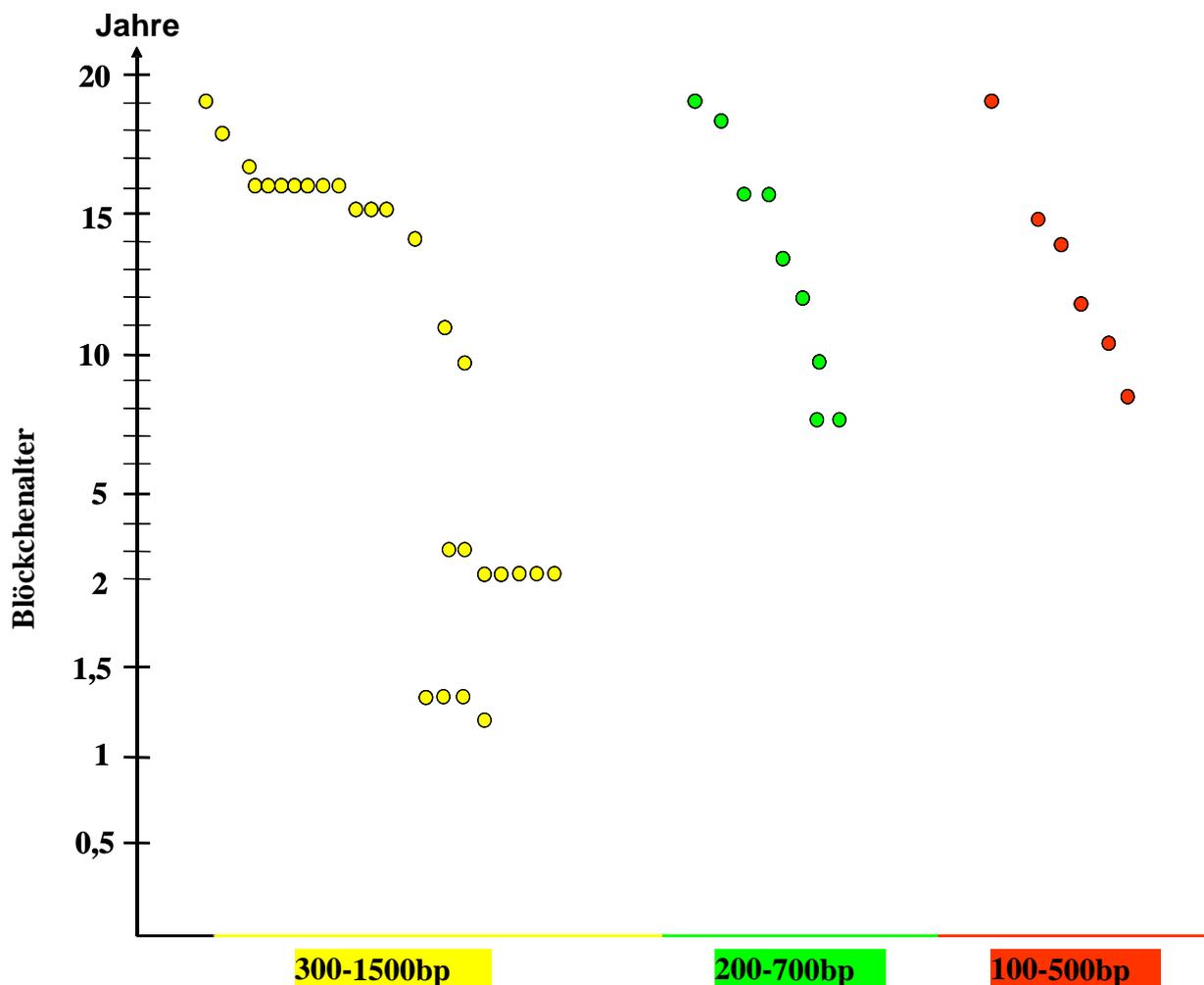
So zeigten insgesamt 5 Fälle ohne beschriebene Autolyse und qualitativ guter Ausgangs-DNA diskrepante CGH-Ergebnisse zu den cytogenetischen Vorbefunden (O-317/87, O-542/88, O-633/88, O-684/89, O-875/90). Andererseits konnte in 4 Fällen mit beschriebener beginnender und fortgeschrittener Autolyse der inneren Organe hochwertige DNA gewonnen werden, so dass ein eindeutiges CGH-Ergebnis erzielt werden konnte (O-1154/93, O-1949/02, O-2017/02, S-41/02). Eine eindeutige Korrelation zwischen Autolyse des Feten und DNA-Zustand lag nur in insgesamt 4 Fällen vor (O-114/85, O-1362/95, O-1475/96, O-1485/96).

Abbildung 22:
 Korrelation zwischen Formalinfixierungsdauer und DNA-Fragmentgröße und Mazeration /
 Autolyse fetalen Gewebes



Dagegen schien die Lagerungsdauer der Gewebe in Paraffin („Blöckchenalter“) keinen entscheidenden Einfluss auf die Struktur der DNA-Moleküle und somit auf die Qualität der nachfolgenden Untersuchungen zu haben (Abb. 23).

Abbildung 23:
Korrelation zwischen Lagerungsdauer des Gewebes in Paraffin (Paraffinblöckchen) und DNA-Qualität. Die Kreise geben die einzelnen Fälle entsprechend ihrer DNA-Fragmentgröße wieder.



4.4 Comparative Genomhybridisierung (CGH)

An insgesamt 51 Fällen wurde eine CGH-Analyse nach Markierung über Nicktranslation durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2.1). Die Qualität der Nicktranslations-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass nach Nicktranslation eine Verkürzung der DNA-Fragmente um durchschnittlich 400bp stattfand. Zudem bestand eine Korrelation der Fragmentgrößen nach Nicktranslation mit der Degradierung der Ausgangs-DNA (Tab. 41).

In Abbildung 24 ist DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe und DNA aus gefrorenem Gewebe nach Nicktranslation dargestellt. Die Spuren 1, 2 und

4 zeigen eine hochgradig degradierte DNA mit Fragmentlängen von 50-500bp, während die Spur 3 weniger stark degradierte Fragmentlängen im Bereich von 50-1000bp aufwies. Die Spuren 5 und 6 aus nativ gefrorenem Gewebe hingegen zeigen eine homogenen „DNA-Schmier“ von 50->1000bp. Ein vergleichbares Bild ergibt sich für die Texas-Red markierte Referenz-DNA, die aus Vollblut gewonnen wurde (Spuren 7-9). Die DNA-Fragmente lagen in einem Größenbereich von 200- >1100bp.

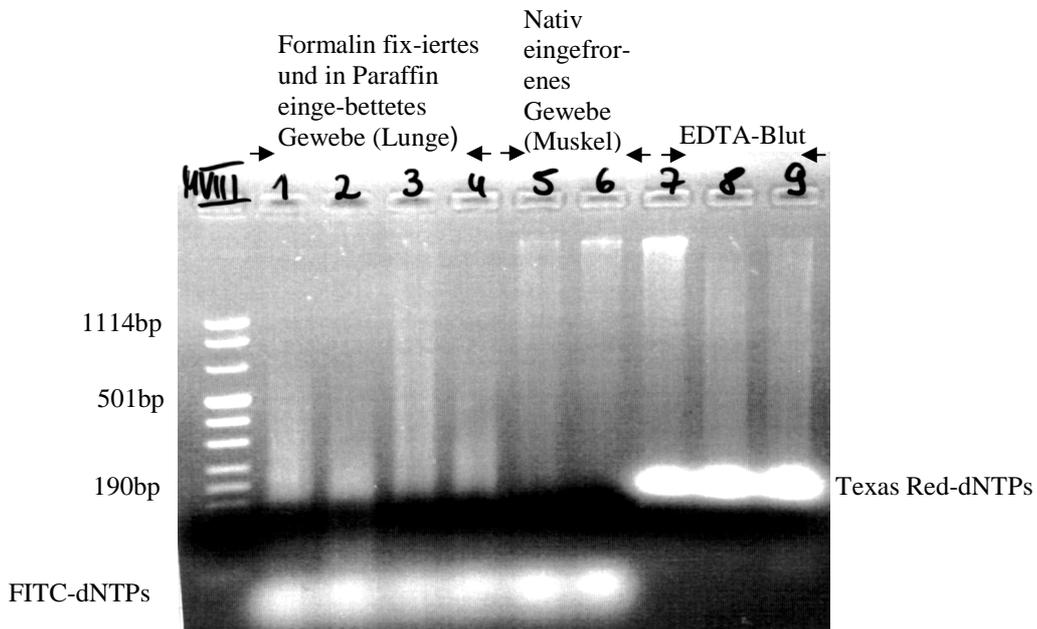
Tabelle 41:

Fragmentgröße der DNA nach Nicktranslation (DNA aus Formalin fixiertem Gewebe■; DNA aus gefrorenem Gewebe■)

Fall	Gewebe	Fragmentgröße der Ausgangs-DNA in bp	Fragmentgröße der DNA nach Nicktranslation in bp
O-212/86	Niere	200-800	100-500
O-236/86	Niere	100-1000	100-400
O-542/88	Lunge	200-1500	100-900
O-1154/93	Lunge	300-1200	100-500
O-1919/01	Muskel	300-1500	200->1100
	Zotten	300-1500	200->1100

Abbildung 24:

DNA-Fragmentgröße nach Nicktranslation: Spuren 1-4: DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe; Spuren 5 und 6: DNA aus gefrorenem Gewebe; Spuren 7-9: Referenz-DNA aus Vollblut.



In 33 der mit CGH analysierten 51 Fälle lag DNA aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe vor. In insgesamt 9 Fällen (17,6%) konnte kein Ergebnis über CGH erzielt werden. Der Prozess der Formalinfixierung konnte als Ursache für bereits degradierte DNA festgestellt werden. Zudem wurde die DNA aufgrund der methodisch in der Nicktranslation bedingten Strangbrüche weiter fragmentiert.

In 42 Fällen (82,4%) konnte, sowohl an DNA aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe als auch an nativem/gefrorenem Gewebe, mittels CGH über Nicktranslation ein Ergebnis erzielt werden. In 29 dieser Fälle lagen cytogenetische Vorbefunde entweder nach Pränataldiagnostik vor oder an Abortmaterial erhoben. In 11/29 Fällen (38%) konnte der cytogenetische Vorbefund bestätigt und in 6/29 Fällen (20,7%) präzisiert werden. In 3 Fällen (10,3%) ergaben sich nach CGH abweichende Bruchpunkte. In 9 Fällen (31%) konnte der cytogenetische Vorbefund allerdings nicht bestätigt werden (vgl. Kap. 4.4.1).

In 13 Fällen lag kein cytogenetischer Befund vor. In 5 Fällen (38,5%) konnte ein pathologisches Ergebnis und in 8 Fällen (61,5%) ein unauffälliger Befund ermittelt werden.

In insgesamt 10 der mit CGH positiv getesteten Fälle wurden Zusatzuntersuchungen wie Mikrosatellitenanalyse und FISH mit diversen Sonden zur Befundbestätigung- und präzisierung durchgeführt. Dabei konnte in 2 Fällen nach pathologischem Histologiebefund des Abortmaterials und normalem CGH-Befund eine Triploidie als Abortursache gesichert werden.

In insgesamt 5 Fällen wurde eine CGH-Analyse nach Amplifikation und Markierung der DNA über DOP-PCR durchgeführt. In 3/5 Fällen ergab die CGH-Analyse einen unauffälligen Befund (60%). In 2/5 Fällen (40%) erbrachte die CGH-Analyse kein auswertbares Ergebnis.

In insgesamt 7 Fällen wurde die DNA mittels GenomiPhi-Vermehrung universell amplifiziert und anschließend über Nicktranslation markiert. In 4/7 Fällen (57,2%) konnte ein Ergebnis mittels CGH erzielt werden (43%). In 3/7 Fällen (42,8%) konnte die genomische DNA zwar amplifiziert werden, das Hybridisierungsmuster nach Nicktranslation zeigte jedoch inhomogene Signale, so dass eine Auswertung mittels digitaler Bildanalyse nicht möglich war. Tabelle 42 gibt die Zusammenstellung der einzelnen Ergebnisse wieder.

Tabelle 42:

Auflistung aller Fälle mit CGH-Analyse nach Nicktranslation, DOP-PCR und GenomiPhi Amplifikation.

	Anzahl Fälle (n)	CGH erfolgreich	normaler Befund	auffälliger Befund	kein CGH-Ergebnis
CGH nach Nicktranslation	52	42	22	20	9
CGH nach DOP-PCR	5	3	3	-	2
CGH nach GenomiPhi	7	4	1	3	3

4.4.1 Fälle mit unauffälligem CGH-Ergebnis

In 22 von 42 Fällen (52,4%) mit einem Ergebnis nach CGH ergab die Analyse einen unauffälligen Befund (Tab. 43, Tabelle A im Anhang). Alle 8 Fälle ohne cytogenetische Vorbefunde (34,8%) wiesen einen Phänotyp auf, der auf eine chromosomale Grunderkrankung schliessen ließ (siehe z.B. Fallbeschreibungen O-1980/02 Kap. 4.4.1.1 und O-2017/02 Kap. 4.4.1.2). In 2 weiteren Fällen konnte durch Mikrosatellitenanalyse eine Triploidie nachgewiesen werden, die durch eine CGH unerkant blieb (Fall O-2065/03, Fall V-2317/01 in Kap. 4.4.1.3). In insgesamt 14 von 22 Fällen (63,6%) lag ein cytogenetischer Vorbefund vor. In 5 Fällen ergab die Chromosomenanalyse einen unauffälligen Karyotyp. Die fetalpathologische Untersuchung zeigte jedoch klinische Auffälligkeiten auf, die eine Chromosomenaberration als Ursache nahe legte. In diesen Fällen konnte jedoch über die retrospektive CGH-Analyse keine chromosomale Veränderung nachgewiesen werden, so dass der cytogenetische Vorbefund, der pränatal an Amnionzellen bzw. Chorionzotten erhoben wurde, bestätigt werden konnte.

Weitere 3 Fälle wiesen einen Karyotyp mit einem zusätzlichen Markerchromosom auf, wobei in 2/3 Fällen das Markerchromosom in Mosaikform auftrat. Nähere Angaben über die Größe oder das Mosaiklevel der überzähligen Markerchromosomen lagen nicht vor.

In 3 weiteren Fällen lag eine Chromosomenaberration in Form eines Ringchromosoms vor. In einem Fall wies das Ringchromosom einen Mosaikstatus auf. In 2 der 3 Fälle waren Bruchpunkte angegeben, wobei diese in einem Fall (O-633/88) terminal an den Chromosomenenden lagen. Im zweiten Fall (O-1485/96) lag dagegen der Bruchpunkt im p-Arm in Centromernähe, während der Bruch distal im langen Arm des Chromosoms erfolgt war. In allen 6 Fällen ergab die CGH ein unauffälliges Ergebnis, so dass die vordiagnostizierten Chromosomenaberrationen nicht bestätigt werden konnten.

In 3 weiteren Fällen lagen unterschiedliche chromosomale Aberrationen vor. In zwei Fällen (O-665/89, V-1738/94) lag eine unbalancierte Translokation vor. Im Fall O-1896/01 war in der Chorionzotten-Kurzzeitkultur ein zusätzliches Chromosom in der Größe eines D-Gruppenchromosoms in 36% der analysierten Mitosen gefunden worden, während der Karyotyp nach Langzeitkultur unauffällig war. In allen 3 Fällen ergab die CGH-Analyse ein unauffälliges Ergebnis (siehe auch Kap. 5.3.1 und Tab. B im Anhang).

Die Rate für falsch negative Ergebnisse in 9 von 14 Fällen mit strukturellen Auffälligkeiten lag nach CGH bei 64,3%. Dies ließ sich durch die hohe Anzahl von Marker- und Ringchromosomen begründen (vgl. Kap. 5.3).

Tabelle 43:

Unauffälliges CGH-Ergebnis: Tabellarische Übersicht über die Fälle (AB=cytogenetischer Vorbefund an Abortmaterial erstellt; KZ=Kurzzeitkultur; LZ=Langzeitkultur)

Anzahl (n)	ohne Vor-diagnostik	mit Vor-diagnostik	Unauffälliger Vorbefund	Marker-chromosomen	Ringchromosomen	Strukturelle und andere Aberrationen
22	8	14	5	3	3	3
	O-518/88 O-574/88 O-1980/02 O-2022/03 O-2065/03 S-145/03 V-2317/01 V-2381/03		O-943/91: 46,XX O-1842/00: 46,XX O-1949/02: 46,XY O-2017/02: 46,XX (AB) V-2351/02: 46,XX (AB)	O-101/85: 47,XX,+mar O-317/87: 46,XY/47,XY,+mar O-875/90: 46,XX/47,XX,+mar	O-542/88: 46,XX/46,XX,r(19) O-633/88: 46,XY,r(14)(p12q32) O-1485/96: 46,XY,r(18)(p11q23)/45,XY,-18	O-665/89: 46,XX,-21,+t(13;21)(pter->q13::21.2->qter) O-1896/01: 46,XY[9]/47,XY,+D(KZ); 46,XY (LZ) V-1738/94: 46,XX,der(7)t(7;?14) (AB)

Um die hohe Quote der falsch negativen Ergebnisse zu erklären, sowie Möglichkeiten und Grenzen der CGH-Analyse darzustellen, werden in den folgenden Kapiteln einzelne Fallbeispiele dargestellt. In allen bearbeiteten Fällen wurde dieselbe männliche Referenz-DNA über Nicktranslation mit Texas-Red markiert nach Mischung (1:1) mit einer Fluorescein-markierten Test-DNA auf Metaphasen eines gesunden männlichen Spenders hybridisiert (3-5 Tage).

4.4.1.1 Bestätigung eines Normalbefundes (O-1980/02)

Bei diesem Fet wurde ein intrauteriner Fruchttod in der rechnerisch 21.SSW festgestellt. Nach Aborteinleitung wurde der Fet fetalpathologisch untersucht. Der Fet wies bereits starke Mazerationserscheinungen auf. Bei der Obduktion wurden neben facialem Dysmorphien (tief sitzende Ohren, weit ausladender Hinterkopf), starke Wachstumsretardierung sowie zahlreiche Fehlbildungen wie Hydrocephalus, rechtsseitige Nierenagenesie und komplexe Herzgefäßfehlbildung festgestellt. Der Herzfehler konnte näher als Ebstein'sche Anomalie charakterisiert werden. Es lag kein cytogenetischer Vorbefund vor.

CGH-Analyse

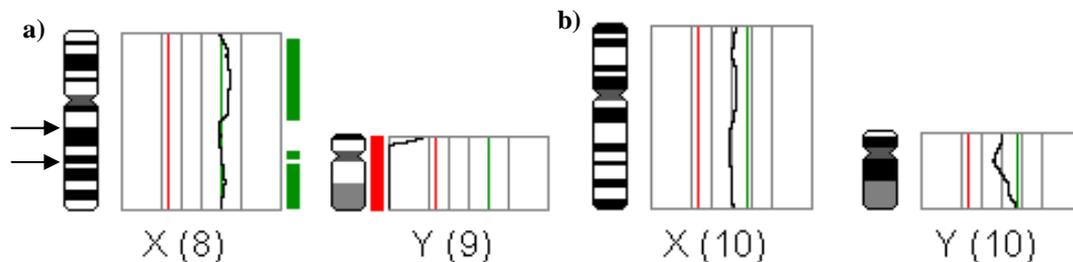
Es wurde DNA mit Fragmentlängen von 200-800bp aus fetalem Lungengewebe isoliert. Die Auswertung der CGH-Analyse erfolgte an 10 Metaphasen. Die Ratioprofile aller Autosomen lagen innerhalb der Grenzwerte mit Ausnahme von Abweichungen der pericentrischen Regionen von Chromosom 9 und 16. Es ergab sich eine weibliche Gonosomenkonstellation. Es wurde jedoch ein Verlust von X-chromosomalen Material im Bereich q13-q22 detektiert (Abb. 25a). Dies könnte auf eine Deletion in diesem Bereich hindeuten. Wahrscheinlicher erschien jedoch ein Hybridisierungsartefakt bedingt durch inhomogene Hybridisierung.

Eine Kontrollhybridisierung mit weiblicher Referenz-DNA ergab unauffällige Ratioprofile für die Gonosomen (Abb. 25b). Die Ratioprofile der Autosomen lagen innerhalb der Grenzwerte. Es ergab sich somit kein Hinweis für eine numerische oder strukturelle Chromosomenaberration als Ursache für die beschriebenen Fehlbildungen.

Die abschließende Karyotypformel lautet: **rev ish XX**.

Abbildung 25 Fall O-1980/02:

Partielles CGH-Profil: Darstellung der Fluoreszenz-Ratioprofile der Gonosomen. a) weibliche Gonosomenkonstellation mit Unterrepräsentation fetaler DNA im Bereich der Chromosomenbande Xq13-q22. b) Kontrollhybridisierung: unauffällige weibliche Gonosomenkonstellation bei Hybridisierung weiblicher Referenz-DNA gegen weibliche Test-DNA.



4.4.1.2 Bestätigung eines Normalbefundes (O-2017/02)

In diesem Fall handelte es sich um einen Abort aus der 15.SSW, bei dem eine fetalpathologische Untersuchung aufgrund des syndromalen Erscheinungsbildes des Feten veranlasst wurde. Der weibliche Fetus wies bereits beginnende Mazerationserscheinungen der Haut und beginnende Autolyse der inneren Organe insbesondere von Leber und Gehirn auf. Dies spricht für einen bereits intrauterin stattgefundenen Fruchttod. Neben facialen Dysmorphien (Brachycephalie, Protrusio bulbi beidseits, leichte Retrognathie, kleine tiefsitzende Ohrmuscheln) zeigte der Fetus Vierfingerfurchen beider Hände, Sandalenfurchen beider Füße, Hypoplasie einer Nabelarterie sowie einen komplexen Herzfehler in Form eines persistierenden gemeinsamen AV-Kanals.

Cytogenetischer Befund

Zur Abklärung der Abortursache wurden zunächst fetale Zotten kultiviert. Die anschließende Chromosomenanalyse ergab einen unauffälligen weiblichen Karyotyp. Bei Kultivierung von Abortzotten kann jedoch bei einem weiblichen fetalen Karyotyp eine Kontamination mit mütterlichen Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da sich aus dem Obduktionsbefund ein starker Verdacht auf ein fetales Down-Syndrom ergab, wurde zum Ausschluss eines kryptischen Rearrangements mit Beteiligung der ‚Down critical region‘, die auf dem langen Arm von Chromosom 21 in 21q22.13-q22.2 lokalisiert, eine FISH-Analyse durchgeführt. Als DNA-Sonden wurden die Loci D21S259, D21S341 und D21S342 (LSI 21-Sonde, Fa. Vysis) verwendet. In allen 20 analysierten Metaphasen und in 50 Interphasekernen ließen sich stets 2 regelrechte Signale nachweisen [46,XX. ish 21 (D21S259/D21S341/D21S342x2)], (Abb. 26a).

CGH-Analyse

Zur Erhärtung des unauffälligen cytogenetischen Befundes an fetalen Abortzotten wurde eine CGH mit DNA aus fetalem Lungen- und Nierengewebe durchgeführt. Die DNA wies eine Fragmentlänge zwischen 200-1000bp auf.

Es wurden insgesamt 13 Metaphasen in die Analyse einbezogen. Im heterochromatischen Bereich von Chromosom 16 wurde ein leichter Zugewinn detektiert, welcher jedoch als methodisch bedingter Artefakt interpretiert wurde (vgl. Kap. 5.2.2). Die Ratioprofile aller anderen Autosomen lagen innerhalb der Grenzwerte. Die Gonosomenkonstellation war XX (Abb. 26b).

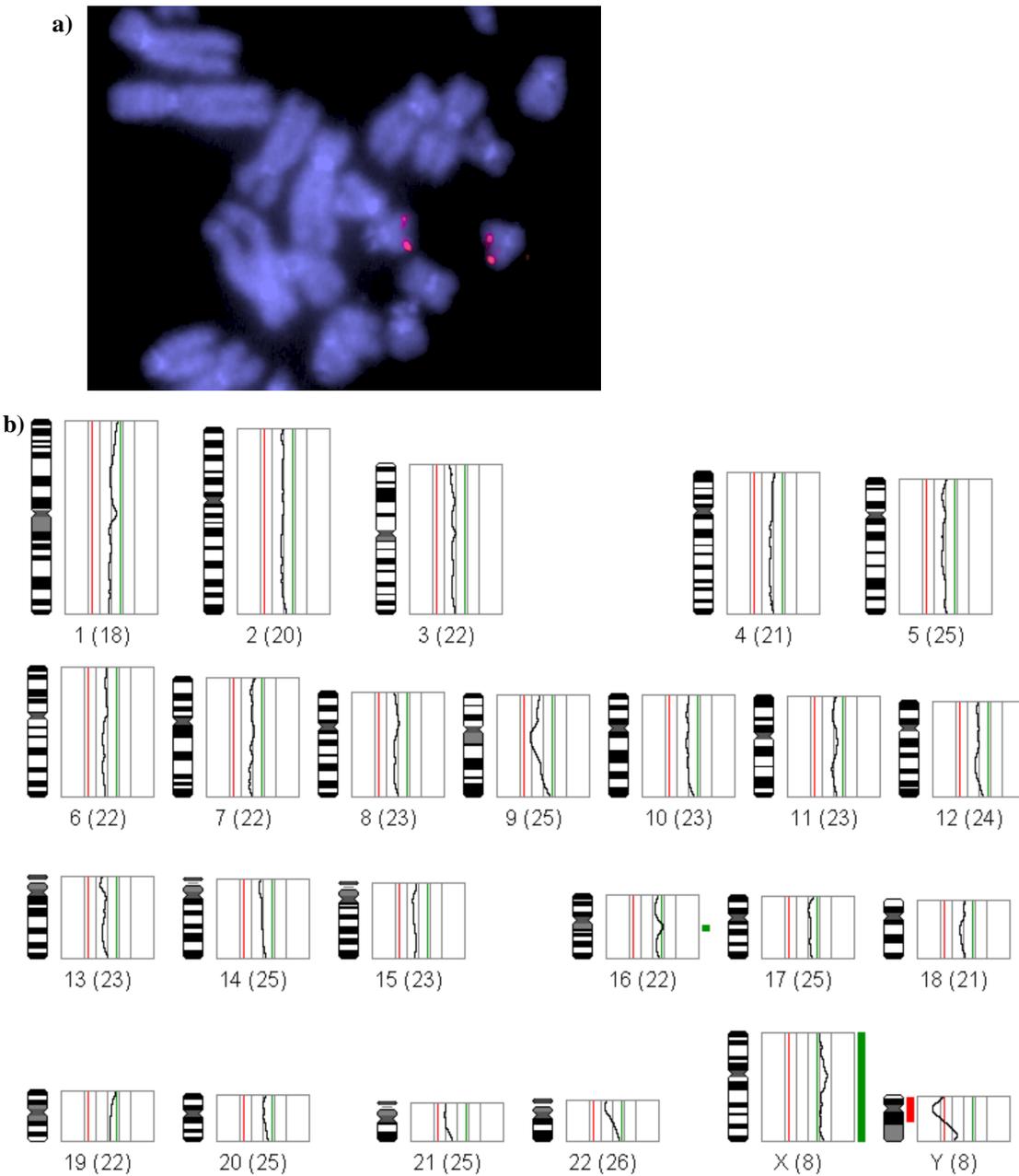
Die Karyotypformel nach ISCN lautet demnach: **rev ish XX**.

Zusammenfassung

Es konnte keine Chromosomenaberration mittels CGH des zu untersuchenden Gewebes nachgewiesen werden. Molekularcytopgenetisch gab es keinen Hinweis für eine Trisomie 21. Somit konnte der post mortem an Abortzotten erhobene unauffällige weibliche Karyotyp bestätigt werden.

Abbildung 26 Fall O-2017/02:

a) FISH mit LSI-Sonde für die Down-kritische Region (Loci D21S259, D21S341 und D21S342; rote Markierung); 2 regelrechte Signale auf den beiden homologen Chromosomen 21. b) CGH-Profil mit weiblicher Gonosomenkonstellation ohne Hinweis auf eine Trisomie 21; Ratioprofile aller Autosomen innerhalb der Grenzwerte



4.4.1.3 Falsch negativer Befund bei Vorliegen einer Triploidie (V-2317/01)

CGH-Analyse

Es wurde DNA (200-1200bp) in zwei Ansätzen aus Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Abortzotten isoliert. Die CGH-Analyse ergab keinen Hinweis auf eine unbalancierte Chromosomenaberration. Für alle Autosomen lagen die Fluoreszenz-Ratioprofile innerhalb der Grenzwerte. Das Fluoreszenzmuster für die Geschlechtschromosomen war typisch für einen weiblichen Karyotyp (**rev ish XX**).

Mikrosatellitenanalyse

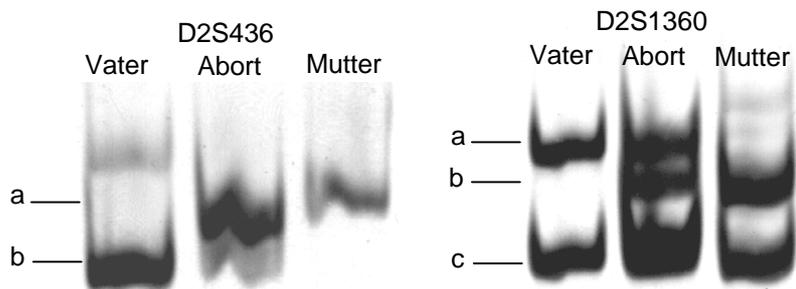
Da histologisch der Verdacht auf eine Triploidie bestand, wurde eine Mikrosatellitentypisierung mittels PCR an DNA des Abortes und der Eltern durchgeführt. Es wurden insgesamt 12 hochpolymorphe Marker der Chromosomen 1, 2, 5, 13, 16 sowie 18 untersucht. Von diesen waren 8 Loci informativ und belegten einen triploiden Chromosomensatz im Abort (Tab. 44, Abb. 27). Mit 3 der getesteten informativen Marker (D1S518, D2S436, D13S317) konnte eine mütterliche Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegten eine Triploidie mütterlichen Ursprungs, die während der mütterlichen Keimzellreifung in Meiose I entstanden ist.

**Tabelle 44 Fall V-2317/01:
Mikrosatellitenanalyse bestätigt Triploidie maternalen Ursprungs.**

Marker/Lokalisation	Vater	Abort	Mutter	Interpretation
D1S534 / 1p13-12	a,c	a,b,c	b,c	3 Allele
D1S518 / 1q24	a,b	b,c,d	c,d	3 Allele, maternal
D1S1660 / 1q31	a,a	a,a,b	a,b	Dosiseffekt
D2S1360 / 2p24	a,c	a,b,c	b,c	3 Allele
D2S436 / 2p11.2-12	b,b	a,a,b	a,a	Dosiseffekt; maternal
D5SNA / 5p15.3	a,c	b,c,c	b,c	Dosiseffekt
D13S317 / 13q21	b,c	a,a,c	a,a	Dosiseffekt; maternal
D16S539 / 16q24	a,a	a,a,b	a,b	Dosiseffekt

Abbildung 27 Fall V-2317/01:

Mikrosatellitenanalyse: Exemplarisch ist die Allelseggregation zweier Repeat-Polymorphismen dargestellt. D2S436 belegt mütterliche Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes im Abort. D2S1360 zeigt 3 Allele und weist auf die Entstehung der Triploidie während der maternalen Meiose I hin (a,b,c stellen Arbeitseinheiten dar).



4.4.2 Fälle mit pathologischem CGH-Profil

In 20 von 42 Fällen (47,6%) konnte ein pathologisches CGH-Profil erstellt werden (Tab. 45). In insgesamt 5/20 Fällen (25,0%) lag kein cytogenetischer Befund vor. In einem Fall konnte eine Deletion detektiert werden [O-506/88 del(13)(q22->qter)]. In 4 Fällen wurden numerische Chromosomenaberrationen nachgewiesen. In einem Fall lag gonosomale Aberration mit einem fetalen Turner-Syndrom vor. In 3 Fällen wurden autosomale Trisomien nachgewiesen (jeweils eine Trisomie für die Chromosomen 3, 13 und 18).

In insgesamt 15/20 Fällen (75,0%) mit einem auffälligen cytogenetischen Vorbefund konnte dieser mit einer CGH-Analyse charakterisiert werden. In 6/15 Fällen (40,0%) konnten die erstellten Vorbefunde bestätigt werden (1xTrisomie 3, 1xTrisomie 21, 2xKlinefelter-Syndrom, eine interstitielle Deletion 9p und eine Duplikation 2p).

In 6/15 Fällen (40,0%) konnte der Vorbefund präzisiert werden. In zwei Fällen mit je einer terminalen und interstitiellen Deletion ergaben sich nach CGH andere Bruchpunkte, so dass die Deletion kleiner erschien als cytogenetisch vordiagnostiziert (siehe Beispiele O-643/88 Kap. 4.4.2.2 und 5.5.2 sowie O-212/86 Kap. 4.4.2.5 und 5.5.3). Im Fall O-1919/01 konnten die Bruchpunkte eines zusätzlichen Markerchromosoms durch eine CGH-Analyse exakt charakterisiert werden (Kap. 4.4.2.6). In einem Fall konnte eine in Placentazotten gefundene partielle Deletion eines X-Chromosoms nicht, jedoch ein 45,X-Karyotyp in kultivierten Amnionzellen bestätigt werden (O-750/89). Im Fall V-1771/95 konnte anhand der CGH-Analyse der Entstehungsmechanismus der vorliegenden Chromosomenstörung näher bestimmt werden (Kap. 4.4.2.4 und 5.5.4).

Aufgrund von divergierenden Bruchpunkten konnten in 3/15 Fällen (20,0%) die cytogenetischen Vorbefunde nicht näher charakterisiert werden. Im Falle eines

Ringchromosoms 18 (O-162/85) zeigte die CGH-Analyse lediglich eine Deletion im langen Arm. Zur Ringbildung musste jedoch auch ein Bruch im kurzen Arm erfolgt sein. Ein Verlust von Material des kurzen Arms war jedoch nicht nachzuweisen. Im Fall O-236/86 lag eine unbalancierte Translokation mit einer partiellen Trisomie 5p13->pter und partiellen Monosomie 22q vor, wobei nach CGH-Analyse nur ein Zugewinn von 5p15.1->pter detektiert werden konnte. Der Verlust von 22q13->qter konnte nicht nachgewiesen werden. Im Fall O-684/89 lag eine partielle Duplikation für 13q22->qter aufgrund einer maternalen paracentrischen Inversion vor. Die CGH-Analyse ergab jedoch einen Zugewinn im Bereich 13q32->qter.

Tabelle 45:

Tabellarische Übersicht über die Fälle mit auffälligem CGH-Ergebnis

(PZ=Placentazotten; AZ=Amnionzellen; AB=cytogenetischer Befund an Abortmaterial erstellt)

Anzahl (n)	ohne Vordiagnostik			mit Vordiagnostik	bestätigt	präzisiert	divergente Bruchpunkte
20	5			15	6	6	3
	strukturell	numerisch					
		gonosomal	autosomal				
	1	1	3				
	O-506/88	O-1154/93	S-41/02 V-2307/01 V-2370/02		O-1035/92: 46,XY,del(9) (p22p23)[80%] /46,XY O-1946/02: 47,XXY (AB) O-2039/03: 47,XXY (AB) O-2051/03: 47,XX,+21 306/03: 46,XY,dup(2) (p13p22) FBK137: 47,XX,+3 (AB)	O-212/86: 46,XY,del(3) (p11p14) O-515/88: 46,XX,r(13)(p12q13/14 (AB) O-643/88: 46,XY,del(4) (q31.3->qter) O-750/89: 46,XX,del(Xq?) in PZ; 45,X in AZ O-1919/01: 46,XX/47,XX,+r(2) V-1771/95: 46,XY,add(2) (AB)	O-162/85: 46,XX,r(18)/45,XX,-18 O-236/86: 46,XY,t(5;22)(p13;q13)pat O-684/89: 46,XY,dup(13)(q22->qter)

4.4.2.1 *Terminale Deletion 13q – Präzisierung eines cytogenetischen Vorbefundes (O-515/88)*

Bei diesem Fall wurde eine Interruptio in der 29.SSW durchgeführt. Zu allgemeiner Hypotrophie wies der Fet multiple Fehlbildungen auf. Neben facialen Dysmorphien (Mikro-Brachycephalie, Epikanthus beidseits, Protrusio bulbi, Makro-Retrogenie, ungewöhnlich große Ohrmuscheln) zeigte er Gelenkkontrakturen, Klumpfußstellung beidseits, lobäre Holoprosencephalie, Aplasie von Gallenblase und Pankreas, anorektale Atresie sowie hypoplastische und mikrozystische Nieren. Die cytogenetische Chromosomenanalyse aus einer Fibroblastenkultur aus kultiviertem Hautgewebe ergab einen weiblichen Karyotyp mit einem Ringchromosom 13 mit partieller Monosomie 13q13/14->qter, wobei der Bruchpunkt im langen Arm nicht vollständig geklärt wurde, so dass der Karyotyp mit [46,XX,r(13)(p12q13/14)] angegeben wurde.

CGH-Analyse

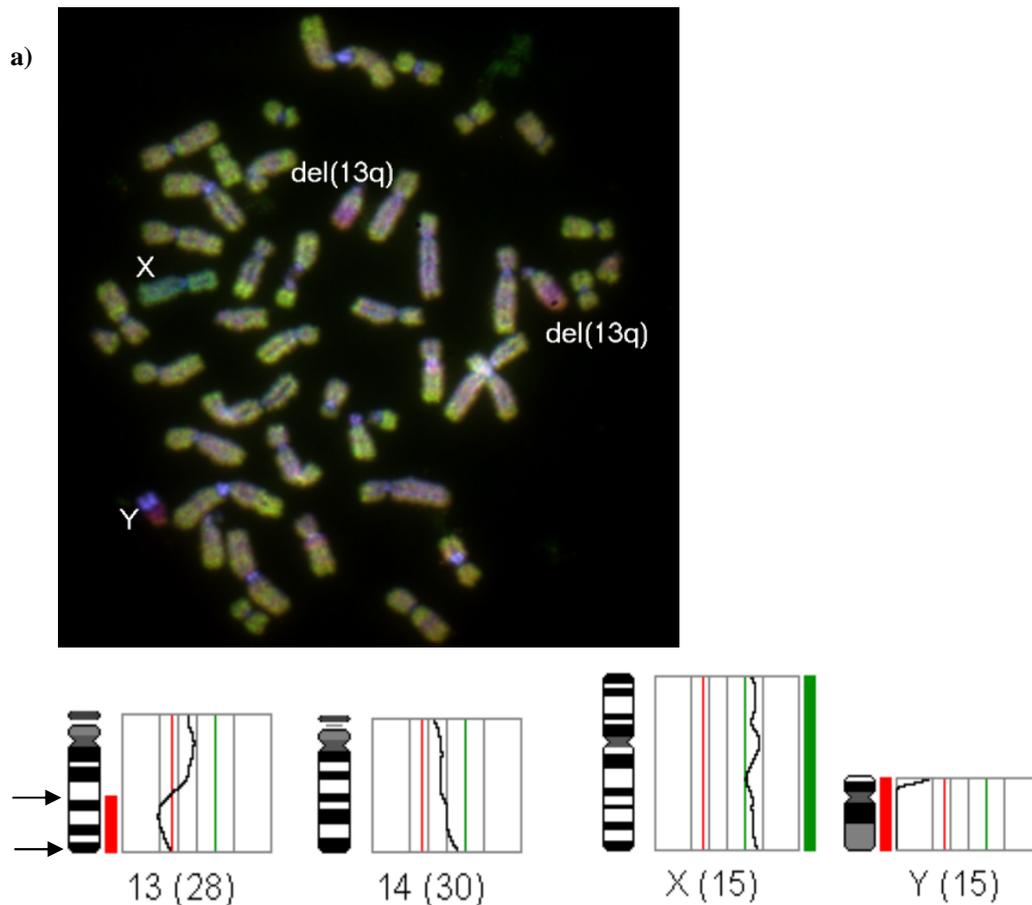
Es wurde DNA (200-1500bp) aus fetalem Nierengewebe isoliert. Das Fluoreszenzmuster für die Geschlechtschromosomen ergab einen weiblichen Karyotyp. Die Auswertung der Fluoreszenz-Ratioprofile der Autosomen für das Chromosom 13 zeigte einen Verlust im Bereich q21->qter. Der Verlust am langen Arm von Chromosom 13 wurde bereits in den Metaphasen sichtbar (vgl. Abb. 28a, b). Für alle anderen Autosomen lagen die Fluoreszenz-Ratioprofile innerhalb der Grenzwerte.

Die Karyotypformel nach ISCN lautet: **rev ish XX, dim(13q21qter)**.

Der Befund multipler schwerer Fehlbildungen des Feten entspricht dem Deletionssyndrom 13q. Die Detektion der Deletion des kurzen Arms bei einem Ringchromosom ist aufgrund der Methodik (Abblockung der repetitiven Sequenzen mit COT1-DNA) nicht möglich. Der an Fibroblasten erhobene Karyotyp konnte jedoch mittels CGH präzisiert und mit 46,XX, del(13)(q21->qter) beschrieben werden.

Abbildung 28 Fall O-515/88:

- a) Metaphase nach CGH: Es zeigt sich eine deutliche Unterrepräsentation (rot) des Chromosoms 13. Gekennzeichnet sind die Gonosomen X und Y sowie das auffällige Chromosom 13.
b) partielles CGH-Profil: Verlust im Bereich 13q21->qter bei weiblicher Gonosomenkonstellation.



4.4.2.2 Terminale Deletion 4q – Präzisierung eines cytogenetischen Vorbefundes (O-643/88)

Die Pränataldiagnostik erfolgte in der 18.SSW aus Altersindikation. Dabei fiel sonografisch eine ausgeprägte Retrognathie und eine mediane Gaumenspalte auf. Die Chromosomenanalyse kultivierter Amnionzellen zeigte eine terminale Deletion am langen Arm von Chromosom 4 [46,XY,del(4q)]. Die fetalpathologische Untersuchung ergab einen leicht hypotrophen, macrocephalen männlichen Fetus mit facialen Dysmorphien (Mikro-Retrogenie, langes prominentes Philtrum, sattelförmig eingesunkene breite Nasenwurzel, hintere Gaumenspalte mit gespaltener Uvula), Cutis laxa im Halsbereich, Gelenkkontrakturen, Wiegenkufenfüße beidseits, Makropenis sowie eine beidseitige inkomplette Lungenlappung.

Die cytogenetische Chromosomenanalyse aus einer Fibroblastenkultur bestätigte den pränatal erhobenen Karyotyp mit einer Deletion am langen Arm von Chromosom 4 [46,XY,del(4)(q31.3->qter)].

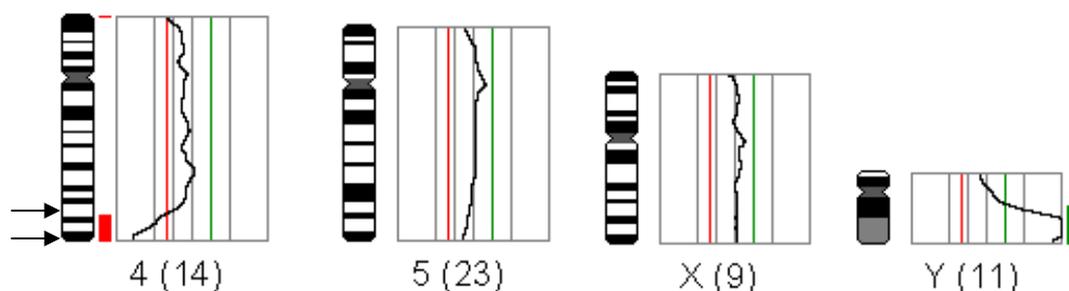
CGH-Analyse

Es konnte qualitativ gute DNA mit Fragmentlängen im Bereich von 200-1200bp aus Lungen- und Nierengewebe isoliert werden. In beiden untersuchten Geweben ergab das Fluoreszenzmuster für die Geschlechtschromosomen einen männlichen Karyotyp. Die Auswertung der Fluoreszenz-Ratioprofile der Autosomen für das Chromosom 4 zeigte einen Verlust im Bereich q32->qter. Die Fluoreszenz-Ratioprofile der anderen Autosomen lagen innerhalb der Grenzwerte (Abb. 29).

Die Karyotypformel nach ISCN lautet: **rev ish XY, dim(4)(q32qter)**.

Abbildung 29 Fall 643/88:

Partielles CGH-Profil der Chromosomen 4 und 5 bei weiblicher Gonosomenkonstellation. Pfeile markieren Ausmaß der terminalen Deletion 4q32->qter



Die beschriebenen Dysmorphien sind mit einem chromosomalen Krankheitsbild vereinbar, wie es pränatal als Deletion 4q diagnostiziert worden war. Der an Fibroblasten erhobene Karyotyp konnte jedoch mittels CGH präzisiert und mit 46,XY, del(4)(q32->qter) beschrieben werden.

4.4.2.3 Nachweis einer Trisomie 18 (S-41/02)

In dieser Schwangerschaft kam es in der rechnerisch 24.SSW zu einem Abort. Die fetalpathologische Untersuchung ergab einen stark hypotrophen (Körpermaße entsprechend der 18.SSW) männlichen Fetus mit deutlichen Mazerationserscheinungen der Haut und Autolyse der inneren Organe, insbesondere des Gehirns. An inneren Fehlbildungen war eine Ösophagusatresie mit ösophagotrachealer Fistel charakteristisch. Die Placenta wies eine ausgeprägte Zottenfibrose auf, was dem Bild einer abgelaufenen Placentitis entsprach. Diese Placentainsuffizienz schien ursächlich für den intrauterinen Fruchttod. Eine Chromosomenanalyse war nicht erfolgt. Aufgrund der beschriebenen Fehlbildungen wurde jedoch eine Chromosomenstörung vermutet.

CGH-Analyse

Es wurde qualitativ gute DNA mit einer Fragmentlänge im Bereich von 200-2000bp aus fetalem Lungen- und Placentagewebe isoliert. Die CGH-Analyse ergab eine männliche

Gonosomenkonstellation. Für das Chromosom 18 konnte ein Zugewinn für das gesamte Chromosom nachgewiesen werden (Abb. 30a). Für alle anderen Autosomen lagen die Fluoreszenz-Ratioprofile innerhalb der Grenzwerte. Somit lag bei dem Feten eine Trisomie 18 vor, die phänotypisch dem Edwards-Syndrom entspricht. Die Trisomie 18 kann als Ursache für die in der fetalpathologischen Untersuchung erhobenen Befunde (Wachstumsretardierung, Ösophagusatresie, ösophago-tracheale Fistel) angesehen werden. Diese Zuordnung wurde durch die CGH-Analyse ermöglicht.

Die Karyotypformel nach CGH lautet: **rev ish XY, enh(18)**.

Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitentypisierung mittels PCR mit spezifischen Primern wurde an DNA des Feten und der Eltern durchgeführt. Es wurden insgesamt 12 hochpolymorphe Marker von Chromosom 18 getestet. Von diesen belegten 8 Loci eine Trisomie 18 über einen Dosisseffekt (Tab. 46). Mit einem der getesteten Marker (D18S862) konnte eine mütterliche Herkunft des überzähligen Chromosoms nachgewiesen werden (Abb. 30b). Das Vorhandensein von 3 Allelen spricht zudem für die Entstehung während der mütterlichen Meiose I.

Abbildung 30 Fall S-41/03:

a) Partielles CGH-Profil: Darstellung der Fluoreszenz-Ratioprofile der Chromosomen 3, 17 und 18 mit Zugewinn am Chromosom 18 bei männlicher Gonosomenkonstellation
b) Mikrosatellitenanalyse zur Bestätigung einer Trisomie 18 mütterlicher Herkunft. Exemplarisch ist die Allelseggregation eines Repeatpolymorphismus (D18S862) dargestellt. In der fetalen DNA waren 3 Allele nachzuweisbar (a,b,c stellen Arbeitseinheiten dar).

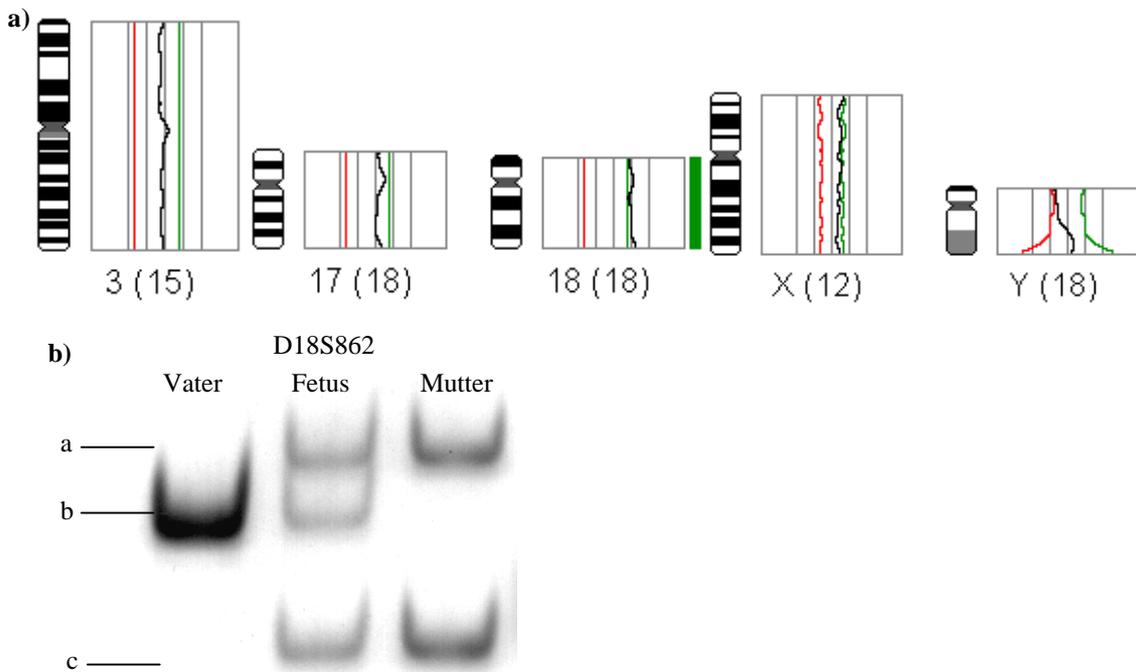


Tabelle 46 Fall S-41/02:**Mikrosatellitenanalyse bestätigt Trisomie 18 maternalen Ursprungs.**

Marker/Lokalisation	Vater	Abort	Mutter	Interpretation
D18S62 / 18p11.32-31	a,b	a,a,c	a,c	Dosiseffekt
D18S71 / 18p11.22	a,b	a,b,b	b,b	Dosiseffekt
D18S843 / 18p11-11.2	a,b	a,a,b	a,b	Dosiseffekt
D18S535 / 18q12	b,c	a,b,b	a,a	Dosiseffekt
D18S877 / 18q12.1	a,c	a,a,b	a,b	Dosiseffekt
D18S858 / 18q21.2	a,a	a,a,b	a,b	Dosiseffekt
D8S862 / 18q21.2	b,b	a,b,c	a,c	3 Allele, maternale Herkunft
D18S878 / 18q21.3	b,c	a,b,c	a,b	3 Allele

4.4.2.4 *Nachweis einer Trisomie 12 (V-1771/95)*

Bei diesem Fall handelte es sich um einen Frühabort aus der rechnerisch 11+1 SSW. Die cytogenetische Analyse aus Abortzotten ergab eine unbalancierte Chromosomenstörung mit einem Derivatvchromosom 22 bei männlichen Karyotyp. Die Herkunft des zusätzlichen Materials konnte nicht näher bestimmt werden. Chromosomenanalysen beider Eltern lagen nicht vor.

CGH-Analyse

Es wurde DNA aus Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem Zottengewebe isoliert. Die CGH-Analyse ergab einen männlichen Karyotyp. Die Auswertung der Fluoreszenz-Ratioprofile für die Autosomen zeigte einen Zugewinn für Chromosom 12, der bereits in der Metaphase durch eine intensive Grünfluoreszenz der homologen Chromosomen 12 auffiel (Abb. 31a). Die statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten sprach für einen Zugewinn für das gesamte Chromosom 12 (Abb. 31b). Für alle anderen Autosomen lagen die Fluoreszenz-Ratioprofile innerhalb der Grenzwerte. Die Karyotypformel nach CGH lautet: **rev ish XY, enh(12)**.

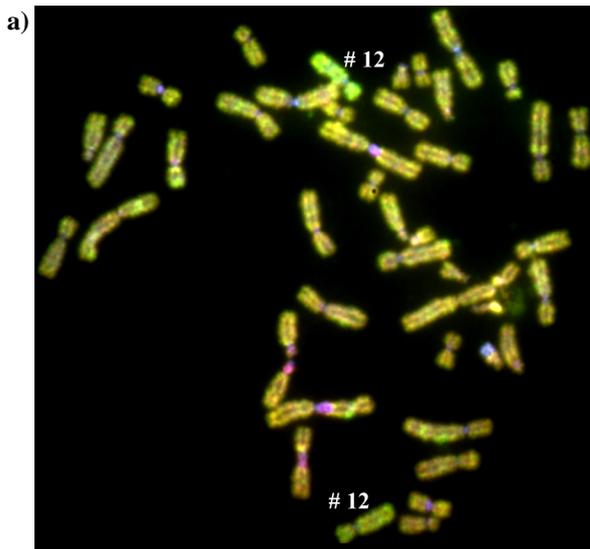
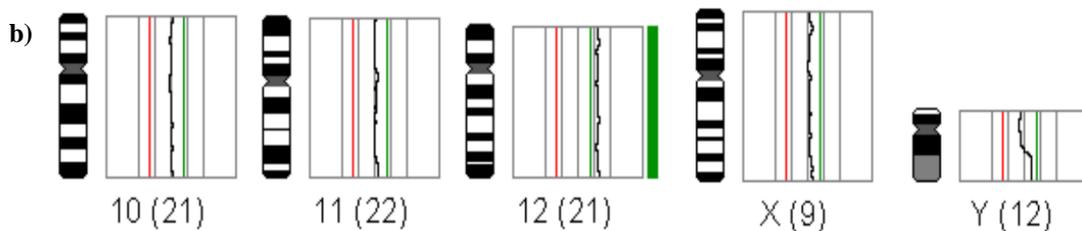


Abbildung 31 Fall V-1771/95:

a) Metaphase nach Hybridisierung auf Metaphasen eines männlichen Spenders. Es zeigt sich eine deutliche Überrepräsentation (grün) des Chromosoms 12.

b) partielles CGH-Profil mit Darstellung der Fluoreszenz-Ratioprofile der Chromosomen 10, 11 und 12 sowie der Gonosomen mit Zugewinn von Chromosom 12 bei männlichem Karyotyp.



Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Zur Überprüfung und Präzisierung der CGH-Ergebnisse wurde eine FISH-Diagnostik an asservierter Chromosomensuspension angeschlossen. Allerdings waren nur wenige Metaphasechromosomen vorhanden, so dass zur Auswertung überwiegend Interphasenuclei herangezogen werden mussten. Zunächst wurde eine Centromersonde spezifisch für die α -Satelliten DNA von Chromosom 12 (D12Z1) verwendet, um die Herkunft des zusätzlichen Materials auf dem Derivatchromosom 22 zu bestätigen. In 5 analysierten Metaphasen konnten 3 Signale nachgewiesen werden, jeweils ein regelrechtes Signal auf den beiden normalen homologen Chromosomen 12 und ein Signal auf dem Derivatchromosom 22 (Abb. 32a). Die Auswertung von 119 Interphasenkernen ergab in 84% drei Chromosom 12-spezifische Signale. Dies spricht für einen Mosaikstatus entsprechend der getesteten Region. Bei der Interphasediagnostik blieb es allerdings ungeklärt, ob es sich bei dem überzähligen Signal um das dicentrische Derivat, wie es in der cytogenetischen Analyse nachgewiesen wurde, oder um ein überzähliges Chromosom 12, das über CGH detektiert wurde, handelte. Daher wurde eine weitere FISH mit einer digoxigeninmarkierten DNA-Sonde, die auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisiert ist (GLI-Gen in 12q13) durchgeführt (Abb. 32c). In 57% der analysierten Zellkerne waren zwei und in 43% drei spezifische Signale vorhanden. Dieser Befund

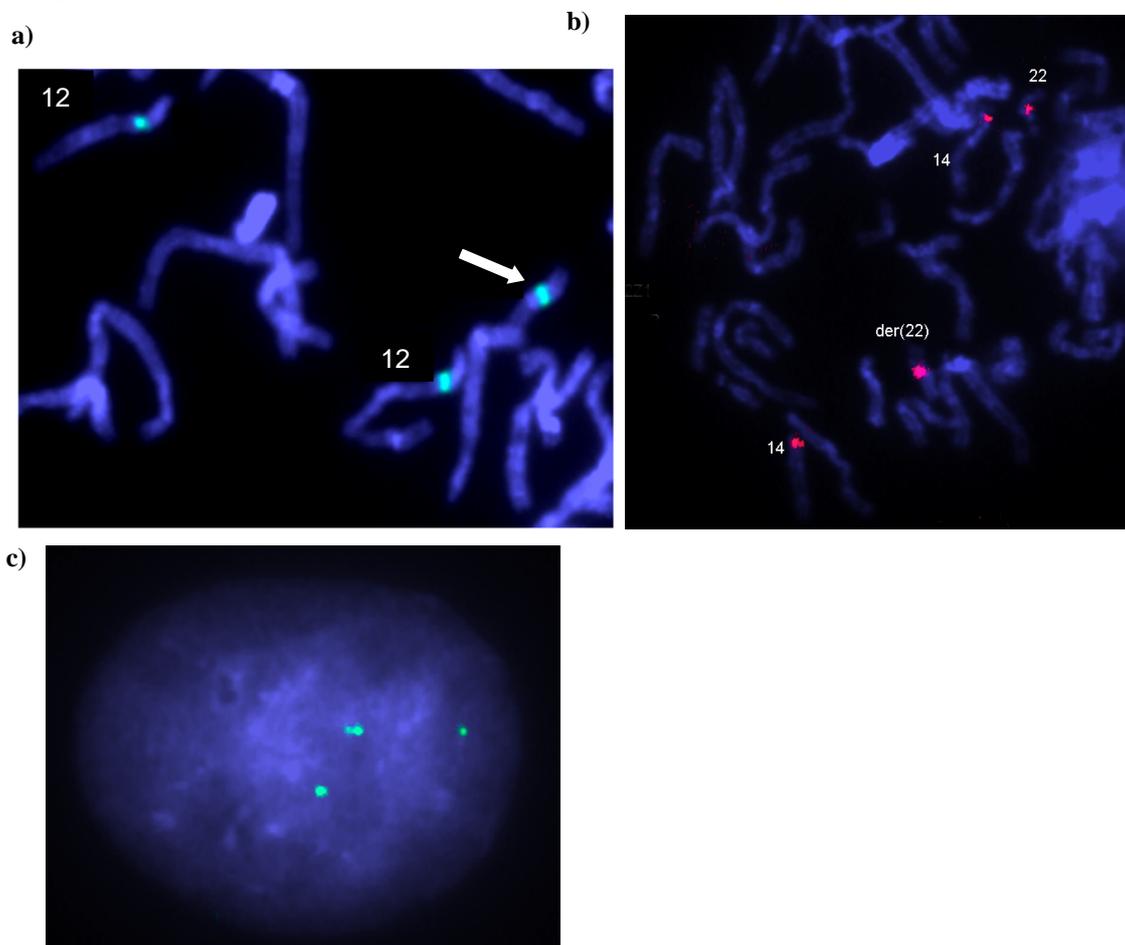
deutet darauf hin, dass zumindest in einem Teil der Zellen eine komplette Trisomie 12 vorlag. Des Weiteren wurde eine FISH-Analyse mit Centromersonden spezifisch für die Centromere der Chromosomen 14/22 durchführt. In 5 analysierten Metaphasen und 35 Interphasekernen konnten jeweils 4 Signale nachgewiesen werden (Abb. 32b).

Unter Verwendung der cytogenetischen und molekularcytogenetischen Analysen lässt sich der Karyotyp wie folgt beschreiben:

46,XY,dic(12;22)(12pter->12q11::22p11.1->22qter). rev ish enh(12). ish der(22)
(D14Z1/D22Z1+,D12Z1+).nuc ish D12Z1x2,GLI3x3,GLI3x2)

Abbildung 32 Fall V-1771/95:

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung: a) Centromer-Sonde für das Chromosom 12 (D12Z1 grün). Sowohl beide normalen homologen Chromosomen 12 als auch das Derivatchromosom 22 (Pfeil) zeigten ein centromerspezifisches grünes Signal. **b) Centromer-Sonden für die Chromosomen 14/22 (D14Z1/D22Z1 rot).** der(22) zeigte eine deutliche Hybridisierung in der Centromerregion als Hinweis für ein dicentrisches Chromosom. **c) LSI Sonde 12q13 (GLI 3 grün).** Interphasekern mit drei spezifischen Signalen



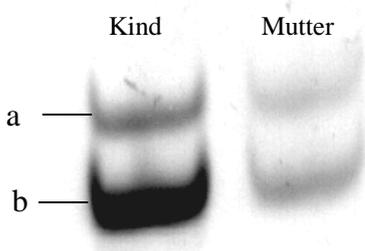
Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitentypisierung mittels PCR mit spezifischen Primern wurde an DNA des Abortes (Zotten) und der Mutter (Dezidua) durchgeführt. Dazu wurde das Schnittpräparat des Abortes zur Trennung der kindlichen und mütterlichen Areale histologisch bewertet. Anschließend wurden mittels einem Skalpell die entsprechenden

Gewebeproben separat voneinander aus dem Paraffinblöckchen herausgeschnitten und getrennt zur DNA-Isolierung überführt. Es wurden insgesamt 17 hochpolymorphe Marker von Chromosom 12 getestet. Von diesen waren 5 Loci semiinformativ mit Hinweis auf eine Trisomie 12 maternaler Herkunft (Tab. 47, Abb. 33).

**Tabelle 47 Fall V-1771/95:
Mikrosatellitenanalyse bestätigt Trisomie für Chromosom 12.**

Marker/Lokalisation	Distanz in cM von 12ptel	Abort	Mutter	Interpretation
D12S372/ 12p13.33	6	a,b,b	a,b	Dosiseffekt
D12S374/ 12p13.31	keine Angaben	a,b,b	a,b	Dosiseffekt
D12S373/ 12p12.3	36	a,a,b	a,b	Dosiseffekt
D12S1042/ 12p12.1	49	a,b,b	a,b	Dosiseffekt
D12S375/ 12q21.1	72	a,a,b	a,a	Dosiseffekt



**Abbildung 33 Fall V-1771/95:
Mikrosatellitenanalyse deutet auf mütterliche Herkunft des überzähligen Chromosoms 12. Der hochpolymorphe Repeatmarker D12S372 zeigte Dosiseffekt für das maternale Allel b (a und b stellen Arbeitseinheiten dar).**

4.4.2.5 Nachweis einer interstitiellen Deletion 3p (O-212/86)

Wegen fortgeschrittenen mütterlichen Alters erfolgte in der 16.SSW eine Pränataldiagnostik. Die Chromosomenanalyse kultivierter Amnionzellen zeigte eine interstitielle Deletion des kurzen Arms von Chromosom 3 [46,XY,del(3)(p11p14)]. Die fetalpathologische Untersuchung ergab einen leicht hypotrophen männlichen Fetus mit facialen Dysmorphien (hoher schmaler Schädel mit kleinem Gesicht, Hypertelorismus, Epikanthus beidseits, langes Philtrum), Balkenagenesie des Gehirns sowie leichte subvalvuläre hypertrophische Aortenstenose bei ansonsten regelhaften Skelettverhältnissen und ohne weiteren Fehlbildungen.

CGH-Analyse

Es wurde DNA mit einer Fragmentlänge im Bereich von 200-800bp aus fetalem Nierengewebe isoliert. Das Fluoreszenzmuster für die Geschlechtschromosomen entsprach einem männlichen Karyotyp. Die Auswertung der Fluoreszenz-Ratioprofile für die Autosomen zeigte für das Chromosom 3 einen Verlust im Bereich p12-p14 (Abb. 34). Die Fluoreszenz-Ratioprofile der anderen Autosomen lagen innerhalb der Grenzwerte.

Die Karyotypformel nach ISCN lautet: **rev ish XY, dim(3p12p14)**.

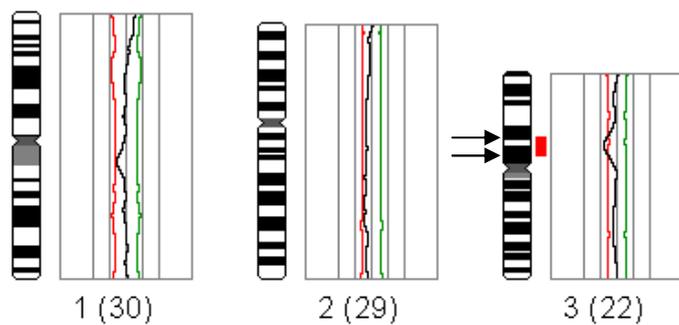


Abbildung 34 Fall O-212/86:
Partielles CGH-Profil mit den
Fluoreszenz-Ratioprofilen
der
Chromosomen 1, 2 und 3 bei
männlicher Gonosomenkonstellation:
Dargestellt ist die Unterrepräsentation
fetaler DNA am Chromosom 3 im
Bereich p12p14 (Pfeile).

Der pränatal erhobene Karyotyp konnte mittels CGH präzisiert und mit 46,XY, del(3)(p12p14) beschrieben werden. Allerdings scheint nach CGH die Deletion etwas kleiner als cytogenetisch vordiagnostiziert.

4.4.2.6 Charakterisierung eines überzähligen Markerchromosoms

(O-1919/01)

Aus Altersindikation erfolgte in der 16.SSW eine Pränataldiagnostik. Der Ultraschall war unauffällig. Die cytogenetische Analyse kultivierter Amnionzellen ergab einen numerisch auffälligen Befund mit einem überzähligen Markerchromosom in 53% der untersuchten Zellen (47,XX,+mar/46,XX). Die zusätzlich durchgeführte NOR-Färbung zeigte keine spezifische Anfärbung des Markerchromosoms, während die C-Färbung positiv für den Marker war. Über eine M-FISH-Analyse konnte er als ein Derivat des Chromosoms 2 identifiziert werden (Abb. 35a).

Aufgrund der infausten Prognose wurde eine Interruptio durchgeführt. Die anschließende fetalpathologische Untersuchung ergab einen weiblichen dystrophen Fetus mit craniofacialen Dysmorphien (ausgeprägter Hypertelorismus, breite Nase, prominentes Philtrum, Makrostomie, Mikro-Retrognathie und tiefsitzende Ohren) sowie ein verkürztes 4. Metacarpale und ohne weitere inneren Fehlbildungen. Die Chromosomenanalyse der Eltern ergab beim Vater einen unauffälligen Karyotyp (46,XY), während bei der Mutter ein Triple X- Karyotyp gefunden wurde (47,XXX).

Die genaue Identifizierung der genetischen Zusammensetzung des Markerchromosoms sollte retrospektiv über eine CGH-Analyse erfolgen.

CGH-Analyse

Es wurde qualitativ gute DNA mit Fragmentlängen im Bereich von 300-1500bp aus nativ gefrorenem Muskelgewebe isoliert. Das Fluoreszenzmuster für die Geschlechtschromosomen zeigte einen weiblichen Karyotyp. Die Auswertung der Fluoreszenz-Ratioprofile ergab einen pathologischen Befund für das Chromosom 2. Im

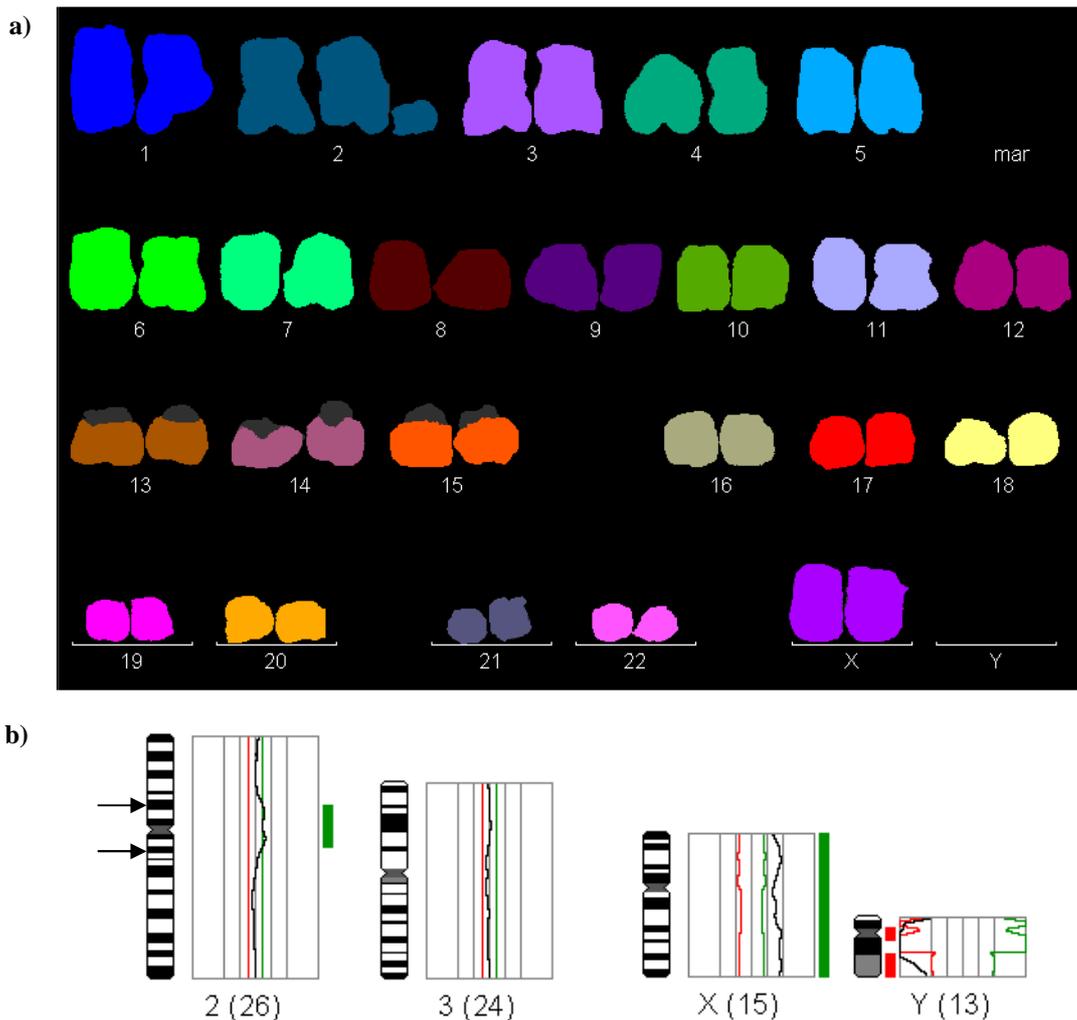
centromernahen Bereich des Chromosoms 2 fiel bereits eine intensive Grünfluoreszenz auf. Abbildung 35b zeigt das Ergebnis der CGH in Form eines Partialprofils für das Chromosom 2. Die statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten sprach für einen Zugewinn der Chromosomenregion 2p13-q13.

Die Karyotypformel nach ISCN lautet demnach: **rev ish XX,enh(2)(p13q13)**.

Somit dürfte das Markerchromosom beim Kind neu entstanden sein.

Abbildung 35 Fall O-1919/01:

a) M-FISH-Analyse: Identifizierung des chromosomalen Ursprungs des überzähligen Markerchromosoms als Derivat von Chromosom 2. b) partielles CGH-Profil mit Darstellung der Fluoreszenz-Ratioprofile der Chromosomen 2 und 3 mit Zugewinn am Chromosom 2 in p13-q13 bei weiblichem Karyotyp.



Mikrodissektion

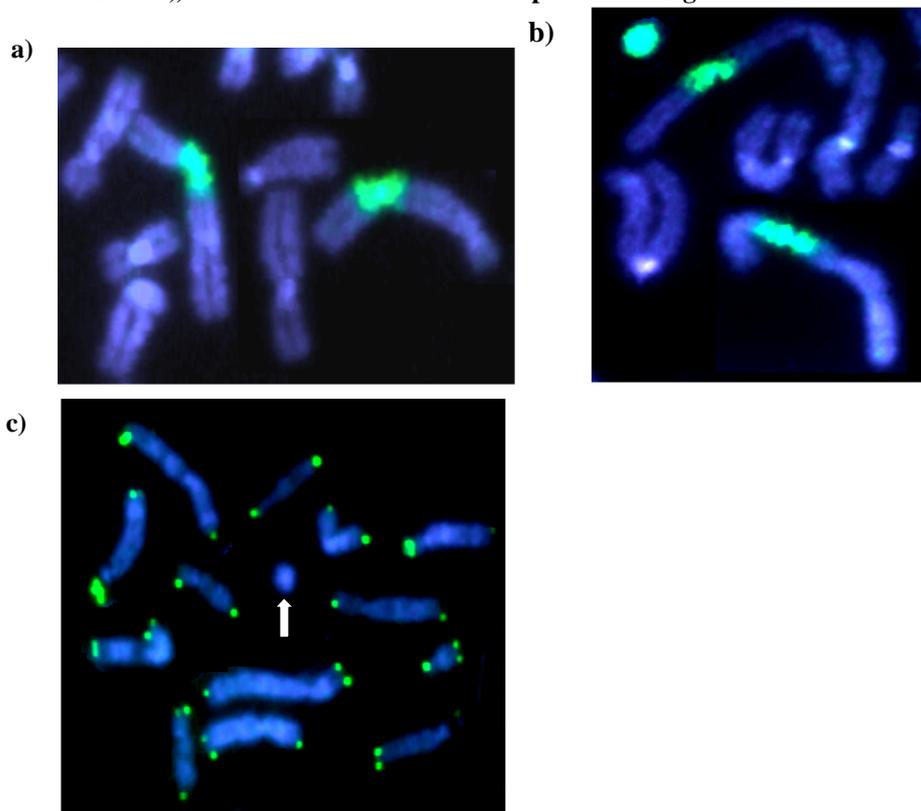
Zur Überprüfung der mittels CGH identifizierten Bruchpunkte des überzähligen Markerchromosoms wurde der Marker mikrodisseziert. Aus Metaphasen der kultivierten Amnionzellen wurden 5 Markerchromosomen mit Hilfe der Mikrodissektion disseziert und die DNA mittels DOP-PCR amplifiziert (Kap. 3.4.6.3). In einer 2. PCR wurde die DNA mit Biotin markiert und als Sonde für eine FISH

verwendet (vgl. Kap. 3.3.1). Beim *Reverse Painting* (Abb. 36a) wurden die centromernahen Regionen der homologen Chromosomen 2 im Bereich p13-q13 vollständig markiert. Bei Hybridisierung auf Metaphasen des Feten (*Forward Painting*) zeigte sich eine vollständige Markierung des Markerchromosoms sowie ebenfalls der pericentromerischen Regionen der normalen Chromosomen 2 (Abb. 36b).

Da der Verdacht auf Bildung eines Ringchromosoms vorlag, wurde zudem eine FISH-Analyse mit der „All Human Telomeres“-Sonde durchgeführt (Abb. 36c). Diese zeigte auf allen Chromosomen regelrechte Signale mit Ausnahme des Markers. Somit konnte ein Ringchromosom verifiziert werden.

Abbildung 36 Fall O-1919/01:

Mikro-FISH- und FISH-Analysen: a) FISH auf normale männliche Metaphasen (*reverse chromosome painting*): Markierung der centromernahen Region der homologen Chromosomen 2. b) Hybridisierung auf Metaphasen des Feten (*forward painting*): vollständige Markierung des Markerchromosoms sowie pericentromerischen Regionen der normalen Chromosomen 2. c) FISH mit der Sonde „All Human Telomeres“: kein spezifisches Signal am Markerchromosom (Pfeil).



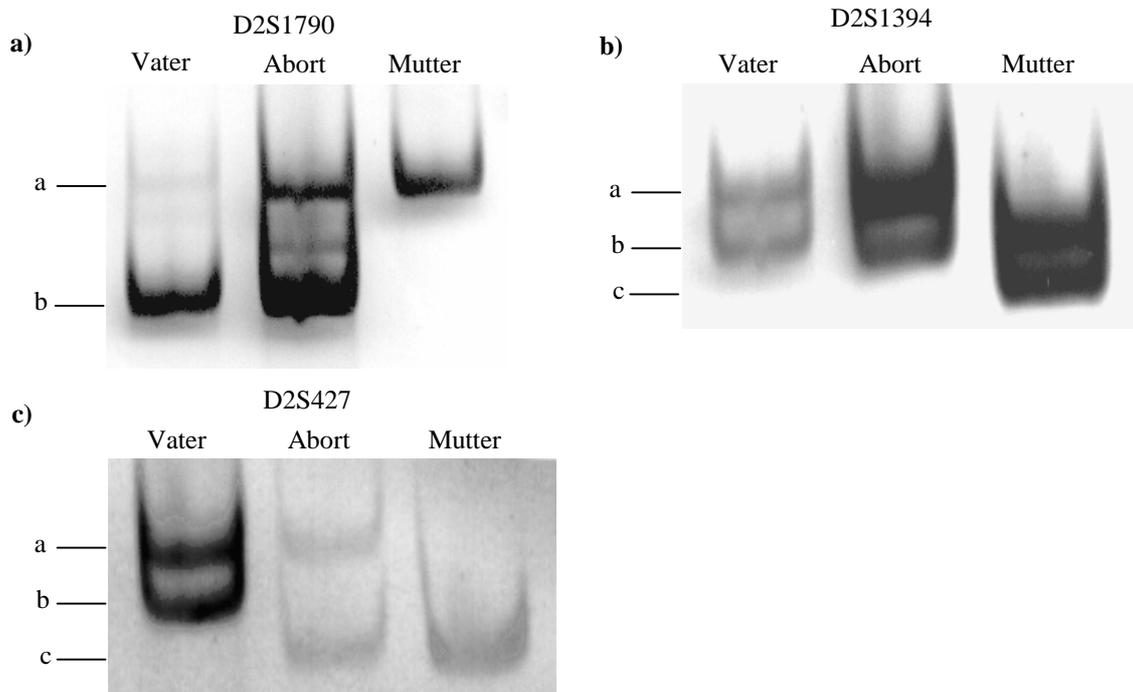
Mikrosatellitenanalyse

Zur Bestimmung der parentalen Herkunft des Markers sowie zum Ausschluss einer uniparentalen Disomie der normalen homologen Chromosomen 2 wurde eine Mikrosatellitentypisierung mittels PCR an DNA des Feten und der Eltern durchgeführt. Es wurden insgesamt 9 hochpolymorphe Marker der pericentromerischen Region und 5 Marker des langen Arms von Chromosom 2 eingesetzt. Zwei der pericentromerischen Marker (D2S1790 in 2p11.2-12 und D2S1394 in 2p13) waren informativ und belegten

eine paternale Herkunft des Markers. Zwei der getesteten Marker außerhalb der pericentromerischen Region (D2S1326 in 2q22 und D2S427 in 2q37) ergaben eine biparentale Vererbung der beiden homologen Chromosomen 2 (Abb. 37). Somit konnte eine UPD für das Chromosom 2 ausgeschlossen werden.

Abbildung 37:

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) hochpolymorpher Mikrosatelliten. D2S1790 (a) und D2S1394 (b) zeigten Dosis-effekt für paternale Herkunft des Markers. D2S427 (c) dagegen zeigt biparentale Vererbung der homologen Chromosomen 2.



Das pränatal diagnostizierte zusätzliche Markerchromosom konnte aufgrund des Einsatzes unterschiedlicher molekularcytogenetischer Methoden (FISH, Multicolor-FISH, Mikrodissektion) exakt charakterisiert und die Bruchpunkte nach CGH präzise bestimmt werden.

4.4.3 Fälle ohne Ergebnis nach CGH

In 9/51 Fällen (17,6%) konnte kein Ergebnis über CGH erzielt werden (siehe Anhang Tab. A). In 6/9 Fällen (66,6%) wurde hochgradig degradierte DNA mit einer Länge von 150 bis maximal 500bp Länge isoliert. Die Fixierungsdauer der Gewebeproben in Formalin betrug mehrere Wochen bis zu 2 Jahre. In 3/9 Fällen (33,3%) konnte leicht degradierte DNA (200-700bp) gewonnen werden. Verantwortlich hierfür ist die vorangegangene, längere Formalienfixierungsdauer von mehreren Wochen (Tab. D im Tabellenanhang).

Trotz mehrerer Versuche unter Einbeziehung unterschiedlicher Methoden (vgl. Kap. 3.3.2.1 und 3.3.2.2) gelang es nicht, die DNA in diesen Fällen für eine CGH ausreichend zu markieren.

4.5 Molekularcytogenetische und molekulargenetische Methoden zur umfassenden Charakterisierung chromosomaler Imbalancen bei Aborten

In 3 Fällen konnte über Mikrosatellitentypisierung und in einem Fall über chromosomale Mikrodissektion die vordiagnostizierte Chromosomenstörung präzise abgeklärt werden. In allen vier Fällen hatte die cytogenetische Diagnostik einen auffälligen Karyotyp mit einem strukturell veränderten Chromosom ergeben.

4.5.1 Ausschluss einer Uniparentalen Disomie 2 (O-1893/01)

In diesem Fall wurde in der 23.SSW eine Chorionzottenbiopsie aufgrund sonografischer Auffälligkeiten (cerebrale Ventrikulomegalie, Oligohydramnion) durchgeführt. Die cytogenetische Untersuchung der Chorionzotten nach Langzeitkultivierung erbrachte den pathologischen Befund einer Mosaik-Trisomie 2 level III mit folgendem Karyotyp: 47,XX,+2[38]/46,XX[6]. Zur weiteren Befundabklärung erfolgten eine Entnahme von Fetalblut und Fruchtwasser. Die cytogenetische Untersuchung der fetalen Lymphocyten und Amnionzellen ergaben in allen analysierten Metaphasen einen numerisch und strukturell unauffälligen weiblichen Karyotyp (46,XX). Die in den Chorionzotten gefundene Mosaik-Trisomie 2 ließ sich nicht mehr nachweisen.

Der Spontanabort aus der 26.SSW wurde nicht fetalpathologisch untersucht.

Molekulargenetische Methoden

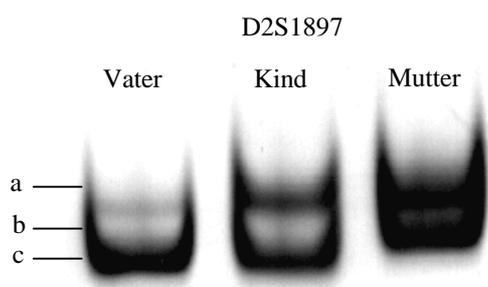
Zum Ausschluss einer uniparentalen Disomie für das Chromosom 2 infolge eines „Trisomie Rescues“ wurde eine Mikrosatellitentypisierung über PCR durchgeführt. Es wurden insgesamt 17 hochpolymorphe für das Chromosom 2 spezifische Mikrosatellitenmarker eingesetzt, von denen 4 der getesteten Loci informativ waren und eine biparentale Vererbung belegten (Tab. 48, Abb. 38). Somit konnte eine UPD für das Chromosom 2 als Ursache der sonografisch ermittelten Auffälligkeiten ausgeschlossen werden. Es bestand daher entweder die Möglichkeit, dass die Mosaik-Trisomie 2 auf die Placenta beschränkt war, nicht den Feten betraf oder die Trisomie 2 betraf andere fetale Gewebe, die jedoch nicht untersucht werden konnten.

Tabelle 48 Fall O-1893/01:

Mikrosatellitenanalyse belegt biparentalen Vererbungsmodus für die Chromosomen 2; Allele sind in Arbeitseinheiten angegeben.

Marker/Lokalisation *	Vater	Abort	Mutter	Interpretation
D2S2232 / 2p10-q11.2	a, a	a, b	b, b	biparental
D2S1897 / 2p10-q11.2	c, c	a, c	a, b	biparental
D2S1384 / 2q33	a, c	a, b	b, b	biparental
D2S1363 / 2q36	a, b	a, c	c, c	biparental

(* nach cedar.genetics.soton.ac.uk)



**Abbildung 38 Fall O-1893/01:
Mikrosatellitenanalyse. Ausschluss einer
UPD 2 als Ursache des Spontanabortes
und der beschriebenen Fehlbildungen**

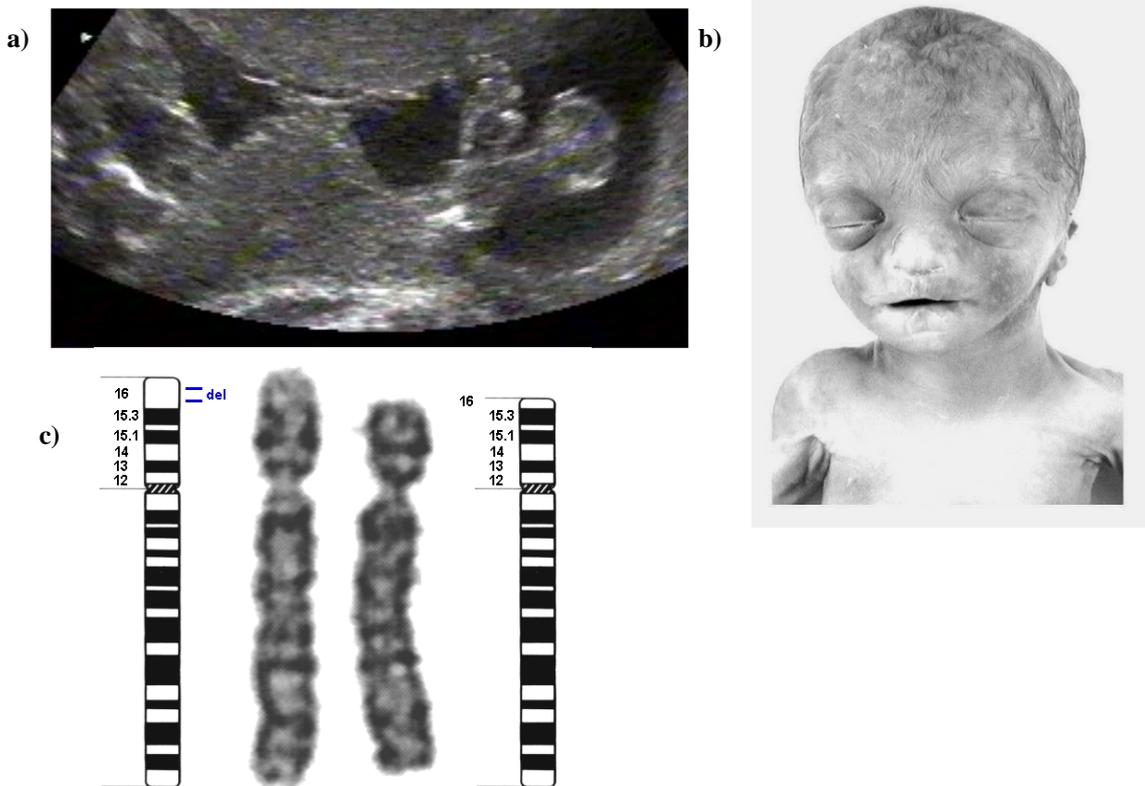
4.5.2 Terminale Deletion 4p (Wolf-Hirschhorn-Syndrom) (O-1910/01)

In der rechnerisch 27.SSW wurde aufgrund eines auffälligen Ultraschallbefundes (intrauterine Wachstumsretardierung, Klumpfüße beidseits, flaches Profil, Abb. 39a) eine Amniocentese durchgeführt. Die Chromosomenanalyse kultivierter Amnionzellen ergab eine Deletion des kurzen Armes an einem Chromosom 4 (Abb. 39c) mit dem Karyotyp 46,XX,del(4)(p16.1). Die Deletion wurde mittels FISH mit einer DNA-Sonde spezifisch für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom bestätigt. Die Eltern entschieden sich aufgrund der infausten Prognose für einen Schwangerschaftsabbruch. Die fetalpathologische Untersuchung ergab einen stark hypotrophen weiblichen Feten mit Maßen, die der 23.SSW entsprachen. Die facialen Dysmorphien waren typisch für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (‘Greek warrior helmet’-Facies: Mikrocephalie, Hypertelorismus, breiter Nasenrücken, kurzes prominentes Philtrum, Karpfenmund, Mikro-Retrognathie, tiefsitzende Ohren, Abb. 39b). Weiterhin wies der Fet Klumpfüße, starke Lungen- und Nierenhypoplasie sowie einen Herzfehler in Form einer Fenestrierung des Foramen ovale auf.

Die Chromosomenanalyse beider Eltern ergab einen normalen Befund.

Abbildung 39 Fall O-1910/01:

a) Darstellung der Klumpfüße des Feten im Ultraschall der 27.SSW; b) Facialer Aspekt des Feten mit Wolf-Hirschhorn-Syndrom: `Greek warrior helmet-Facies` mit Hypertelorismus, breitem Nasenrücken, Karpfenmund, Mikro-Retrognathie und tiefsitzenden Ohren; c) Partielles Karyogramm: links normales Chromosom 4, rechts deletiertes Chromosom 4. Im Ideogramm ist das Ausmaß der Deletion markiert.

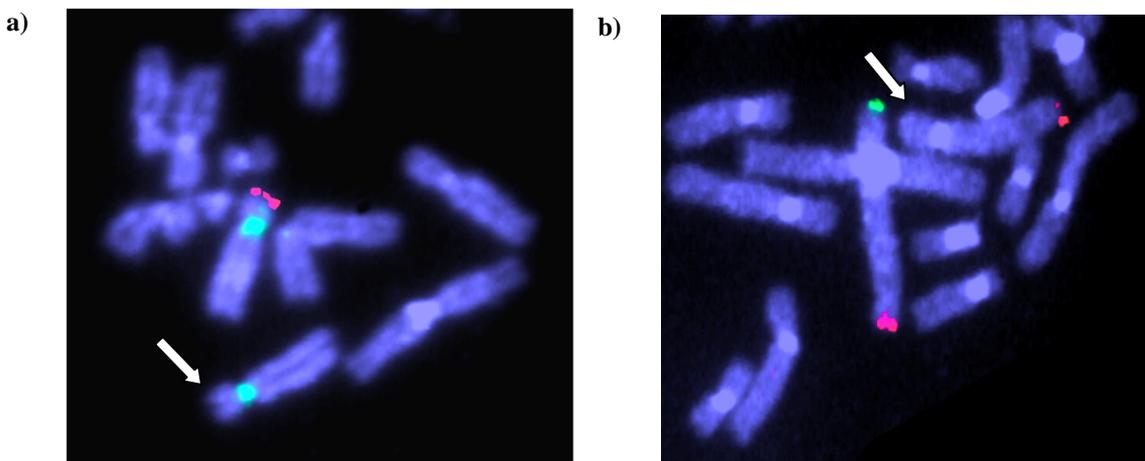


Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Mittels FISH-Diagnostik unter Verwendung locuspezifischer Sonden (D4S96, Oncor, Gaithersburg, MD, USA; WHSCR-Sonde und die Subtelomer-Probe D4S3359, Vysis Inc, Downers Grove IL, USA) konnte die 4p-Deletion bestätigt werden. Die jeweiligen Loci ließen sich an dem deletierten Chromosom 4 nicht darstellen (Abb. 40).

Abbildung 40 Fall O-1910/01:

Zwei-Farben-FISH mit locuspezifischen Sonden. Die Pfeile markieren jeweils das deletierte Chromosom 4. a) LSI WHSCR in 4p16.1 (rot): D4Z1 (grün); WHSCR ist nicht darstellbar b) Subtelomer-Sonde in 4p16.3: (D4S3359 grün); Telomer 4q (rot) - Verlust der Subtelomerregion 4p.



Mikrosatellitenanalyse

Um das Ausmaß der Deletion näher zu charakterisieren sowie die parentale Herkunft des deletierten Chromosoms abzuklären, wurde eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Dazu wurde fetale DNA aus gefrorenem Muskelgewebe isoliert. Die elterliche DNA konnte aus der asservierten Chromosomensuspension gewonnen werden. Insgesamt wurden 28 spezifische, hochpolymorphe Marker aus der kritischen Region 4p15.3->pter getestet. Von diesen waren 7 Marker informativ und belegten das Fehlen des väterlichen Allels (Marker D4S3023, D4S394 und D4S2366). Für weiter proximal gelegene Marker konnten beim Fet 2 Allele nachgewiesen werden (Abb. 41). Demnach muss der Bruch zwischen den Markern D4S394 und D4S2928 erfolgt sein (Tab. 49).

Tabelle 49 Fall O-1910/01:

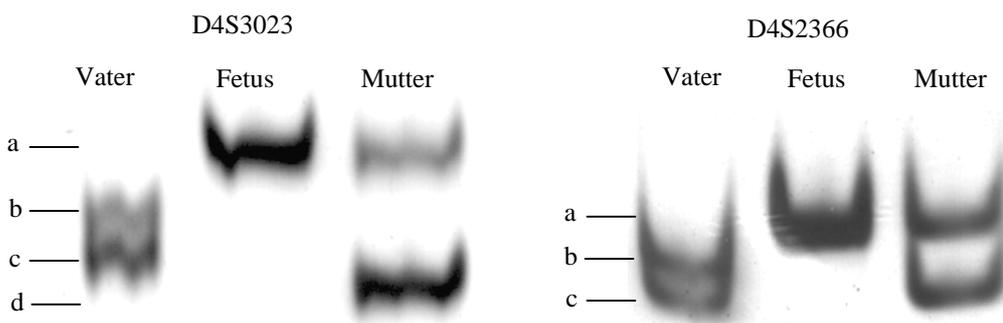
Mikrosatellitenanalyse bestätigt Deletion des paternal vererbten Chromosoms; Allele sind in Arbeitseinheiten angegeben.

Marker/ Lokalisation *	Distanz in cM von 4ptel *	Vater	Abort	Mutter	Interpretation
D4S3023/4p16.2	8.24	b,c	a	a,d	paternales Allel fehlt
D4S2366/4p16.1	12.93	b,c	a	a,c	paternales Allel fehlt
D4S394/4p16.1	16.01	b,b	a	a,c	paternales Allel fehlt
D4S2928/4p15.33	23.17	a,c	a,b	b,b	2 Allele; biparental

(* nach cedar.genetics.soton.ac.uk)

Abbildung 41 Fall O-1910/01:

Mikrosatellitenanalyse: Die hochpolymorphen Repeatmarker D4S3023 und D4S2366 zeigten Deletion des paternal vererbten Chromosoms.



Die pränatal mittels konventioneller Chromosomenanalyse festgestellte Deletion des kurzen Armes eines Chromosoms 4 konnte somit durch FISH unter Verwendung spezifischer DNA-Sonden (D4S96 und LSI WHSCR) bestätigt werden. Durch die Mikrosatellitentypisierung konnte gezeigt werden, dass das deletierte Chromosom vom Vater stammt. und die Ergebnisse zeigten zudem, dass die Deletion größer als die für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom kritische Region ist.

4.5.3 Inversionsduplikation 8p (118/02)

Die vorgeburtliche Chromosomenanalyse aus Amnionzellen in der 15.SSW (Amniocentese erfolgte aus Altersindikation) ergab einen strukturell auffälligen weiblichen Karyotyp mit einer Verlängerung des kurzen Armes eines Chromosoms 8 (Abb. 42). Da eine Inversionsduplikation 8p vermutet wurde, wurde das veränderte Chromosom mit Hilfe der FISH-Technik näher untersucht.

Das zusätzliche Material am Chromosom 8 wurde mit einer WCP 8-Sonde als Chromosom 8-Material identifiziert (Abb. 43a). Eine Beteiligung weiterer Chromosomen an dieser Strukturaberration konnte daher mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Nach Hybridisierung mit einer Subtelomersonde für 8p ergab diese an dem aberranten Chromosom 8 kein Signal, so dass der Verlust der terminalen Region 8p23.1->pter nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 43b). FISH mit den Sonden für die Centromer- und Subtelomerregion 8q ergaben jeweils regelrechte Signale.

Die Inversionsduplikation einhergehend mit einer Deletion der Subtelomerregion wurde somit molekularcytogenetisch bestätigt. Im Zusammenhang mit dem G-Bandenmuster wurde die Verlängerung als Inversionsduplikation der Banden 8p11.2->p23 bei gleichzeitigem Verlust der terminalen Region 8p23.1->pter interpretiert. Die Karyotypformel lautet demnach: 46,XX,inv dup del(8)(qter->p23.1::p23.1->p11.2:). ish inv dup del(8)(wcp8+,D8S505-,8qtel+,D8Z1+). Die Chromosomenanalyse beider Eltern ergab einen unauffälligen Befund.

Aufgrund der infausten Prognose entschieden sich die Eltern zu einem Schwangerschaftsabbruch. Die fetalpathologische Untersuchung ergab einen normotrophen weiblichen Fetus mit Maßen entsprechend der 18.SSW. Auffällig waren diskrete faciale Dysmorphiezeichen (Hypertelorismus, Mikrognathie, hoher Gaumen, kleine Ohrmuscheln), Pes equinvarus beidseits, ein Herzfehler in Form eines Vorhofseptumdefekts vom Sekundum-Typ und Hirnfehlbildungen wie Hydrocephalus internus, fehlende Gyrierung der Großhirnhemisphären und Corpus callosum-Agenesie.

Abbildung 42 Fall 118/02:

Partielles Karyogramm nach GTG-Bänderung: links normales Chromosom 8, rechts strukturell verändertes Chromosom 8. Das Ideogramm zeigt das Ausmaß der Duplikation. Pfeile markieren involvierte Banden der Duplikation

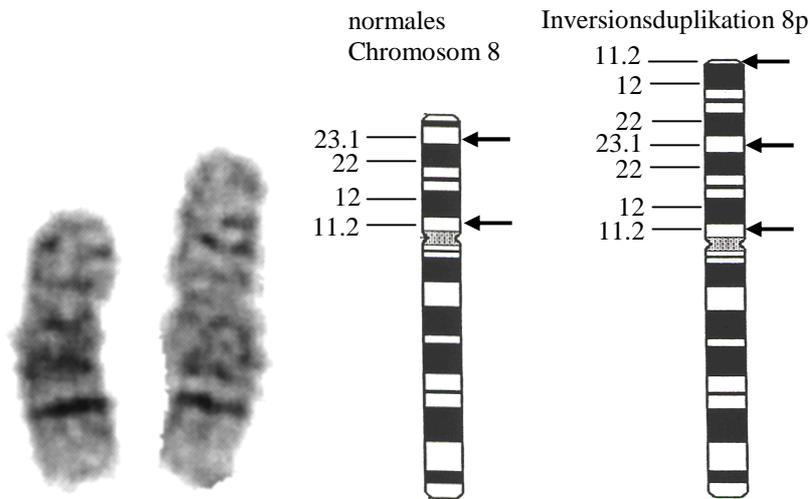
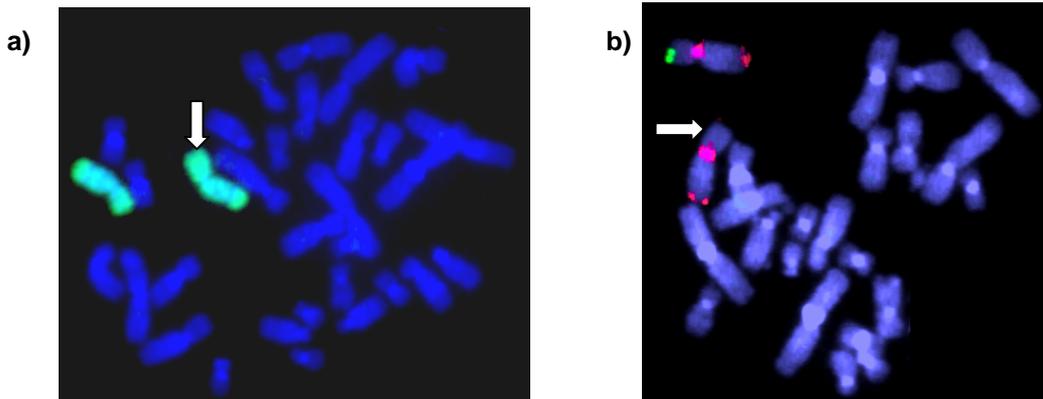


Abbildung 43 Fall 118/02:

FISH mit Chromosom 8-spezifischen Sonden (Pfeil kennzeichnet das Derivatvchromosom 8).

a) FISH mit WCP 8 (grün, Vysis): durchgängige Markierung des strukturell veränderten Chromosoms 8; b) FISH mit Subtelomer-Sonden 8p (D8S505, grün) + Subtelomer 8q (rot) + Centromer-Sonde für das Chromosom 8 (D8Z1, rot): Deletion von 8p.



Mikrosatellitenanalyse

Zur näheren Charakterisierung des duplizierten bzw. deletierten Segmentes und zur Bestimmung der parentalen Herkunft des aberranten Chromosoms wurde eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Es wurde DNA aus asservierter Chromosomensuspension des Vaters und des Kindes sowie aus EDTA-Blut der Mutter isoliert. Insgesamt wurden 27 polymorphe Marker aus der chromosomalen Region 8p11->8ptel sowie 3 Marker aus dem langen Arm von Chromosom 8 getestet (Tab. 50). 5 polymorphe Marker für die Bereiche 8p23.2, 8p23.1, 8p21.2 und 8p11.1 bestätigten eine Duplikation (vgl. Abb. 44). Anhand der Befunde der Mikrosatellitentypisierung ist das duplizierte Segment größer, als cytogenetisch vermutet wurde. Die parentale Herkunft des aberranten Chromosoms konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Der vollständige Karyotyp kann demnach folgendermaßen beschrieben werden: 46,XX,inv dup del(8)(qter->p23.3::p23.3->p11.1::p11.1):ish inv dup del(8)(wcp8+, D8S504-, 8qtel+, D8Z1+).

Tabelle 50 Fall 118/02:

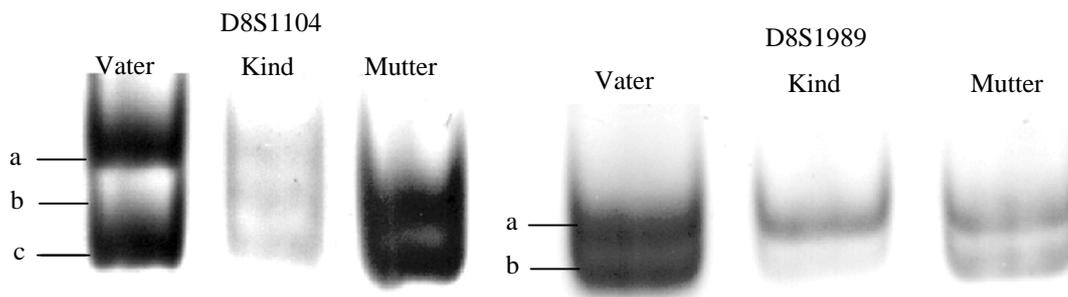
Mikrosatellitenanalyse bestätigt Duplikation 8p; Allele sind in Arbeitseinheiten angegeben.

Marker/Lokalisation *	Distanz in cM von 8ptel *	Vater	Abort	Mutter	Interpretation
D8S1469 / 8p23.2	16.19	a,b	a,b,c	b,c	3 Allele
D8S1109 / 8p23.1	k.A.	a,b	b,b,c	b,c	Dosiseffekt
D8S1107 / 8p23.1	k.A.	b,b	a,b,b	a,b	Dosiseffekt
D8S1989 / 8p21.2	50.5	a,b	a,a,b	a,b	Dosiseffekt
D8S1104 / 8p11.1	64.6	a,c	a,b,c	b,c	3 Allele
D8S1110 / 8p10	67.27	a,b	b,c	a,c	biparental
D8S1132 / 8q23.1	k.A.	b,c	b,d	a,d	biparental
D8S1128 / 8q24	139.53	a,a	a,c	b,c	biparental

(*www.cedar.genetics.soton.ac.uk).

Abbildung 44 Fall 118/02:

Mikrosatellitenanalyse: die hochpolymorphen Marker D8S1104 in 8p11.1 und D8S1989 in 8p21.2 zeigten Duplikation für 8p



4.5.4 Derivatvchromosom 8 (V-2309/01)

Die Schwangerschaft kam nach einer IVF-Behandlung aufgrund eines OAT-Syndroms des Vaters zustande. Eine Chromosomenanalyse der Eltern war vorab nicht erfolgt. Nach eingetretener Schwangerschaft zeigte der hCG-Verlauf einen inadäquaten Anstieg mit sonografischem Verdacht auf ein Windei. Es kam in der rechnerisch 8.SSW (sonografisch 5.SSW) zu einem Frühabort. Die cytogenetische Analyse an Metaphasen aus kultivierten Abortzotten ergab einen männlichen Karyotyp mit einem strukturell veränderten Chromosom 8. Das aberrante Chromosom 8 wies proximal am kurzen Arm zusätzliches Chromosomenmaterial unbekannter Herkunft auf (vgl. Abb. 45). Der Karyotyp konnte cytogenetisch wie folgt beschrieben werden: 46,XY,add(8)(p23).

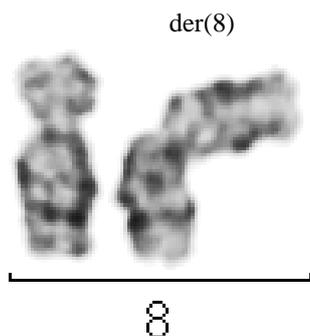


Abbildung 45 Fall V-2309/01:
Partielles Karyogramm nach GTG-
Bänderung: links das normale Chromosom 8,
rechts das strukturell veränderte Chromosom
8 mit zusätzlichem Material unbekannter
Herkunft.

Die FISH-Analyse mit Chromosom 8-spezifischen Sonden bestätigten die unbalancierte Translokation mit einer partiellen Monosomie 8p23->pter und einer partiellen Trisomie unbekannter Herkunft (siehe Abb. 46a).

Zur Bestimmung der Herkunft des zusätzlichen Chromosomenmaterials wurde das gesamte Derivatvchromosom mikrodissenziert. Aus Metaphasen der kultivierten Abortzotten wurden 3 Markerchromosomen mit Hilfe der Mikrodissektion diszeziert und die DNA mittels DOP-PCR amplifiziert. In einer 2. PCR wurde die DNA mit Biotin markiert, gefällt und als Sonde für eine FISH verwendet (vgl. Kap. 3.3.1). Bei der Hybridisierung auf Metaphasen eines normalen männlichen Spenders (Abb. 46b) wurden die homologen Chromosomen 8 vollständig sowie die Chromosomen 6 im Bereich 6q22->qter markiert. Bei der Hybridisierung von Chromosom 8- und Chromosom 6-spezifischen WCP-Sonden an Metaphasen des Patienten konnte bestätigt werden, dass das zusätzliche Chromosomenmaterial von Chromosom 6 stammt (Abb. 46c).

Mikrosatellitenanalyse

Zur näheren Charakterisierung der Bruchpunkte sowie zur Bestimmung der parentalen Herkunft des duplizierten Segmentes 6q wurde eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Es wurde qualitativ gute DNA (>1500bp) aus tiefgefrorenem Zotten- und Nabelschnurgewebe sowie DNA aus asservierter Chromosomensuspension der Eltern isoliert. Insgesamt wurden 9 polymorphe Mikrosatellitenmarker von Chromosom 6 getestet (Tab. 51). 4 der 5 informativen Marker zeigten einen biparentalen Vererbungsmodus. Der Marker D6S1003 in der chromosomalen Bande 6q23 dagegen belegte einen Dosisseffekt, eine Aussage zur parentalen Herkunft konnte jedoch nicht getroffen werden (Abb. 47).

Abbildung 46 Fall V-2309/01:

Mikro-FISH- und FISH-Analysen: a) Zwei-Farben-FISH mit WCP 8 (rot) und Subtelomer 8p (D8S504, grün): Das normale Chromosom 8 zeigte durchgehende Markierung für WCP 8 und ein Signal für 8ptel. Das Derivatchromosom 8 dagegen zeigte keine durchgängige Markierung für WCP 8 sowie den Verlust von 8p. b) Reverse Chromosome Painting nach Mikrodisektion des Derivatchromosoms ergab durchgängige Markierung der homologen Chromosomen 8 sowie der distalen langen Arme von Chromosom 6q22->qter; c) FISH mit WCP 8 (grün) und WCP 6 (rot) bestätigt die unbalancierte Translokation 6;8

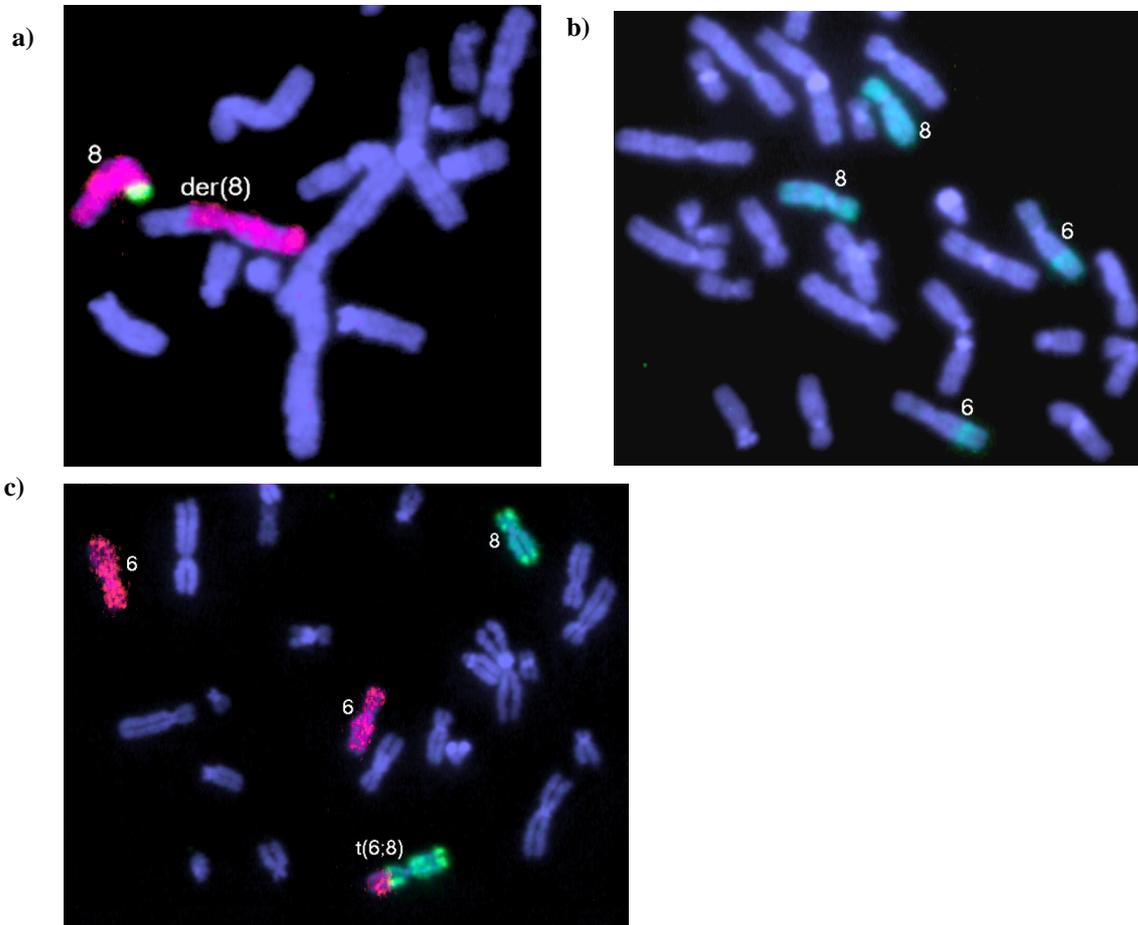


Tabelle 51 Fall V-2309/01:

Mikrosatellitenanalyse belegte Dosis-effekt des trisomen Materials von Chromosom 6. Allele sind in Arbeitseinheiten angegeben.

Marker/Lokalisation *	Vater	Abort	Mutter	Interpretation
D6S477/6p25	b,c	a,c	a,a	2 Allele; biparental
D6S1017/6p21	a,b	a,b	a,c	2 Allele
D6S1056/6q16	a,b	a,c	b,c	2 Allele; biparental
D6S474/6q21	b,c	b,c	a,b	2 Allele
D6S1003/6q23	b,c	a,c,c	a,d	Dosis-effekt

*www.cedar.genetics.soton.ac.uk

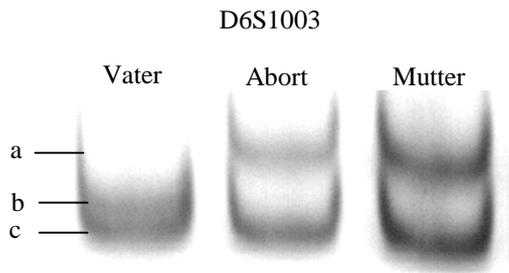


Abbildung 47 Fall V-2309/01:
Polyacrylamidgelelektrophorese mit hochpolymorphen Markern: D6S1003 zeigt Dosiseffekt für 6q23. Eine Aussage zur parentalen Herkunft konnte nicht getroffen werden.

In diesem Fall konnte eine unbalancierte Chromosomenstörung mit Hilfe der Mikrodisektion näher charakterisiert werden. Die Herkunft des zusätzlichen unbekanntes Chromosomenmaterials am Chromosom 8 konnte als 6q-Material mit Bruchpunkt in der Bande q22 identifiziert werden. Die durch FISH belegte terminale Deletion von 8p23 konnte durch Mikrodisektion nicht bestätigt werden, da dieser deletierte Bereich unterhalb der Nachweisgrenze lag. Mikrosatellitenanalyse bestätigte die partielle Trisomie für 6q23. Anhand der informativen Marker für das Chromosom 6 konnte nachgewiesen werden, dass der Bruchpunkt proximal von 6q23 liegen muss.

Der Karyotyp lässt sich abschließend wie folgt beschreiben: 46,XY,add(8)(p23).ish t(6;8) (wcp6+, wcp8+, D8S504-). rev ish der(8) t(6;8)(8qter->8p23::6q22->6qter).

Die unbalancierte Translokation mit partieller Trisomie 6q und einhergehendem Verlust der Subtelomerregion 8p ist als Ursache für den erlittenen Frühabort anzusehen.

5 Diskussion

5.1 Retrospektive Chromosomendiagnostik an Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Mehr als 50% aller Spontanaborte sind auf chromosomale Imbalancen zurückzuführen (Boué et al. 1985, Pauer et al. 1999). Eine cytogenetische Abklärung der Aborte ist sowohl für die Ursachenklärung als auch Prognoseabschätzung für Folgeschwangerschaften indiziert. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer intensiven cytogenetischen Untersuchung der Personen mit Aborten als auch der abortierten Feten selbst. Diese kann jedoch oftmals nicht erfolgreich durchgeführt werden. Ursachen hierfür sind mikrobielle Kontaminationen bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials, das Fehlen vitaler Zellen, vor allem in Fällen mit missed abortion, und damit das fehlende Zellwachstums bei der Kultivierung oder das präferentielle Wachstum maternaler Zellen der Dezidua, da die Trennung fetaler und maternaler Gewebeanteile aus diesem Material oftmals erschwert ist. Häufig macht aber auch eine vorangegangene Formalinfixierung des Abortmaterials eine cytogenetische Abklärung unmöglich. Bei der histologischen Aufarbeitung des Abortabradates sowie bei der autoptischen Beurteilung von Feten kann sich aber der Verdacht auf eine Chromosomenaberration ergeben, so dass eine retrospektive Analyse des Materials zur Verifikation der Verdachtsdiagnose wünschenswert ist. Für Retrospektivanalysen an Abortmaterial stehen in der Regel asservierte Paraffinblöckchen mit Formalin fixierten Geweben zur Verfügung. Mit den bisherigen cytogenetischen Methoden war es bisher ausgeschlossen, an solch archiviertem Material Aussagen zum chromosomalen Status vorzunehmen. Für die neuere molekularcytopogenetische Methode der Comparativen Genomhybridisierung (CGH), die unabhängig voneinander von 2 Arbeitsgruppen entwickelt wurde, wird kein vitales Zellmaterial benötigt (Kallionemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993).

Mittels CGH ist es möglich, in nur einem Versuchsansatz ein unbekanntes Genom auf chromosomale Aberrationen hin zu überprüfen, ohne vorherige Informationen über mögliche involvierte Chromosomen oder chromosomale Regionen (Bryndorf et al. 1995, Weimer et al. 2000, Bartsch et al. 2001). Somit bietet diese Methode einen generellen Überblick über alle unbalancierten genetischen Veränderungen der zu untersuchenden DNA und ermöglicht eine Beurteilung der genomischen Veränderungen auf chromosomaler Ebene. So können nachfolgend in der genetischen Beratung von Paaren mit Aborten noch molekularcytopogenetische Untersuchungen der bereits

abortierten Feten durchgeführt und wesentliche Angaben zur Art der Chromosomenveränderung, der damit verbundenen phänotypischen Ausprägung sowie das mögliche Wiederholungsrisiko gemacht werden. Grundvoraussetzung für alle molekularcytopogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen ist jedoch die Gewinnung von doppelsträngiger DNA in ausreichender Qualität und Quantität.

In der vorliegenden Arbeit sind daher folgende Fragestellungen untersucht worden:

- (1) Eignet sich die DNA, welche aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Material isoliert wurde, für anschließende molekularcytopogenetische und molekulargenetische Untersuchungen?
- (2) Ist die CGH eine effiziente Methode zur Abklärung von chromosomalen Imbalancen in Früh- und Spätaborten?
- (3) Sind chromosomale Veränderungen die Ursache für die untersuchten Aborte und Feten mit Fehlbildungssyndromen?

5.2 Methodische Aspekte

5.2.1 DNA-Isolierung aus Formalin fixierten, paraffiniertem Gewebe

Die molekularbiologische Analyse syndromrelevanter und krankheitsassoziiertes DNA-Veränderungen macht eine DNA-Extraktion sowohl aus frischem als auch asserviertem (kryokonserviert, fixiert, paraffiniert) Gewebe erforderlich. Die CGH kann mit isolierter DNA sowohl aus frischem als auch Formalin fixierten Gewebe durchgeführt werden und stellt ein effektives Werkzeug bei der erweiterten Genomanalyse vor allem in der Pathologie dar. In der Tumorbiologie diente DNA aus fixiertem Gewebe hauptsächlich zu Retrospektivanalysen, wie beispielsweise der Detektion chromosomaler Imbalancen bei Prostatakrebs oder Retinoblastomen (Verhagen et al. 2000, Grasemann et al. 2005). In der Fetalpathologie ermöglichen retrospektive Untersuchungen fixierter Gewebe die Abklärung von chromosomalen Veränderungen bei Aborten, vor allem bei Aborten ohne Wachstum des Gewebes in Kultur, und darüber hinaus auch Einblicke in die Entstehungsmechanismen von Chromosomenstörungen (Fritz et al. 2000, Benkhalifa et al. 2005, Lorda-Sanchez et al. 2005).

In der fetalpathologischen Abteilung des Institutes für Klinische Genetik der Philipps-Universität Marburg wurden alle zu untersuchenden Aborte einer Formalinfixierung in 4%igem ungepuffertem Formalin unterzogen, wobei die Dauer der Formalinfixierung im Einzelfall sehr unterschiedlich war (2 Wochen bis 2 Jahre, siehe Kap. 4.1.1, Abb. 10). In der Regel jedoch lag sie unter 4 Wochen. Erschwerend kommt hinzu, dass vor

allem in der Abortpathologie häufig beginnende oder bereits fortgeschrittene Fäulnisveränderungen festzustellen sind, insbesondere bei missed abortions oder bei intrauterinem Fruchttod. Hierbei hat eine DNA-Degradierung bereits im nativen Zustand des Gewebes begonnen.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Proben verschiedenster Gewebearten in Paraffinblöckchen eingebettet. Der Vorteil einer Formalinfixierung ist, dass post mortem auftretende Zerfallserscheinungen wie Fäulnis und organische Zersetzungsprozesse verhindert werden bei gleichzeitiger Erhaltung der Gewebestruktur. Diese Form der Probenkonservierung ermöglicht eine über Jahrzehnte dauernde Asservierung der Gewebeproben und somit die Bearbeitung von Fragestellungen mittels neu entwickelter Methoden und Techniken. Die Gewebefixation sowie das Einbetten in Paraffin sind Maßnahmen, die großen Einfluss auf die Molekularstruktur der DNA haben.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass bei der Auswahl der Gewebe vorrangig eine hohe Zelldichte von entscheidender Bedeutung ist. Bevorzugt wurden daher Blöckchen mit asservierten Lungen-, Nieren-, Leber- und/oder Hautgewebe. Bei der vergleichenden Testung dieser verschiedenen Gewebe konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der extrahierten DNA-Menge oder -Qualität festgestellt werden (Kap. 4.1.5, Abb. 12). Nach Wiegand und Mitarbeitern (1996) ist jedoch die DNA-Degradierung in Weichteilgeweben zum Teil wesentlich höher als in Knochengewebe. Sie führten dies auf eine Pufferwirkung zurück, die auf den hohen Apatitanteil der Osteocyten beruht. Hierdurch wird die hydrolytische Spaltung der DNA reduziert.

Die DNA liegt in vivo als sehr langkettiges, gut bewegliches, an Histone und andere Proteine gebundenes Molekül vor. Der Nachteil der Formalinfixierung besteht darin, dass aufgrund von Oxidationsvorgängen von Formalin zu Formiat eine Senkung des pH-Wertes erfolgt und dies eine Fragmentierung der DNA bewirkt (Sellner 1989). Die DNA wird durch die Fixierung in mittlere bis kleine Bruchstücke, die nicht länger als 300-20000bp sind, fragmentiert (Weiss et al. 1999).

Formalin bewirkt ebenso eine starke Vernetzung („Crosslinking“) zwischen den Nucleinsäuren und ihren Proteinen, insbesondere den Histonen, wodurch die DNA-Moleküle sehr starr und empfindlich für mechanische Abscherung werden. Dadurch kann die Funktion von Proteinasen, Polymerasen und Restriktionsenzymen behindert werden (Weiss et al. 1999, Fang et al. 2002). Bei diesem Vorgang ist die Fixierungszeit in Formalin von großer Bedeutung, während die Lagerungsdauer in Paraffin (Alter der Blöckchen) nur äußerst langsam zur Degradierung der DNA beiträgt (Goelz et al. 1985,

Coombs et al. 1999, eigene Untersuchungen). Das Alter der untersuchten Blöckchen reichte von 1 bis 18 Jahren (1985-2003) und schien keinen messbaren Einfluss bezüglich der Menge oder der DNA-Struktur zu haben (Kap. 4.3, Abb. 22).

Bei der Formalinfixierung kommt es dabei zu einem DNA-Abbau. Methodische Untersuchungen zeigen, dass eine Fragmentierung der DNA proportional zur Formalinfixierungsdauer zunimmt (u.a. Ben-Ezra et al. 1991, O'Leary et al. 1994, Coombs et al. 1999, Sato et al. 2001, Fang et al. 2002). Entscheidend ist außerdem der pH-Wert des Formalins (Frank et al. 1996). Die Fragmentlänge von DNA aus Gewebe, welches in 10% gepuffertem Formalin fixiert wurde, betrug in einer Studie von Gall und Mitarbeitern (1993) zwischen 700-1300bp.

Für Markierungsverfahren wie die Nicktranslation oder die Markierung über eine DOP-PCR ist als Ausgangsmaterial hochmolekulare DNA erforderlich. Aus Frischgewebe lässt sich im Durchschnitt 40x soviel DNA extrahieren wie aus Gewebe, das sofort nach der Gewinnung für 24 Stunden in 4% Formalin fixiert wurde. Wird die Fixierung bei 37°C anstatt bei Raumtemperatur vorgenommen, sind die Schäden an der DNA geringer. Wird Gewebe allerdings über 12 Wochen in Formalin gelagert, nimmt die DNA-Menge unabhängig von der Lagerungstemperatur rapide und stetig ab (Jackson et al. 1990).

Die durch die Formalinfixierung degradierte DNA muss zunächst über geeignete DNA-Extraktionsmethoden isoliert werden, wobei eine Fragmentlänge von mindestens 200bp bis 1000bp für eine CGH-Analyse sichergestellt werden sollte (Kallioniemi et al. 1994, eigene Untersuchungen). Im Laufe der letzten Jahre sind eine Reihe von unterschiedlichen Verfahren entwickelt worden, die eine effektive DNA-Extraktion aus Formalin fixierten und paraffiniertem Gewebe in der Routinediagnostik ermöglichen (Coombs et al. 1999, Fang et al. 2002, Wu et al. 2002, eigenes Protokoll siehe Kapitel 3.4.1.1).

Die meisten Techniken zur DNA-Extraktion beinhalten 3 grundlegende Schritte: Deparaffinierung, Verdau und Reinigung der DNA. Das Herauslösen des Wachses mittels Xylol und Ethanol wurde erstmals 1985 beschrieben (Goelz et al. 1985). Danach wurden für das Aufschmelzen des Wachses als Alternative zu organischen Lösungsmitteln Mikrowellen oder Thermalcycler verwendet (Coombs et al. 1999, Fang et al. 2002). Eine ebenso große Bedeutung wie das Schmelzen des Paraffins kommt den nachfolgenden Fällungs- und Reinigungsschritten zu. Angewendet werden u.a. verschieden prozentige Ethanolreihen zur Dehydrierung des Gewebes, Phenol/Chloroform sowie die Chelexpräparation. Chelex ist ein Harz, welches die im

Gewebe enthaltene genomische DNA in Form von Einzelsträngen bindet und entsprechend extrahiert. Der Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden (Proteinausfällung und Chelexpräparation) ergab hinsichtlich Quantität und Qualität keinen Unterschied. Die isolierte Doppelstrang-DNA nach Proteinausfällung hat jedoch den Vorteil, dass sie direkt, also ohne vorherige Amplifikation, in eine Nicktranslations-Reaktion mit markierten Nukleotiden eingesetzt werden kann, während die Einzelstrang-DNA nach Chelexpräparation vorher amplifiziert und anschließend in einem zweiten Schritt markiert werden muss (Bartsch 2000). Fang und Mitarbeiter (2002) konnten hochmolekulare DNA (>190kb) durch graduelle Dehydrierung des Gewebes in Kombination mit der Trocknung des Gewebes an einem kritischen Punkt („critical point drying“) gewinnen.

Die meisten Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Effizienz der DNA-Amplifikation nach DNA-Extraktion aus Formalin fixierten Geweben. Für retrospektive molekulargenetische Untersuchungen ist die effizienteste Methode zur DNA-Gewinnung die Aufreinigung mittels Chelex nach vorherigem Schmelzen des Wachses im Thermalcycler (Coombs et al. 1999). Wiegand und Mitarbeiter (1996) gelang die Amplifikation eines 531bp langen Fragments noch nach 70 Tagen Lagerungszeit in 8% ungepuffertem Formalin. Fang und Kollegen (2002) entwickelten eine neue Methode zur DNA-Isolierung und verglichen die Amplifikationsergebnisse mit isolierten DNAs herkömmlicher Methoden. Die mit der herkömmlichen Methode extrahierte DNA aus Formalin fixierten Gewebe zeigte keine Amplifikation nach PCR, weder eines 403bp noch 1844bp langen Fragments. Die DNA, welche aus Formalin fixierten Gewebe nach gradueller Dehydration und einem speziellen Trocknungsprozess isoliert wurde, zeigte jedoch eine Amplifikation eines 1844bp langen Fragments. Dies ist vergleichbar mit der DNA-Amplifikation aus nativem Gewebe. Wu und Mitarbeiter (2002) fügten ebenfalls einen Trocknungsschritt in das DNA-Extraktionsprotokoll ein und beobachteten eine 5-10fach höhere Amplifikationseffizienz eines Fragments zwischen 90 und 386bp der Exons 3 und 4 des p53-Gens.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 3 verschiedene Methoden zur DNA-Isolierung aus Formalin fixierten Gewebe angewendet (vgl. Kapitel 3.4.1.1, 3.4.1.2, 3.4.1.3). Der Vergleich der drei Extraktionsmethoden ergab hinsichtlich Qualität und Quantität der isolierten DNAs große Unterschiede (siehe Kapitel 4.1.5). Generell erwies sich die Methode der DNA-Extraktion nach Protein-Ausfällung als die bessere für eine anschließende CGH-Analyse. Insbesondere konnte mittels der kommerziell erhältlichen DNA-Isolationskits keine höhermolekulare DNA gewonnen werden. Zudem war die

Ausbeute geringer als nach DNA-Isolierung mit dem laborinternen Protokoll. Dies könnte zum einen darauf beruhen, dass als Protokollvorgabe nur 3-4 Gewebeschnitte zu je 5µm eingesetzt werden sollten. Die zu stark abweichenden Ratiowerte (0,21 bis 4,86) deuten allerdings auf eine persistente Verunreinigung mit Proteinen und RNA hin. Demzufolge dürfte der vorgeschriebene Verdau mit Proteinase K von 30min zu kurz gewesen sein. Daher wurde die DNA von allen 51 in dieser Arbeit untersuchten Fällen nach der Präzipitations-Methode (laborinternes Protokoll) isoliert. In 51% (26 Fälle) lag die mit dieser Methode extrahierte doppelsträngige DNA in der Größenordnung von 200bp bis 800-1500bp vor, die sich problemlos in einer Nicktranslation markieren und für eine CGH-Analyse verwenden ließ.

5.2.2 CGH-Analysen mit DNA aus Paraffingewebe

Die Comparative Genomhybridisierung (CGH) ist ein molekularcytogenetisches Verfahren, das die Vorteile des cytogenetischen Ansatzes, d.h. die Darstellung des gesamten Chromosomensatzes, mit dem molekulargenetischen Ansatz, d.h. die Unabhängigkeit von der mitotischen Aktivität des zu untersuchenden Gewebes verbindet. Diese Methode ermöglicht somit die umfassende Analyse des gesamten Genoms auf Über- und Unterrepräsentationen von DNA-Abschnitten. Um quantitative und reproduzierbare Aussagen über die genetischen Aberrationen treffen zu können, sind leistungsfähige Bildanalysesysteme notwendig, die eine objektive Erfassung von Ort und Art der Veränderungen ermöglichen. Das Ergebnis wird in Form eines CGH-Ratioprofils dargestellt, welches die chromosomale Lokalisation der Zugewinne bzw. Verluste dokumentiert (z.B. Kap. 4.4.1.2, Abb. 25b). Der Vergleich von Test- und Referenz-DNA lässt sich durch den Vergleich der Bildinhalte der FITC-Bilder (Test-DNA mit denen der TRITC-Bilder (Referenz-DNA) ausdrücken. Wesentliche Voraussetzung für diesen Vergleich ist dabei die Übereinstimmung der geometrischen Lage der Bilder und ihre Vergleichbarkeit in den Intensitätsverhältnissen (Roth et al. 1996). Die Auflösung der Methode entspricht der einer Chromosomen-Bänderung, d.h. Zugewinne und Verluste sind erst ab einer Größe von mindestens 5 bis 10Mb nachweisbar (Lapierre & Tachdjian 2005). Dies entspricht ca. einer Chromosomenbande in einem Karyotyp bei einer Bänderungsauflösung von etwa 400 Banden pro haploidem Chromosomensatz (ISCN 2005). Der Nachweis einer 3Mb-Deletion gelang unter Verwendung eines festen Schwellenwertes von 0.75 im Vergleich zum Standardreferenzintervall (Kirchhoff et al. 1999).

Dabei ist die Aussagefähigkeit einer CGH-Analyse abhängig von der Qualität der Hybridisierung, der Qualität der Fluoreszenzbilder und der Bildverarbeitung. Zur Unterdrückung von Rauscheffekten und lokalen Artefakten sowie zum Erhalt statistisch signifikanter Aussagen müssen mehrere Metaphasen eines Falles ermittelt werden. Zur Erzielung abgesicherter Ergebnisse sind daher bei einer Hybridisierung in guter bis mittlerer Qualität mindestens 10 Metaphasen eines Falles auszuwerten (Roth et al. 1996).

Bei der statistischen Auswertung einer CGH kann es methodisch bedingt zu Fehlinterpretationen bezüglich chromosomaler Zugewinne kommen. Abweichungen in den pericentromerischen, heterochromatischen Regionen sowie in den telomernahen Bereichen der einzelnen Chromosomen werden von der Auswertung ausgenommen, da sie zu falsch positiven Ergebnissen im Sinne einer Überrepräsentation führen können. Des Weiteren gibt es sogenannte kritische Chromosomen bzw. Chromosomenbereiche wie 1qh, 1p32->pter, 9qh, 16pq, 17pq, 19, 20q und 22 sowie den langen Arm vom Y-Chromosom, die bei Abweichungen ebenfalls von der Bewertung ausgenommen werden (Bryndorf et al. 1995). Diese Bereiche enthalten relativ viele GC-reiche Sequenzen und ergeben häufig falsch positive DNA-Zugewinne (Kallioniemi et al. 1994). Chromosomale Aberrationen, die diese Bereiche betreffen, müssen folglich mit einer anderen Methode gesichert werden (Yu et al. 1997, Kirchhoff et al. 1998).

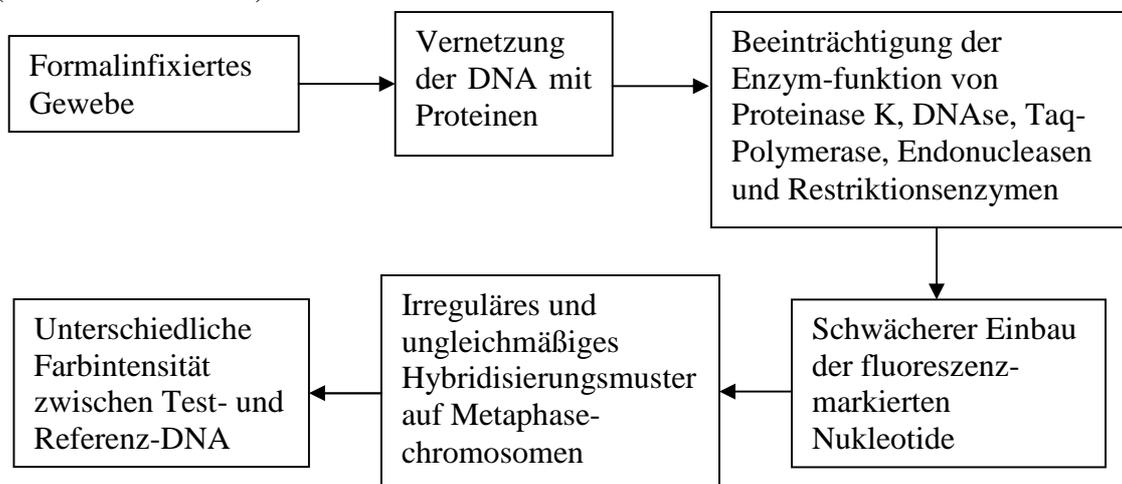
Die Fragmentlänge der zu untersuchenden DNA spielt für die Hybridisierung eine untergeordnete Rolle, solange die Mindestlänge von 500bp gegeben ist (Holdsworth et al. 1994). Die optimale Fragmentlänge für intensive und uniforme Hybridisierungssignale liegt im Bereich von 600-2000bp. Optimalerweise sollten die Fragmente gelabelter DNA von Test- und Referenz-DNA gleiche Längen aufweisen (Kallioniemi et al. 1994). DNA-Produkte aus Formalin fixierten Material sind jedoch in der Regel wesentlich kleiner (etwa 50-1000bp, siehe auch Tabelle D im Anhang). Das bei der CGH verwendete Verfahren der Markierung der DNA über Nicktranslation verstärkt den Effekt der DNA-Fragmentierung noch zusätzlich, da durch die methodisch erwünschten Brüche (siehe Kap. 3.3.2.1) die DNA weiter zerkleinert wird. Durch Formalinfixierung des Ausgangsgewebes sowie durch Nicktranslation der isolierten DNA kommt es demzufolge zur Verkleinerung der Fragmente, die unter Umständen zu klein für gut auswertbare CGH-Experimente sein können. Dies kann zu einer inhomogenen Hybridisierung mit verminderter Signalqualität führen (siehe Kap. 4.4.1, Tab. 43).

Die Qualität der CGH ist weiterhin in hohem Maße abhängig von der Präparation der Metaphasechromosomen. Die Metaphasechromosomen sollten möglichst Cytoplasmafrei sein, da zu viel Cytoplasma eine optimale Denaturation der Chromosomen und Anlagerung der Sonden verhindert. Darüberhinaus kann eine zu starke Hintergrundfluoreszenz auftreten. Ebenso wichtig für eine gute Auswertung sind Chromosomen mit einem Bandenniveau von 400-500 und ein hoher Mitoseindex (wenige Interphasenkerne / viele Mitosen) (Kirchhoff et al. 1999). Wenig überlappende Chromosomen und Chromosomen mit noch nicht separaten Chromatiden sind von Vorteil, da diese von der Karyotypisierung und damit der Berechnung des CGH-Profiles ausgeschlossen werden müssen (du Manoir et al. 1993, Weiss et al. 1999). Zur Auswertung dürfen nur Metaphasen mit einheitlichen Hybridisierungssignalen, geringem Fluoreszenz-Hintergrund und gut gespreiteten und DAPI-gebänderten Chromosomen herangezogen werden (Nacheva et al. 1998, Kirchhoff et al. 1998).

Arnold und Mitarbeiter (2003) verglichen CGH-Ergebnisse aus Hybridisierungen mit frischem und Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe unterschiedlicher Fixierungsdauer. Sie konnten zeigen, dass CGH-Ergebnisse von Geweben, welches länger als 4h fixiert wurde, mit Vorsicht zu interpretieren sind, da die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu frischem Gewebe abnimmt (vgl. Kap. 4.1.5, 4.3). Einen Zusammenhang zwischen „Crosslinked DNA“ aufgrund der Formalinfixierung und nachfolgender CGH beschreiben Weiss und Mitarbeiter (1999, siehe Abb. 48). Dabei kommt es aufgrund vernetzter DNA zur Beeinträchtigung der Markierungsreaktion, so dass es zu einem inhomogenen Hybridisierungsmuster der Test-DNA auf den Metaphasechromosomen kommt.

Abbildung 48:

Flussdiagramm zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen „Crosslinked DNA“ und CGH (nach Weiss et al. 1999)



Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass das Ergebnis der DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe meist schon eine Prognose hinsichtlich einer gut auszuwertenden CGH-Analyse zuließ. In fast allen Fällen, bei denen nur mittel bis stark degradierte DNA isoliert werden konnte, erbrachte die CGH kein Ergebnis, während in allen untersuchten Fällen mit einem DNA-Längenoptimum ein Ergebnis über CGH erzielt werden konnte. Dennoch fielen die Hybridisierungsergebnisse hinsichtlich ihrer Qualität sehr unterschiedlich aus. Trotz längerer DNA-Fragmente im Bereich von 200-700bp konnte in einigen Fällen keine Hybridisierung aufgrund vernetzter DNA wegen langer Formalienfixierung erzielt werden (siehe Fälle O-944/91, O-1362/95, O-1488/96 Tab. D im Anhang). Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die CGH trotz der erschwerten Ausgangsbedingungen in den meisten untersuchten Fällen ein auswertbares Ergebnis lieferte. Allerdings ist es wichtig, das Ergebnis im Zusammenhang mit den in Kapitel 6 dargestellten Limitierungen der Methoden zu interpretieren.

5.2.3 CGH nach DOP-PCR

Für eine CGH-Analyse sind 400-1000µg DNA erforderlich. Durch die Entwicklung effizienter Amplifikationsverfahren ist es nunmehr möglich, auch an kleinsten Mengen der Ausgangs-DNA molekulargenetische Analysen vorzunehmen. Bei der DOP-PCR werden Oligonukleotide mit partiell degenerierten Sequenzen zur universellen Amplifikation des Gesamtgenoms eingesetzt (Telenius et al. 1992). Diese Methode bietet die Möglichkeit, minimale Mengen genomischer DNA zu amplifizieren, um sie damit für weitere genetische Analysen in der Molekularbiologie und Molekularcyto-genetik, wie z.B. der Mutationsanalyse und DNA-Veränderungen spezieller Gene und der CGH nutzbar zu machen (Huang et al. 2000, Hirose et al. 2001). Essentiell für CGH mit DOP-PCR-Produkten ist, dass eine DOP-PCR alle Sequenzen der Template-DNA gleichmäßig amplifiziert. Eine ungleiche Amplifizierung von DNA-Segmenten würde zu Abweichungen im Grün/Rot-Ratioprofil führen (Tsubosa et al. 2005). Zweifellos sollte unter den gewählten PCR-Bedingungen mit niedrigen Annealing- und Primer-Extensions-Temperaturen eine Amplifikation aller DNA-Segmente bei ausreichender Template-DNA erfolgen. Die definierte Basensequenz am 3'-Ende des Primers (ATGTGG) ist etwa alle 400bp zu erwarten, so dass die partielle Anlagerung des Primers unter den nicht stringenten Bedingungen zu einer universellen Vermehrung der genomischen DNA führt (Cheung & Nelson 1996). Es ist daher anzunehmen, dass hoch repetitive DNA-Sequenzen durch den PCR-Prozess überrepräsentiert werden, während weniger häufige Primer-Bindungsstellen zu einer

Unterrepräsentation dieser Fragmente bei der DOP-PCR führen. Dieses könnte dann eine Verschiebung im Hybridisierungsmuster zur Folge haben. Untersuchungen mit spezifischen Mikrosatelliten an DNA nach DOP-PCR zeigten, dass im Vergleich zur genomischen DNA nur in ca. 1/3 der Fälle eine annähernd gleichwertige Amplifikationsrate erzielt wurde. Als Ursache hierfür wurde zum einen das unspezifische Anlagern der Primer und damit zur Bildung unspezifischer DNA angegeben, als auch die Überlappung von DNA-Fragmenten, so dass nur in einem Drittel der Fälle beide Primerstellen pro Mikrosatelliten enthalten sind (Cheung & Nelson 1996).

DNA-Mengen von etwa 0,15ng und Fragmentlängen ab 500bp erbringen in Untersuchungen mittels DOP-PCR immer noch sehr gute Amplifikationsergebnisse (Sanchez-Cespedes et al. 1998). Mehrere Arbeitsgruppen geben an, dass bereits weniger als 100 Zellen für die Durchführung einer aussagekräftigen PCR für Mikrosatelliten oder nachfolgender CGH-Analyse ausreichen (Moskaluk et al. 1997, Marchio et al. 2001, Kitoh et al. 2005). Ebenso können mittels DOP-PCR einzelne, durch Mikrodissektion gewonnene Chromosomen oder Zellen universell amplifiziert werden. Durch die Amplifikation einzelner Chromosomen können so Chromosome Painting-Sonden zur Abklärung chromosomaler Imbalancen gewonnen werden (Guan et al. 1994, Dietze 2000).

Die Kombination von DOP-PCR und CGH wurde erstmals 1993 beschrieben (Speicher et al. 1993). CGH-Analysen nach DOP-PCR einzelner Zellen können zum Aneuploidie-Screening im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik eingesetzt werden (Wells et al. 1999).

Die Qualität der CGH variiert in Abhängigkeit der angewandten DOP-PCR Methode. Kuukasjärvi und Mitarbeiter (1997) berichten, dass sowohl die Effizienz als auch die Gleichmäßigkeit der Amplifikation durch die Einführung einer sogenannten Präamplifikation (1. PCR) wesentlich verbessert war. Die 2. PCR unter Verwendung der Template-DNA aus der Präamplifikation zum Erhalt der uniformen Amplifikation dient ausschließlich der Vermehrung der PCR-Produkte. Der zweite kritische Parameter stellt die Markierung der DNA dar. Der Einbau Fluorochrom markierter Nukleotide in die DNA während der ersten PCR resultierte bereits in einer höheren Signalintensität (Speicher et al. 1993, 1995, Guan et al. 1994).

Tsubosa und Mitarbeiter (2005) untersuchten den Effekt einer DOP-PCR bezüglich der Sensitivität und Spezifität der CGH und erhielten DNA mit Fragmentlängen zwischen 300 und mehreren tausend Basenpaaren. Die Methode basierte auf der Amplifikation

von Sequenzen durch einen oder zwei nach Zufallskriterien ausgewählten Primern, die eine durchschnittliche Länge von 10 Nukleotiden aufweisen. Das Anlagern der Primer ist an vielen Orten (Loci) der DNA möglich. Wenn diese Primingorte sich in einer Entfernung von bis zu 5kb befinden, werden die dazwischenliegenden Sequenzen amplifiziert. Beim Vergleich der Markierungstechniken Nicktranslation und „Random Priming“ konnten sie zeigen, dass die Sensitivität bezüglich der Zugewinne nach Nicktranslation höher und die Sensitivität im Hinblick auf Verlusten nach „Random Priming“ höher war. Falsch positive Veränderungen konnten eher bei der Nicktranslation als beim „Random Priming“ beobachtet werden.

Methodisch hat sich gezeigt, dass die Effizienz einer DOP-PCR vor allem von der Reinheit der Ausgangs-DNA, aber auch von der Konzentration und der Art der verwendeten Polymerase (Enzym) sowie des verwendeten Primers abhängig ist. Die Substitution der Standard-Taq-Polymerase durch die Taq-Plus-Polymerase erhöhte dabei die Größe der PCR-Produkte (Kuukasjärvi et al. 1997, eigene Untersuchungen).

Proben der vorliegenden Arbeit, die nicht mittels Nicktranslation markiert werden konnten, wurden über eine DOP-PCR weniger effizient gelabelt. Eine mögliche Erklärung dafür ist die grundsätzlich schlechtere Qualität der DNA aus Paraffinblöckchen nach vorangegangener Formalinfixierung, da die verwendeten Enzyme in der Effizienz der PCR-Reaktion gestört werden (vgl. Kap. 4.2.1, Abb. 16). Basierend auf diesen und den eigenen Ergebnissen ist im Hinblick auf eine genaue Lokalisation von chromosomalen Aberrationen eine Amplifikation der aus Formalin fixierten Gewebe gewonnenen DNA möglichst zu umgehen. Falls sie jedoch in Einzelfällen notwendig werden sollte, muss man bedenken, dass nach DOP-PCR im Falle einer strukturellen Chromosomenaberration eine Verschiebung der Bruchpunkte von 6-10Mb auftreten kann (Kuukasjärvi et al. 1997, Fritz et al. 2000).

Eine CGH-Analyse nach DOP-PCR nach dem Protokoll von ROCHE und anschließender Markierung der Test-DNA über PCR kam in den eigenen Untersuchungen insgesamt 5 Mal zum Einsatz (vgl. Kap. 4.2.1). In nur einem Fall mit einem kleinen überzähligen Markerchromosom (O-101/85) konnte ein auswertbares Ergebnis nach CGH erzielt werden, die allerdings einen unauffälligen Befund ergab. Höchstwahrscheinlich bestand das Markerchromosom überwiegend aus Centromermaterial. Die centromerspezifischen repetitiven Sequenzen dürften im Rahmen einer DOP-PCR vermehrt amplifiziert werden, während weniger häufige Primer-Bindungsstellen im centromernahen Euchromatin unterrepräsentiert sind. Da jedoch methodisch bedingt repetitive Sequenzen zusätzlich durch Cot1-DNA

abgeblockt werden, war es in diesem Fall nicht möglich, die Herkunft des Markers mittels CGH zu bestimmen.

Eine relativ neue Methode zur universellen Amplifikation genomischer DNA ist die Vermehrung mittels Phi29-Polymerase mit anschließender Markierung über Nicktranslation (vgl. Kapitel 3.4.6.4 und 4.2.2). In 7 Fällen, in denen nur eine geringe Menge an Ausgangs-DNA (6,1-762ng DNA, siehe Tab. 40) zur Verfügung stand, wurde vor der Markierung der DNA über Nicktranslation eine Amplifikation durchgeführt. In 2 Fällen (28,6%) konnte ein pathologischer Befund nach CGH erhoben werden (siehe Fallbeschreibung O-515/88 Kap. 4.4.2.1 und Fall 306/03 Tab. C im Anhang). In 5/7 Fällen (71,4%) erbrachte die universelle Amplifikation mit anschließender vergleichender Genomhybridisierung nach Nicktranslation kein Ergebnis. Für das Nichtgelingen der CGH ist in allen Fällen jedoch eine mittel bis hochgradig degradierte DNA verantwortlich zu machen.

5.3 Korrelation der CGH-Ergebnisse mit cytogenetischen Befunden

Zur retrospektiven Abklärung von Abortursachen fand die CGH in verschiedenen Studien Anwendung und wird daher bei der Suche nach Aneuploidien und Charakterisation struktureller Imbalancen eingesetzt. Einige dieser Studien untersuchen die Korrelation cytogenetischer Befunde mit CGH-Ergebnissen an nativen und fixierten Geweben. Generell lassen sich Aneuploidien mittels CGH gut nachweisen. So liegt die Detektionsrate für Aneuploidien zwischen 75% und 100% (Yu et al. 1997, Daniely et al. 1999, Lomax et al. 2000, Ozcan et al. 2000, Bell et al. 2001, Fritz et al. 2001, eigene Untersuchungen, vgl. Tab. 52).

Beim Nachweis struktureller Aberrationen sind jedoch größere Abweichungen zu den cytogenetischen Vorbefunden zu beobachten. Hier liegt die Detektionsrate zwischen 50% und 100%, wobei die niedrigsten Werte bei Untersuchungen an Formalin fixierten Geweben lagen (Yu et al. 1997, Ozcan et al. 2000, eigene Untersuchungen). Im eigenen Untersuchungsgut wurden dabei 16 Fälle mit Formalin fixierten Geweben untersucht. Die Detektionsrate lag hier im Vergleich zu nativen Geweben bei 47% vs. 100% (Tab. 52).

Tabelle 52:

CGH an Formalin fixierten und nativem Abortgewebe im Vergleich mit Cytogenetik (Yu et al. 1997, Daniely et al. 1999, Lomax et al. 2000, Ozcan et al. 2000, Bell et al. 2001, Fritz et al. 2001, eigene Untersuchungsergebnisse)

	formalinfixiertes Gewebe		eigene Untersuchungen		
	Ozcan et al. 2000	Bell et al. 2001	Gesamt	formalinfixiertes Gewebe	natives Gewebe
Fälle gesamt	18	9	51		
CGH erfolgreich gesamt	18 (100%)	9 (100%)	42 (82%)	33	9
CGH+Cytogenetik nur CGH	22	9	29	22	7
			13	11	2
normaler Karyotyp neu diagnostiziert	10 10/10 (100%)	-/-	12 12/12 (100%)	4 4/4 (100%) 6	2 2/2 (100%) -/-
Aneuploidien neu diagnostiziert	10 10/10 (100%)	8 6/8 (75%)	10 10/10 (100%)	2 2/2 (100%) 4	3 3/3 (100%) 1
Strukturaberrationen neu diagnostiziert	2 1/2 (50%)	-/-	18 9/18 (50%)	15 6/15 (46,6%) 1	2 2/2 (100%)
Polyploidie	-/-	1 0/1	2 0/2	1 0/1	1 0/1
Übereinstimmung CGH+ Cytogenetik gesamt	95%	67%	74%	55%	100%
	natives Gewebe/Zelllinien				
	Yu et al. 1997	Daniely et al. 1999	Lomax et al. 2000	Fritz et al. 2001	
Fälle gesamt	11	50	301	60	
CGH erfolgreich gesamt	11 (100%)	50 (100%)	253 (84,1%)	57 (95%)	
CGH+Cytogenetik nur CGH	11	23/50 27/50	253 10	57	
normaler Karyotyp	-/- 9 9/9 (100%)	24 9 8/9 (88,9%)	98 92/98 (94%) 133 131/133 (98,5%)	17 17/17 (100%) 32 32/32 (100%)	
Aneuploidien					
Strukturaberrationen	2 2/2 (100%)	-/-	7 6/7 (86%)	1 1/1 (100%)	
Polyploidie	-/-	-/-	25 0/25	7 4/7 (57,1%)	
Übereinstimmung CGH+ Cytogenetik gesamt	100%	96%	93%	95%	

Im eigenen Untersuchungsgut lag in den 13 untersuchten Fällen ohne cytogenetische Vordiagnostik die generelle Aberrationsrate bei 53,8%. In 4 Fällen (30,8%) fand sich eine Aneuploidie und in einem Fall (7,7%) eine Strukturaberration. Weitere 6 Fälle (46,1%) zeigten ein unauffälliges CGH-Ergebnis, wobei in 2 Fällen (15,4%) anhand einer Mikrosatellitentypisierung eine Triploidie nachgewiesen werden konnte. Diese Daten korrelieren weitestgehend mit den Angaben anderer Abortstudien (Hassold 1996, Kalousek et al. 1993).

Wertigkeit der CGH im Rahmen chromosomaler Imbalancen bei Aborten

Die Comparative Genomhybridisierung ist eine geeignete Methode zur Detektion genetischer Imbalancen, wobei die Frage der Sensitivität noch nicht ausreichend geklärt ist (u.a. Ozcan et al 2000, Tönnies et al. 2001, Weiss et al. 2003). Das Detektionslimit für Deletionen liegt bei ca. 10Mb (Kallioniemi et al. 1994). Theoretische Berechnungen gehen davon aus, dass DNA-Verluste in der Größenordnung von 2Mb auch unter optimierten Bedingungen nicht zu detektieren sind (Piper et al. 1995). So konnte eine Deletion von 5Mb Länge für das Smith-Magenis-Syndrom nachgewiesen werden, eine 2Mb große Deletion für das Williams-Beuren-Syndrom jedoch nicht (Joly et al. 2001). Die Anwendung statistischer Schwellenwerte (Grenzwerte) und Ersetzen der Metaphasechromosomen durch definierte immobilisierte DNA-Sequenzen als Ziel-DNA erlaubte erst die Detektion kleinerer Imbalancen in einer Größenordnung von 75 – 130kb (Solinas-Toldo et al. 1997).

Die Sensitivität der CGH ist definiert durch die Abhängigkeit von Anteil und Größe der Kopieveränderung. Die kritische Grenze detektierbarer Genomveränderungen mittels CGH wird derzeit auf 5-10Mb geschätzt. Dies entspricht ca. einer Bande in einem Karyotyp mit einer Auflösung von ca. 400 Banden (gemäß International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN 2005) (Kirchhoff et al. 1998, Bentz et al. 1998).

Die DNA-Struktur und die Chromosomen-Morphologie nach Denaturierung sind für diese Limitierung verantwortlich (Kallioniemi et al. 1994). Zudem ist die Sensitivität für den Nachweis einer Deletion abhängig von dem Ploidielevel der Test-DNA. Es ist schwieriger, den Verlust eines Chromosoms in einer tetraploiden Zelllinie nachzuweisen als in diploiden Zellen. Der Ratiowert würde sich im erstgenannten Fall auf 0,25 verringern.

Im eigenen Untersuchungsgut mit unauffälligem CGH-Ergebnis lag in 15 Fällen ein Chromosomenbefund vor, der im Rahmen einer Pränataldiagnostik bzw. an Hand von Abortmaterial erhoben wurde. In insgesamt 10/15 Fällen konnte der aberrante Karyotyp mittels CGH an Formalin fixierten Geweben nicht bestätigt oder präzisiert werden (siehe Tab. 43 Kap. 4.4.1 und Tab. C im Anhang). Die Rate von falsch negativen Ergebnissen betrug demnach 67%. Nicht erkannt wurden vorrangig kleine Markerchromosomen und Ringchromosomen mit endständigen Bruchpunkten, die zum Teil in Mosaikform vorlagen. Ebenfalls konnte eine kleinere interstitielle Deletion in Mosaikform sowie zwei unbalancierte Translokationen nicht detektiert werden. Die fetalpathologische Untersuchung der Feten oder des Abortmaterials ergab jedoch

auffällige Phänotypen bzw. Histologiebefunde, so dass der Verdacht auf eine chromosomale Aberration vorlag.

In zwei Fällen mit einer CGH-Analyse an nativem Gewebe konnte der Chromosomenbefund dagegen bestätigt werden. Die Detektionsrate betrug hier 100%.

5.3.1 CGH-Analyse mit unauffälligem CGH-Profil

In etwa der Hälfte der mit CGH untersuchten Fälle (22/42) wurde ein unauffälliger CGH-Befund erstellt.

5.3.1.1 Feten mit Syndromverdacht

In 3 Fällen bestand nach der fetalpathologischen Untersuchung der Verdacht auf ein genetisches Syndrom (Hydrops fetalis, V.a. Noonan-Syndrom, V.a. Thanatophore Dysplasie). In diesen Fällen erbrachte die CGH-Analyse einen unauffälligen Befund. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in diesen Fällen genetische Imbalancen vorliegen, die mit einer CGH-Analyse nicht erfasst werden können (vgl. Kap. 5.2.2). Beim Verdacht eines Noonan-Syndroms kann auch eine Genmutation im *PTPN11*-Gen und bei der Thanatophoren Dysplasie ein Defekt im *FGFR3*-Gen vorliegen, die mittels CGH jedoch nicht nachweisbar sind (Rousseau et al. 1996, Schlüter et al. 2003).

Bei der Untersuchung von 233 *missed abortions* fanden sich in 200 der Fälle (86%) wachstumsdisorganisierte Feten oder isolierte/multiple Defekte. In 221 der mittels GTG-Bänderung karyotypisierten Feten lag in 165 der Fälle (75%) ein abnormer Karyotyp vor. In 56 der Fälle mit normalem Karyotyp wiesen dagegen 40 Feten (71%) schwere, multiple/isolierte Defekte auf. Ursächlich hierfür können zum einen Gendefekte zur Wachstums- und Entwicklungsregulation sein, die mittels Cytogenetik und/oder CGH nicht nachweisbar sind. Zum anderen sollten auch nichtgenetische Ursachen für die beschriebenen Entwicklungsdefekte in Betracht gezogen werden (Philipp et al. 2003).

5.3.1.2 Verdacht auf chromosomale Aberration

Numerische Aberrationen wie autosomale Trisomien kommen in 50-60% und eine Monosomie X in 10-15% in Spontanaborten und bei morphologisch auffälligen Feten vor (Eiben et al. 1990, Pauer et al. 1999). Die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen in Spontanaborten nimmt mit zunehmender Schwangerschaftswoche ab. So beträgt die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen

in der 13. SSW noch ca. 45%, während diese in der 23. SSW bei ca. 12 % liegt (Pauer et al. 1999, Fritz 2002).

Aufgrund der methodisch-technischen Schwierigkeiten einiger kritischer Chromosomen (siehe Kap. 5.2.2) sind die in der Fetalpathologie sehr häufigen Chromosomenaberrationen wie die Trisomie 16 oder 22 erschwerend nachzuweisen. Hier müssten die Ergebnisse durch weiterführende molekulargenetische Analysen, z.B. über eine Untersuchung von chromosomenspezifischen hochpolymorphen Mikrosatelliten, abgesichert werden. Die Trisomien für die Chromosomen 16 und 22 kommen hauptsächlich in frühen Spontanaborten vor (Fritz 2002).

In 8 Fällen wurde nach der fetalpathologischen Untersuchung der Verdacht auf eine Chromosomenstörung geäußert. In 3 Fällen wurden eine Trisomie 21, einmal eine Trisomie 13, einmal ein Turner-Syndrom, zweimal eine Triploidie und einmal eine allgemeine Chromosomenstörung in einem Frühabort vermutet. In diesen Fällen ergab die CGH-Analyse einen unauffälligen Befund.

Im Fall O-1896/01 wurde eine Chorionzottenbiopsie bei auffälligem Ultraschallbefund durchgeführt. Die Chromosomenanalyse aus der Kurzzeitkultur (KZ) ergab ein 30%iges Mosaik für ein überzähliges Chromosom aus der D-Gruppe, welches jedoch nicht näher spezifiziert werden konnte, während die Langzeitkultur (LZ) einen numerisch unauffälligen Karyotyp ergab. Die CGH-Analyse an fetalem Gewebe zeigte im vorliegenden Fall einen unauffälligen Karyotyp. Demzufolge dürfte der Karyotyp aus der LZ den fetalen Karyotyp repräsentieren, der durch die CGH bestätigt werden konnte.

Diskrepante Chromosomenbefunde zwischen KZ und LZ von Chorionzotten sind beschrieben. Für eine KZ werden Zellen vom Cytotrophoblast mit seinem hohen mitotischen Index und vielen spontanen Teilungen für eine direkte Chromosomenpräparation genutzt. Im Gegensatz dazu stammen die für die LZ gewonnenen Chromosomen aus Zellen der mesodermalen Scheibe. Cytogenetische Unterschiede zwischen direkter Chromosomenpräparation und Chorionvilli-Kultur können demnach durch den verschiedenen Ursprung dieser Gewebe und dem Entstehungszeitpunkt eines postzygotischen Non-disjunction während der Embryogenese erklärt werden. In 13 untersuchten CVS fanden sich in 77% der KZ aberrante Befunde, während die LZ einen unauffälligen Karyotyp ergab (Crane & Cheung 1988).

Im Fall O-2017/02 (vgl. Kap. 4.4.1.2) ergab die fetalpathologische Untersuchung einen komplexen Herzfehler, der charakteristisch für ein Down-Syndrom ist. Die

Chromosomenanalyse aus Abortzotten ergab einen weiblichen, numerisch unauffälligen Karyotyp. Zum Ausschluss einer kryptischen Veränderung mit Involvierung der „Down-kritische Region“ wurde eine Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung mit einer locusspezifischen Sonde (Loci D21S259, D21S341 und D21S352) mit einer Länge von ca. 250Kb durchgeführt. Diese ergab in allen analysierten Metaphasen zwei regelrechte Signale. Da bei Verwendung von Abortzotten eine Anzüchtung mütterlicher statt fetaler Zellen bei weiblichem Karyotyp grundsätzlich nicht vollständig auszuschließen ist, sollte eine CGH-Analyse aus fetalem Gewebe das Ergebnis überprüfen. Diese Untersuchung zeigte ebenfalls ein unauffälliges weibliches CGH-Profil. Es ergab sich somit kein Hinweis auf eine Trisomie 21. Die Nachweisbarkeit einer Trisomie 21 mittels CGH an DNA aus Formalin fixierten und Paraffin eingebettetem Gewebe konnte an einem anderen Fall unter Beweis gestellt werden (vgl. Fall O-2051/03 Tab. C im Anhang).

5.3.2 CGH-Analyse mit auffälligem CGH-Profil

5.3.2.1 Nachweis von autosomalen Trisomien

Die gepoolten Daten von nahezu 20000 karyotypisierten Spontanaborten zeigen, dass autosomale Trisomien mit ca. 58% aller Chromosomenanomalien die häufigste Aberration sind. Dabei kommen im 1. Trimester frühletale Trisomien vor (Trisomie 16 mit 32%, Trisomie 22 13%, Trisomie 21 8% und Trisomie 15 mit 7%). In der 13.-16. SSW treten dagegen spätletale Trisomien auf, während in der 17.-24.SSW ausschließlich Trisomien für die Chromosomen 13 und 18 beobachtet wurden (Fritz 2002). Trisomien für die Chromosomen 3 und 12 kommen in Frühaborten eher selten vor (Philipp et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit ließen sich in 6 Fällen autosomale Trisomien nachweisen (zweimal eine Trisomie 3, je einmal eine Trisomie 12, 13, 18 und 21, siehe Tabelle C). Dabei konnten eine pränatal an Amnionzellen diagnostizierte Trisomie 21 und eine Trisomie 3 an Abortzotten mit Hilfe der CGH bestätigt werden. Des Weiteren wurden 4 Aneuploidien in Aborten ohne cytogenetischer Vordiagnostik nachgewiesen. Trisomien sind in der Regel mittels CGH gut nachweisbar. Dies bestätigen mehrere Untersuchungen sowohl an nativen als auch fixierten und in Paraffin eingebetteten asservierten Geweben (vgl. Kap. 5.3, Tab. 52).

5.3.2.2 *Nachweis gonosomaler Chromosomenaberrationen*

Eine Monosomie X kommt in 10-15% bei Spontanaborten vor (Pauer et al. 1999). Sie stellt sich nach Hybridisierung auf männliche Metaphasechromosomen durch eine Unterrepräsentation des X-und Y-Chromosoms dar.

Im eigenen Untersuchungsgut wurden in 4 Fällen gonosomale Aneuploidien detektiert. In jeweils 2 Fällen lagen eine Monosomie X bzw. ein XXY-Karyotyp vor. In den Fällen mit einer Monosomie X (O-750/88, O-1154/93) erlaubte die CGH im Zusammenhang mit den morphologischen Erscheinungen des Feten eine eindeutige Karyotypbestimmung.

Im Fall O-750/89 wurde pränatal aufgrund eines im Ultraschall sichtbaren ausgeprägten Hygroma colli sowohl eine Chorionzottenbiopsie als auch eine Amniocentese durchgeführt. Die Chromosomenanalyse aus beiden Geweben ergab diskrepante Ergebnisse [CVS: 46,X,?del(X)(q23qter) vs. AC: 45,X], so dass retrospektiv eine CGH-Analyse an drei fetalen Geweben (Lunge, Niere, Zotten) die Chromosomenaberration präzisieren sollte. Die statistische Auswertung des Ratioprofils zeigte in allen drei Hybridisierungen einen Verlust des kompletten X-Chromosoms bei gleichzeitigem Nichtvorhandensein eines weiteren Geschlechtschromosoms. Da auch die mittels CGH untersuchten Zotten eine Monosomie X ergaben, könnte die in der CVS gefundene Deletion an einem X-Chromosom eine auf die Placenta beschränkte Zelllinie sein (confined placental mosaicism). Während der Fetus und die Placenta die gleiche gewebliche Abstammung haben, reflektiert das CVS-Gewebe nicht immer den fetalen Karyotyp (Crane & Cheung 1988). Cytogenetische Diskrepanzen zwischen Chorionzotten und Amnionzellen oder fetalem Gewebe kommen mit einer Häufigkeit von 1-2% vor (Verjaal et al. 1987, Ledbetter et al. 1992, Pittalis et al. 1994, Wolstenholme 1994, Farra et al. 2000).

Zwei Feten (O-1946/02, O-2039/03) wiesen im Ultraschall multiple Fehlbildungen auf, so dass eine Interruptio durchgeführt wurde. Im Fall O-1946/02 lag eine POTTER-Sequenz als Folge einer beidseitigen Nierenagenesie vor und im Fall O-2039/03 ein hypotropher Fet mit fortgeschrittenem Hydrocephalus internus. An Abortzotten wurde ein 47,XXY-Karyotyp diagnostiziert. In beiden Fällen konnte der Chromosomenbefund mittels CGH bestätigt werden. Das Klinefelter-Syndrom lässt sich über einen Zugewinn des X-Chromosoms bei Anwesenheit eines Y-Chromosoms in der statistischen Auswertung der CGH nachweisen. Dies deutet auf eine XXY-Konstellation hin, wobei allerdings ungeklärt bleibt, ob es sich um einen 47,XXY-Karyotyp oder eine Triploidie

(69,XXY) handelt. Die Chromosomenanalysen an Abortzotten bestätigten jedoch den 47,XXY-Karyotyp.

Bei den vorliegenden Fällen war die Kombination von 47,XXY-Karyotyp mit multiplen Fehlbildungen ungewöhnlich. Neurere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass ein relativ großer Anteil von Feten mit einem Klinefelter-Syndrom nicht bis zur Geburt überlebt. In einer Studie von 259 karyotypisierten Aborten fand sich in 9 Fällen (3,4%) ein 47,XXY-Karyotyp. Fehlbildungen waren nicht beschrieben. Diese Rate liegt damit 40x höher als die Inzidenz des Klinefelter-Syndroms unter Lebendgeborenen (Ljunger et al. 2005).

5.3.2.3 *Nachweis von Deletionen / Sonderform Ringchromosomen*

Im Rahmen einer klinischen Diagnostik zeigte sich die CGH als effiziente Methode zur Abklärung von unbekanntem Chromosomenmaterial, auch in Fällen mit subtilen Rearrangements (Levy et al. 1997, Wegner et al. 1996, Kirchhoff et al. 1998, Breen et al. 1999). Da centromernahe Sequenzen von der Profilerstellung ausgeschlossen werden, werden Verluste des p-Arms von acrozentrischen Chromosomen nicht errechnet (vgl. Kap. 5.2.2). Aberrationen in Telomernähe und am Chromosom 19 lassen sich nur sehr schwer nachweisen, da sie repetitive Sequenzen in hoher Zahl enthalten. Die Degradierung alter DNA (aDNA) ist auf die DNA der Telomerregionen konzentriert, während andere chromosomale Regionen besser geschützt sind (Hummel et al. 1999).

In 5 Fällen (O-212/86, O-643/88, O-944/91, O-955/91, O-1035/92, siehe Tabelle C) wurde pränatal an kultivierten Amnionzellen eine partielle Deletion diagnostiziert. In zwei Fällen ergab die cytogenetische Chromosomenanalyse je eine interstitielle Deletion des Chromosomes 3 und 9. In 2 Fällen lag eine terminale Deletion des langen Arms eines Chromosoms 4 und in einem Fall eine terminale Deletion 13q vor. In einem Fall (O-1035/92) konnte der pränatale Befund einer interstitiellen Deletion in Mosaikform bestätigt werden. In 2 Fällen (O-944/91, O-955/91) mit terminaler Deletion konnte kein Ergebnis über CGH aufgrund mittel bis stark degradiertes DNA erzielt werden (vgl. Tab. D). In den anderen beiden Fällen (O-212/86, O-643/88) verifizierte die CGH-Analyse die Deletion. Es ergaben sich hier andere Bruchpunkte als pränatal vordiagnostiziert. Die deletierten Bereiche erschienen nach CGH kleiner als cytogenetisch bestimmt [O-212/86: del(3)(p11p14) vs. dim(3)(p12p14); O-643/88: del(4)(q31.3->qter) vs. dim(4)(q32-<qter)] (vgl. auch Kap. 5.5.2 und 5.5.3).

In sieben in dieser Arbeit untersuchten Fällen (O-162/85, O-515/88, O-542/88, O-633/88, O-1362/95, O-1485/96, O-1488/96, vgl. Tab. A und B im Anhang) wurde pränatal an kultivierten Amnionzellen ein Ringchromosom diagnostiziert. Involviert waren die Homologen zu den Chromosomen 13 (1x), 14 (2x), 18 (3x) und 19 (1x), wobei in einem Fall ein Mosaik beschrieben wurde. Die beschriebenen Stückverluste der Ringchromosomen an den Chromosomenenden waren sehr klein.

In 3/7 Fällen (42,8%) konnte kein Ergebnis erzielt werden. In einem Fall ergab die CGH-Analyse ein unauffälliges Ergebnis.

In 2 Fällen (O-162/85, O-542/88) waren keine Bruchpunkte im cytogenetischen Vorbefund angegeben. Im Fall O-162/88 konnte durch die CGH-Analyse eine Deletion im langen Arm von Chromosom 18 nachgewiesen und der Befund somit näher charakterisiert werden. Der Verlust im kurzen Arm des beteiligten Ringchromosoms konnte nicht nachgewiesen werden, so dass anzunehmen ist, dass dieser sehr terminal im p-Arm liegt. Im Fall O-515/88 konnte der Bruchpunkt präzisiert werden. Aufgrund der CGH-Analyse wird dieser mehr distal angegeben als an Abortmaterial bestimmt. Das deletierte Segment ist demzufolge kleiner als cytogenetisch angegeben [$\text{del}(13)(\text{p}12\text{q}13/14)$ vs. $\text{dim}(13)(\text{q}21.1\text{qter})$, vgl. Fallbeschreibung 4.4.2.1].

Im Hinblick auf das limitierte Auflösungsvermögen einer CGH sind kleinere Rearrangements besonders im terminalen Bereich der Chromosomen schwierig zu identifizieren (Fritz et al. 2000). Für den Nachweis solcher subtiler Veränderungen ist die Qualität der Test-DNA ein entscheidendes Kriterium (Breen et al. 1999). Ebenso wird das verhältnismäßig geringe Auflösungsvermögen wesentlich durch die Hybridisierungsmatrix bestimmt. Zum einen stellen Metaphasechromosomen eine stark kondensierte Form der DNA dar. Zum anderen bedingt die hybridisierte DNA eine weitere Einschränkung, da die markierten DNA-Fragmente eine durchschnittliche Länge zwischen 200 und 2000bp haben (Petersen et al. 1996)

5.3.2.4 *Nachweis von Duplikationen / Sonderform überzählige Markerchromosomen*

Intrachromosomale Duplikationen sind mittels CGH-Analyse sicher zu erfassen, wenn sie ausreichend groß sind (Kirchhoff et al. 1998, Aviram-Goldring et al. 2000, Bartsch et al. 2001). Im Rahmen einer klinischen Diagnostik zeigte sich die CGH als effiziente Methode zur Abklärung von unbekanntem Chromosomenmaterial, auch in Fällen mit subtilen Rearrangements (Bryndorf et al. 1995, Levy et al. 1997, Breen et al. 1999). Unter Verwendung eines restriktiven Schwellenwertes gelang es der Arbeitsgruppe von Ghaffari (1998), sogar kryptische subtelomerische Rearrangements nachzuweisen.

Dabei ließen sich mit dieser modifizierten Technik partielle Trisomien leichter nachweisen als Monosomien.

Im eigenen Untersuchungsgut war bei 2 Fällen eine Duplikation vordiagnostiziert. In je einem Fall lag eine interstitielle 2p-Duplikation und eine terminale Duplikation 13q vor, die auf dem Boden einer maternalen pericentrischen Inversion entstanden ist. Im Fall der 2p-Duplikation (306/03) ergab die Auswertung des Ratio-Profiles einen Zugewinn für den Bereich 2p13p22 und konnte somit den perinatal erstellten Chromosomenbefund bestätigen. Im Fall O-684/89 zeigte die CGH-Analyse eine Duplikation für 13q32->qter. Das duplizierte Segment weicht im Ratioprofil um zwei cytogenetische Banden vom cytogenetischen Vorbefund ab und ist demzufolge kleiner als beschrieben [dup(13)(q22->qter vs. enh(13)(q32qter)].

In fünf in dieser Arbeit untersuchten Fällen (O-101/85, O-317/87, O-875/90, O-895/90, O-1919/01) wurde pränatal an kultivierten Amnionzellen ein überzähliges Markerchromosom diagnostiziert. In nur einem Fall (O-1919/01 vgl. Kap. 4.4.2.6) konnte die chromosomale Herkunft des überzähligen Markerchromosoms mit einem Mosaikanteil von 54 % bestimmt und der Anteil der involvierten chromosomalen Regionen verifiziert werden. Die CGH-Analyse wurde jedoch mit DNA aus nativem asservierten Gewebe durchgeführt (Kap. 4.1.2). Die chromosomale Herkunft wurde zunächst mittels Multicolor-FISH Chromosom 2 zugeordnet. Die CGH-Auswertung des Ratio-Profiles ergab dann einen Zugewinn im Bereich 2p13->q13. Dieses Ergebnis konnte durch Mikrodisektion des Markers und Reverser Hybridisierung bestätigt werden. In den anderen Fällen lag das Markerchromosom in Mosaikform vor, z.T. betrug der Anteil der markertragenden Zellen weniger als 50%. Chromosomale Mosaikanteile unter 50% sind im Allgemeinen mit CGH nur sehr schwer nachweisbar, da ein Verdünnungseffekt des untersuchten Gewebes auftritt (du Manoir et al. 1993).

Generell kann die CGH jedoch zur Abklärung der Struktur und Herkunft zusätzlicher Markerchromosomen beitragen. Bei sechs mit CGH untersuchten Markerchromosomen konnten diese in 3 Fällen näher charakterisiert werden, während die anderen 3 Fälle ein normales CGH-Profil zeigten (Belloso et al. 2005). Diskutiert wurde dies mit euchromatinfreien und nur aus repetitiven Sequenzen bestehenden Markern. In einem weiteren Fall konnte ein auf 2Mb-Größe bestimmtes Markerchromosom der(22) mittels CGH nicht dargestellt werden, da dieses unterhalb der Nachweishöhe für eine CGH liegt (Mark et al. 2005).

Die CGH ist daher nur unter bestimmten Bedingungen zum Nachweis überzähliger Markerchromosomen geeignet:

- Der Mosaikstatus sollte $> 50\%$ sein.
- Centromermarker oder Marker mit geringem Euchromatinanteil sind methodisch bedingt nicht nachweisbar (siehe Kap. 5.2.2).
- CGH mit DNA aus frischem Gewebe eignet sich besser als DNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe (siehe Kap. 4.1.5)
- Anwendung von Zusatzuntersuchungen ist erforderlich.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse bezüglich chromosomaler Duplikationen und Deletionen kann festgestellt werden, dass diese mittels CGH-Analyse sicher erfasst werden, wenn sie ausreichend groß sind (Bartsch et al. 2000, Goumy et al. 2005). Das durch Array CGH gewonnene größere Auflösungsvermögen ermöglicht die Detektion kryptischer, auch terminaler chromosomaler Aberrationen bis hin zum Nachweis einer Duplikation im Bereich von 0,4-0,8Mb (Sanger et al. 2005, Van Esch et al. 2005). Es zeigt sich zwar im Allgemeinen eine Übereinstimmung der CGH-Ergebnisse mit den über konventionelle Cytogenetik ermittelten Bruchpunkten im Falle von DNA aus nativem Material. High Resolution-CGH (HR-CGH) oder Array-CGH ermittelten jedoch präzisere Bruchstellen der in die Aberrationen involvierten Chromosomen (Kirchhoff et al. 2001, Hwang et al. 2005, Ren et al. 2005).

Mittels HR-CGH konnte bei 8 Patienten mit mentaler Retardierung und normalem Karyotyp chromosomale Imbalancen detektiert werden. Bei 5 Patienten mit balanciert erscheinendem Karyotyp konnten in allen Fällen zusätzliche strukturelle Aberrationen nachgewiesen werden. In 9 Fällen mit auffälligem, aber unzureichend über G-Bänderung spezifizierten Aberrationen gelang mit HR-CGH die präzise Charakterisierung der in die Strukturaberration involvierten Chromosomenstücke. Das Auflösungsvermögen für eine HR-CGH betrug in dieser Studie 3Mb (Kirchhoff et al. 2001).

5.3.2.5 *Nachweis unbalancierter Translokationen*

Balancierte reziproke Translokationen mit einer Inzidenz von 1:625 sind die am häufigsten vorkommenden Strukturaberrationen (Van Dyke et al. 1983). Die Rate unbalancierter Translokationen preimplantierter Embryonen beträgt ca. 80% (Lim et al. 2004). Die Rate bei Lebendgeborenen liegt dagegen nur bei 0,25% (Jacobs 1990). Vermutlich findet eine sehr frühzeitige Eliminierung eines Großteils der unbalancierten

Embryonen statt, die meisten bereits vor Erkennen einer Schwangerschaft (Lords-Sanchez et al. 2005).

Im eigenen Untersuchungsgut wurde in 7 Fällen pränatal oder an Abortmaterial eine unbalancierte Translokation diagnostiziert. In 2 Fällen (O-114/85, O-1475/96) ergab die CGH-Analyse aufgrund starker DNA-Degradierung kein Ergebnis (vgl. Tab. C und D im Anhang). In 2 Fällen (O-665/89, V-1738/94) konnte die bei den Feten zugrunde liegende Strukturveränderung nicht erkannt werden. Die CGH ergab hier ein unauffälliges Ergebnis. Im Fall O-665/89 konnte lediglich degradierte DNA aufgrund langer Formalinfixierungszeit isoliert werden (siehe Kap. 5.2.1, vgl. Tab. D). Im Fall V-1738/94 ist eine Kontamination mit mütterlicher DNA aus Deciduagewebe sehr wahrscheinlich, da die CGH ein unauffälliges weibliches Profil zeigte. Demnach liegt ein Verdünnungseffekt vor, bei dem die mütterliche gegenüber der kindlichen DNA überwiegt.

In einem weiteren Fall (O-506/88) lag kein Ergebnis einer Chromosomanalyse wegen fehlendem Zellwachstum in Kultur vor, wobei beim Vater jedoch eine balancierte Translokation bekannt war.

In 3/7 Fällen (42,8%) mit unbalancierter Translokation (O-236/86, O-506/88, V-1771/95) konnte diese mittels retrospektiver CGH-Analyse erfasst werden. Im Fall O-236/86 ergab die cytogenetische Chromosomenanalyse des Feten ein Derivatvchromosom 22 bei bekannter paternaler reziproker Translokation [46,XY,t(5;22)(p13;q13)]. Demzufolge lag beim Fet eine partielle Trisomie 5p13->pter und partieller Monosomie 22q13->qter vor. Die CGH-Auswertung zeigte lediglich eine Duplikation für 5p15.1->pter. Der Bruchpunkt wich damit um 2 chromosomale Banden im terminalen Bereich ab. Ebenso konnte der Verlust in 22q13 nicht detektiert werden, da die Deletion wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze der CGH liegt. Die Diskrepanz der Bruchpunkte dürfte auf die Degradierung der Ausgangs-DNA des Feten zurückzuführen sein (vgl. Kap. 5.2.1).

Im Fall O-506/88 wurde klinisch beim Fet ein Deletionssyndrom 13q diagnostiziert. Die cytogenetische Familienanalyse ergab eine balancierte Translokation t(13;20)(q21.3p13) beim Vater. Die CGH-Analyse an fetalem Gewebe zeigte einen Verlust für die Region 13q22->qter an. Die partielle Monosomie für 20p13 konnte nicht detektiert werden, da der chromosomale Verlust zu klein und damit unterhalb der Nachweisgrenze der CGH-Analyse liegt. Der Bruchpunkt für 13q konnte jedoch mittels CGH verifiziert und mit 46,XX, dim(13)(q22qter) beschrieben werden.

Im Fall V-1771/95 zeigte die Chromosomenanalyse an Abortzotten ein Derivatvchromosom mit unbekanntem Chromosomenmaterial im kurzen Arm von Chromosom 22 (siehe Fallbeschreibung Kap. 4.4.2.4). Die CGH-Analyse ergab jedoch eine Trisomie 12, so dass anzunehmen ist, dass in der Placenta zwei verschiedene Zelllinien vorhanden waren (vgl. auch Kap. 5.5.4).

Es ist anzumerken, dass die genauen Bruchpunktregionen mit Hilfe der CGH nicht immer eindeutig anzugeben waren. Dies dürfte auf die inhomogene Hybridisierung durch degradierte Ausgangs-DNA bedingt sein, die zu Problemen bei der statistischen Auswertung führte. Auch wiederholte Hybridisierungen führten zu keinem besseren Ergebnis, so dass eine unterschiedliche Beschaffenheit der DNA angenommen werden muss. In all diesen Fällen mit divergenten Bruchpunkten konnte eine Formalinfixierungszeit > 4 Wochen ermittelt werden (vgl. Tab. D im Anhang).

Komplexe Chromosomenaberrationen (vor allem Translokationen) sind aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens der GTG-Bänderung meist schwer zu charakterisieren. Häufig sind mehrere FISH-Analysen mit verschiedenen Sonden oder Mikrodissektion notwendig, um die Aberration näher zu beschreiben (Blennow 1995, Schröck et al. 1997). Die CGH dagegen kann die involvierten Chromosomen und Regionen in nur einem Versuch detektieren.

Eine Verbesserung der Auflösung wurde durch Anwendung eines dynamischen Standardreferenzintervalls erreicht (Kirchhoff et al. 1998, 1999). Dieses Verfahren der High Resolution-CGH (HR-CGH) ermöglicht den Nachweis unbalancierter Rearrangements bis zu einer Größe von 3Mb und findet bei Patienten mit mentaler Retardierung und dysmorphen Merkmalen Anwendung (Ness et al. 2002, Kirchhoff et al. 2004, Shanske et al. 2004). Der Vorteil der HR-CGH gegenüber des Subtelomerscreenings bei diesen Patienten liegt in der Detektion intrachromosomaler Aberrationen, welche mit einer Häufigkeit von 13% vs. 5% angegeben werden (Biesecker et al. 2002).

In einer Studie mit drei Fällen mittels GTG-Bänderung nur unzureichend charakterisierten Translokationen konnte die CGH Aufschluß über involvierte Chromosomen und Segmente sowie Bruchpunkte geben. Ebenso konnte in 4 weiteren Fällen mit einer chromosomalen Imbalance die Strukturaberration exakt bestimmt werden (Tönnies et al. 2001). Das Auflösungsvermögen für Deletionen betrug dabei ca. 10Mb. In einer weiteren Studie wurden 2 Aborte bei bekannter paternaler pericentrischen Inversion 8p23q24 mit CGH untersucht (Daniely et al. 1999). Im ersten

Abort wurde ein Verlust 8q23->qter und im zweiten Abort ein Zugewinn 8q22.3->qter detektiert. Hierbei waren die Bruchpunkte gegenüber dem paternalen Karyotyp jedoch nach proximal verschoben. Der erwartete Zugewinn und Verlust für die Region 8pter->p23 konnte nicht nachgewiesen werden. Diskutiert wurde dies zum einen mit der geringen Größe der involvierten Chromosomenregion, die damit unter dem Detektionslimit für eine CGH liegt. Zum anderen nimmt die Fluoreszenzintensität graduell zu den Chromosomenenden ab (Kallioniemi et al. 1994).

Neben der Abklärung genetischer Imbalancen kann die CGH sowohl Aufschluß über den elterlichen Chromosomenstatus als auch Hinweis auf den Entstehungsmechanismus der Chromosomenaberration geben (Fritz et al. 2000, Lorda-Sanchez et al. 2005, eigene Untersuchungen siehe auch Kap. 4.6.4 und 5.5.4).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die CGH als molekularcytogenetische Methode im Rahmen einer pädiopathologischen Untersuchung auffälliger Feten bzw. Aborte zur Abklärung von Chromosomenaberrationen zahlreiche Vorteile bietet:

- Die Analyse ist unabhängig von der mitotischen Aktivität des zu untersuchenden Gewebes
- Durchführung auch an langjährig asserviertem Material möglich und daher geeignet für retrospektive Analysen
- Untersuchung des kompletten Genoms auf numerische chromosomale Veränderungen in einem Versuchsansatz, sicherer Nachweis von Trisomien und zahlenmäßigen Veränderungen der Geschlechtschromosomen
- Erfassen von unbalancierten chromosomalen Aberrationen wie Deletionen, Duplikationen und unbalancierten Translokationen ab einer chromosomalen Fragmentgröße von ca. 8-10Mb
- Erfassen von Chromosomenveränderungen in Mosaikform, wenn mindestens 50% der Zellen die Aberration aufweisen

Die Nachteile einer CGH-Analyse sind:

- Kein Nachweis balancierter genetischer Veränderungen wie Inversionen und balancierten Translokationen, da keine Änderung der DNA-Menge vorliegt
- Kein Nachweis (methodisch bedingt) von Tri- und Tetraploidien, so dass im Verdachtsfall zusätzliche Analysen notwendig sind
- Kein Nachweis von Stückverlusten- bzw. Zugewinnen kleinerer Chromosomenfragmente, insbesondere nicht an den Chromosomenenden

- Kein Nachweis chromosomaler Mosaik, wenn weniger als 50% der Zellen betroffen sind
- Ausschluss heterochromatischer Chromosomenregionen aus der Berechnung des Ratioprofils

5.4 Parentale Herkunft von Chromosomenaberrationen

5.4.1 Parentale Herkunft numerischer Chromosomenaberrationen

In dieser Arbeit wurden insgesamt zwei Triploidien und 10 Aneuploidien nachgewiesen, wobei in 5 Fällen die parentale Herkunft der Chromosomenaberration mittels Mikrosatellitenanalyse unter Verwendung hochpolymorpher Marker bestimmt wurde (Tab. 53).

Tabelle 53:

Auflistung aller Fälle mit nachgewiesener Poly- und Aneuploidie sowie die Bestimmung der parentalen Herkunft (Ø=Untersuchung nicht durchgeführt; k.A.=keine Angaben; M I=Meiose I;?=ungeklärt)

Ploidie	Fall	mütterliches Alter (Jahre)	SSW Abort	Herkunft maternal	Herkunft paternal	
Triploidie	O-2065/03	21	20+3	+ (M I)		
	V-2317/01	32	k.A.	+ (M I)		
Trisomie 3	V-2307/01	38	k.A.	Ø	Ø	
	FBK137	26	8	Ø	Ø	
	12	V-1771/95	29	11+1	+ (?)	
	13	V-2370/02	31	8	+ (M I)	
	18	S-41/02	39	24	+ (M I)	
	21	O-2051/03	40	18+2	Ø	Ø
XXY	O-1946/02	23	22+3	Ø	Ø	
	O-2039/03	31	25	Ø	Ø	
Monosomie X	O750/89	32	21	Ø	Ø	
	O-1154/93	32	21	Ø	Ø	

Triploidien sind mit 15-20% eine der häufigsten Chromosomenanomalien bei Spontanaborten (Rehder et al. 1989, Brajenovic-Milic et al. 1998, Baumer et al. 2000). Dabei können zwei verschiedene Phänotypen auftreten. Bei Vorliegen eines doppelten väterlichen und eines mütterlichen haploiden Chromosomensatzes (Diandrie), weist die Plazenta eine typische molenartige Struktur als Zeichen der Trophoblastproliferation und somit das Bild einer Partialmole auf. Der Fetus selbst zeigt häufig schwere Fehlbildungen vorwiegend des ZNS und des Urogenitalsystems. Gynoiden Triploidien (zwei mütterliche und ein väterlicher haploider Chromosomensatz) sind charakterisiert durch eine extrem kleine Plazenta ohne molenartige Veränderungen und einen hypo-

oder dystrophen Fetus ohne grobe Fehlbildungen, jedoch mit Ahydramnie und Potter-Stigmata im Gefolge einer renalen Minderperfusion bei insgesamt verminderter, zirkulierender Blutmenge. Die auffällige Placentamorphologie bei Triploidie-Aborten dokumentierte schon früh den funktionellen Unterschied des mütterlichen und väterlichen Genoms. Diese deutlichen Unterschiede werden als Auswirkung des jeweils zusätzlichen Chromosomensatzes in Abhängigkeit der parentalen Herkunft betrachtet.

Untersuchungen zur Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes bei Triploidien zeigten kontroverse Ergebnisse. In den 80er Jahren wurde eine überwiegend väterliche Herkunft des zusätzlichen Chromosomensatzes dokumentiert, während in neueren Studien mit molekulargenetischen Methoden überwiegend eine mütterliche Herkunft festgestellt wurde (Jacobs et al. 1982, Uchida & Freeman 1985, Miny et al. 1995, McFadden & Langlois 2000, Fritz 2002). Als Ursache für die Entstehung von diploiden Gameten gelten Segregationsfehler in Meiose I oder II oder die Inkorporation des Polkörperchen.

Zaragoza und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass eine enge Korrelation zwischen parentaler Herkunft des überzähligen Chromosomensatzes und dem Gestationsalter besteht. Die meisten Triploidien väterlichen Ursprungs werden zwischen der 10.-20.SSW abortiert. Dagegen kommen Triploidien mütterlichen Ursprungs entweder sehr früh noch während der Embryonalentwicklung zum Abort oder sie überleben mit einem gut erhaltenen Feten bis in höhere Schwangerschaftswochen.

Als Erklärung für die Relation zwischen Alter und parentaler Herkunft der Triploidien werden bei Frauen im höheren Alter eine erhöhte Frequenz verlängerter Zyklen mit gealterten Oozyten gefunden, die zu einer Beeinträchtigung der Spindelfunktion und meiotischer Non-disjunction disponieren. Der triploide Karyotyp mit zwei mütterlichen Sätzen könnte entweder durch eine zu früh gesprungene, primäre Oozyte oder eine diploide, sekundäre Oozyte entstanden sein. Das Phänomen der zu früh gesprungenen Oozyten tritt gehäuft nach In-vitro-Fertilisation auf, während die Entstehung einer diploiden Oozyte aufgrund eines Meiosefehlers zustande kommt, bei dem keine Abtrennung des 1. Polkörperchens erfolgte (Neuber et al. 1993).

Von den in dieser Arbeit untersuchten 2 Aborten mit triploidem Karyotyp waren beide mütterlicher Herkunft. Dies spricht für vermehrt entstandene diploide Oozyten. Eine Korrelation zu erhöhtem mütterlichen Alter liess sich jedoch nicht herstellen. In beiden Fällen lag das Alter unter 35 Jahren (21 und 32 Jahre).

Die Mehrzahl der autosomalen Trisomien sind auf ein Non-disjunction der maternalen Meiose zurückzuführen (vgl. Kap. 1.3.2). Für die Trisomien 13 und 18 konnte für den überwiegenden Anteil der Fälle eine maternale Herkunft des zusätzlichen Chromosoms gefunden werden (Fisher et al. 1993, 1995, Zaragoza et al. 1994). Die Trisomie 18 maternaler Herkunft beruht vorwiegend auf einen Segregationsfehler in der 2. meiotischen Teilung. Für die Mehrheit der paternalen Fälle liegt meist ein postzygotischer mitotischer Fehler zugrunde (Fisher et al. 1995, Eggermann et al. 1996).

Die Trisomie 12 gehört zu den seltenen Trisomien in Aborten. In einer Studie von 89 Spontanaborten wurden 3 Fälle mit einer Trisomie 12 maternalen Ursprungs beschrieben (Robinson et al. 1999).

Im eigenen Untersuchungsgut wurde in 2/6 Fällen mit autosomaler Trisomie eine maternale Herkunft des trisomen Chromosoms festgestellt, wobei in beiden Fällen mit einer Trisomie 13 und 18 ein Fehler während der Meiose I gesichert wurde. Die Entstehung einer Trisomie korreliert offenkundig mit dem Alter der Mutter (vgl. auch Kap. 1.3.1). In den 3 Fällen mit einer Trisomie der Autosomen war das Alter der Mütter >35 Jahre, während in den anderen 3 Fällen das mütterliche Alter nicht wesentlich erhöht war (31 Jahre und weniger).

95% der Schwangerschaften mit einer Monosomie X enden in einem Abort oder in einer Totgeburt (Hassold et al. 1992). Mehrere Studien mit ca. 10000 karyotypisierten Aborten zeigen im Durchschnitt in 17% der Fälle eine Monosomie X (Menasha et al. 2005). Anhand mehrerer Studien wird postuliert, dass der Verlust des X-Chromosoms in der Mitose während der frühen Embryonalentwicklung (Zygote) stattfindet (Mathur et al. 1991, Monroy et al. 2002, Uematsu et al. 2002). Das Auftreten einer Monosomie X korreliert demnach nicht mit erhöhtem Alter der Mutter (Neuber et al. 1993). Bei beiden in dieser Arbeit nachgewiesenen Monosomie X-Fälle (O-750/89, O-1154/93) lag das mütterliche Alter bei 32 Jahren und ist damit nicht erhöht (<35 Jahre).

Untersuchungen zur Herkunft des X-Chromosoms zeigen, dass sowohl bei Patientinnen mit Turner-Syndrom als auch bei Spontanaborten mit 45,X-Karyotyp in 70-90% der Fälle das vorhandene X-Chromosom mütterlicher Herkunft ist (Jacobs et al. 1990, Mathur et al. 1991, Hassold et al. 1992, Lorda-Sanchez et al. 1992, Monroy et al. 2002).

5.4.2 Parentale Herkunft struktureller Chromosomenaberrationen

Unbalancierte Strukturaberrationen mit großen genetischen Imbalancen werden entweder nicht implantiert oder die Konzeption geht sehr früh während der Embryonalentwicklung verloren. Kleinere Imbalancen können je nach Größe und in Abhängigkeit des involvierten Chromosoms zu Frühaborten oder intrauterinem Fruchttod führen.

In einer Studie mit ca. 25000 cytogenetisch untersuchten Feten fanden sich in 0,53% Strukturaberrationen, davon waren 0,17% unbalanciert und 0,36% balanciert. Die Rate vererbter chromosomaler Imbalancen betrug 0,34% (Hook et al. 1984). Balancierte Translokationen finden sich dagegen in 0,2% bei Neugeborenen, während die Rate bei infertilen Paaren (0,6%) und Patienten mit wiederholten Aborten (9,2%) wesentlich höher ist (Stern et al. 1999, Munné 2002). Die Inzidenz von Nachkommen mit unbalancierter Translokation steht in Relation zum Geschlecht des elterlichen Trägers der Translokation (Boué & Gallano 1984). Untersuchungen bei 1597 Kindern mit unbalancierten Translokationen zeigten, dass 68% auf einer maternalen Herkunft beruhen. Vergleichbar hoch mit 61% ist die mütterliche Herkunft in Imbalancen nach adjacent 1-Verteilung der Translokationschromosomen, 70% nach adjacent 2-Verteilung und 92% in Nachkommen nach einer 3:1 Segregation. Die hohe Rate nach 3:1 Segregation korreliert mit erhöhten mütterlichen Alter, während bei adjacent 1- und adjacent 2-Verteilung keine Korrelation zum mütterlichen Alter zu beobachten ist (Faraut et al. 2000, siehe auch Kap. 5.5.4).

In 4 Fällen mit unbalancierten Strukturaberrationen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Mikrosatellitenanalyse zur Bestimmung der parentalen Herkunft des veränderten Chromosoms durchgeführt. In 2 Fällen (O-1919/01 Kap. 4.4.2.6 und O-1910/01 Kap. 4.5.2) konnte eine väterliche Herkunft des strukturveränderten Chromosoms bzw. Markerchromosoms nachgewiesen werden. In beiden Fällen handelte es sich um Neumutationen. In den Fällen 118/02 und V-2309/01 erbrachte die Markertypisierung kein Ergebnis bezüglich der parentalen Herkunft (vgl. Kap. 4.5.3 und 4.5.4).

Für spezifische Chromosomenanomalien können jedoch signifikante Unterschiede bei der elterlichen Herkunft beobachtet werden. Dies gilt insbesondere für terminale Deletionen, welche überwiegend väterlichen Ursprung sind. So konnte in 29 von 34 untersuchten Kindern (85%) mit einer de novo entstandenen 18q-Deletion eine paternale Herkunft des deletierten Chromosom 18 gesichert werden (Cody et al. 1997). In zwei Studien wurde für eine 5p-Deletion jeweils 80% bzw. 90% eine paternale

Herkunft des deletierten Chromosoms 5 nachgewiesen (Overhauser et al. 1990, Mainardi et al. 2001). In 40 Patienten mit einer de novo 4p-Deletion lag in 32 Fällen (75%) eine paternale und in 8 Fällen (25%) eine maternale Herkunft des deletierten Chromosoms 4 vor (Dietze et al. 2004, siehe Fall O-1910/01 in Kap. 4.5.2).

Ursächlich für den erhöhten väterlichen Anteil terminaler Deletionen wird eine größere Anzahl von Zellteilungen während der männlichen Meiose diskutiert (Chandley 1991). Ebenso könnte die Ursache in einer wesentlich erhöhten Rekombinationsrate in der Subtelomerregion im männlichen Geschlecht liegen. Es konnte gezeigt werden, dass gerade die Subtelomerregion ein `hot spot` für meiotische Rekombination bei der männlichen Keimzelleifung darstellt (Badge et al. 2000).

Dagegen belegen molekulargenetische Untersuchungen in 16 Fällen mit einer de novo Inversionsduplikation und Deletion 8p in allen Fällen eine maternale Herkunft des Derivatvchromosoms 8 (Floridia et al. 1996, Kotzot et al. 2000, Shimokawa et al. 2004).

5.5 Fallbeschreibungen

Anhand ausgewählter Fallbeispiele soll die Leistungsfähigkeit retrospektiver CGH-Analysen im Rahmen der Abortdiagnostik dargestellt werden. Alle vorgestellten Kasuistiken verdeutlichen die Wichtigkeit einer möglichst weitgehenden Abklärung der Strukturaberration mit einer möglichst genauen Identifizierung der chromosomalen Bruchpunkte, um exakte Genotyp-Phänotyp-Korrelationen aufzustellen.

5.5.1 Nachweis von chromosomalen Zugewinnen - Charakterisierung eines Markerchromosoms durch die Kombination von M-FISH, chromosomaler Mikrodissektion, CGH und molekulargenetischer Analyse (O-1919/01)

Überzählige Markerchromosomen (SMCs=small supernumerary marker chromosomes) kommen mit einer Häufigkeit von 0,05% beim Menschen vor. In ca. 30% der Träger eines SMCs, das nicht von einem der acrocentrischen Chromosomen abstammt, werden klinische Manifestationen beobachtet. Die klinische Auswirkung ist schwierig vorauszusagen, da sie in großem Maße abhängig vom Anteil des Euchromatins, dem Mosaikstatus und dem Vorliegen einer UPD der Chromosomen, die in die Bildung des Markers involviert sind, abhängig ist (Starke et al. 2003). Das klinische Spektrum ist sehr heterogen und reicht von normalem Phänotyp über Minoranomalien bis hin zu facialen Dysmorphien, Fertilitätsstörungen, psychomotorische Entwicklungs-

verzögerung und geistiger Behinderung (Crolla 1998, Dietze 2000, Starke et al. 2003). Es liegt eine Korrelation zwischen Größe des SMC und dem Schweregrad der phänotypischen Auffälligkeiten vor (Kosztolanyi 1987).

Im vorliegenden Fall konnte ein im Fruchtwasser gefundener SMC durch die Kombination cytogenetischer, molekularcytogenetischer und molekulargenetischer Methoden exakt charakterisiert werden (Fallbeschreibung Kap. 4.4.2.6). Über M-FISH-Analyse wurde der chromosomale Ursprung dem Chromosom 2 zugeordnet. Eine präzise Aussage, welche Region von Chromosom 2 der Marker enthält, konnte jedoch nicht gemacht werden. Erst die Mikrodissektion des Markers mit nachfolgender Hybridisierung der DNA auf normale männliche Metaphasechromosomen (*reverse chromosome painting*) gab Aufschluss über Größe und DNA-Gehalt. Über CGH konnten die ermittelten Bruchpunkte exakt bestätigt werden.

Im vorliegenden Fall wies der Fetus faciale Dysmorphien (ausgeprägter Hypertelorismus, breite Nase, prominentes Philtrum, prominentes Philtrum, Makrostomie, Mikro-Retrognathie und tiefsitzende Ohren) und geringe äußere Fehlbildungen (verkürztes 4. Metacarpale, Klinodaktylie), jedoch keine weiteren inneren Fehlbildungen auf. Anatomische Auffälligkeiten am Gehirn wurden nicht diagnostiziert, wobei jedoch keine Aussage zur mentalen Retardierung gemacht werden kann.

Insgesamt sind bis jetzt 13 Markerchromosomen in der Literatur beschrieben, die von Chromosom 2 aus der centromernahen Region abstammen. Tabelle 54 fasst alle Fälle mit relevanten klinischen Angaben zu den überzähligen Markerchromosomen 2 zusammen. 2 der 14 Markerchromosomen waren cytogenetisch unzureichend charakterisiert. 5/14 der beschriebenen Fälle zeigen keine klinischen Symptome, wobei im Fall 10 ein balancierter Karyotyp vorlag. In den anderen 3 Fällen ohne klinischen Phänotyp (Fälle 6, 11, 13) lag eine partielle Trisomie für die pericentromerische Region des langen Arms von Chromosom 2q11.2 vor. Wohingegen in 2 Fällen (5, 9) mit phänotypischen Auffälligkeiten die pericentromerische Region des kurzen Arms 2p11.2 involviert ist. Partielle Trisomien, die proximaler zu den Regionen p11.2 und q11.2 liegen und damit größere Anteile Euchromatin enthalten, verursachen schwerere Fehlbildungen (Fälle 1, 2, 3, 7, 8, eigener Fall).

Tabelle 54:
Zusammenstellung der Fälle mit Markerchromosomen aus dem proximalen Centromerbereich
2p13-q13

F	Studie	Karyotyp	Untersuchungs- methoden	M	E	Klinische Merkmale	UPD
1	Wang and Hunter 1979	+r(2)(p11q14)	Chromosomenanalyse; verschiedene Bänderungstechniken	65%	?	Dysmorphiezeichen MR; Entwicklungsverzögerung	-
2	Greven-good et al. 1993	46,XX/47,XX,+r(2)(p13q12)	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit und WCP-Sonden	k.A.	de novo	Zwerchfellhernie; faciale Dysmorphien; singuläre Umbilicalarterie	-
3	Plattner et al. 1993 (case 26)	46,XY/47,XY,+r(2)(q10q12)	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit-Sonden	30%	de novo	Autismus; keine Sprache; keine Dysmorphiezeichen; äußerlich unauffällig	-
4	Daniel et al. 1994 (case 9)	47,XY,+r(2)	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit-Sonden	-	familiär	keine	-
5	Ostroverkhova et al. 1999	46,XY/47,XY,+r(2)(p11.2q14.1)	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit-Sonden; chromosomale Mikrodissektion	50%	de novo	Entwicklungsverzögerung; muskuläre Hypotonie; Hypogenitalismus; Leistenhernie; leichte Klinodactylie	-
6	Villa et al. 2001	47,XX,+r(2)(q10q11.2)	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit-, WCP- und YAC-Sonden; Mikrosatellitenanalyse	44%	de novo	keine	keine UPD
7	Giardino et al. 2002	Proband: 47,XY,+r(2)(q10q12)/46,XY	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit und YAC-Sonden; Mikrosatellitenanalyse	80%	familiär	Dysmorphiezeichen milde MR; Hyperaktivität; Minoranomalien	keine UPD
8		Mutter: 47,XX,+r(2)(q10q12)/46,XX		54%			
9	Weise et al. 2002 (case 11)	+r(2)(p11.2q11.1)	Chromosomenanalyse; M-FISH-Analyse	70%	de novo	BOR Syndrom-ähnliche Symptome (craniofaciale Dysmorphien; Nierendysplasie)	-
10	LasanTrčić et al. 2003	47,XY,del(2)(p11.1p12),+mar(2)(p11.1p12)	Chromosomenanalyse; FISH mit alpha-Satellit, WCP und YAC-Sonden	-	de novo	keine	-
11	Starke et al. 2003 (case 6)	47,XY,+r(2)(p11.1q11.2)/46,XY	Chromosomenanalyse; subcenM-FISH-Analyse	52%	de novo	keine	-
12	Guanciali-Franchi et al. 2004	47,XX,+r(2)(q?)	Chromosomenanalyse; M-FISH-Analyse	-	k.A.	MR	-
13	Mrasek et al. 2005	+r(2)(p11.1q11.2)	Chromosomenanalyse; cenM-FISH-Analyse	86%	?	keine	-
14	O-1919/01 eigener Fall	47,XX,+r(2)(p13q13)	Chromosomenanalyse; M-FISH-Analyse; CGH; chromosomale Mikrodissektion; Mikrosatellitenanalyse	53%	de novo	dystropher Fetus mit craniofacialen Dysmorphien; Hypertelorismus; Klinodactylie	keine UPD

k.A.=keine Angaben; MR=mental retardation; UPD=uniparental disomy; F=Fall; M=Mosaik; E=Entstehung, ?=fraglich

In 13/14 Fällen wurden neben der konventionellen Chromosomenanalyse zusätzliche molekularcytogenetische Methoden zur Abklärung der SMCs angewandt. Die am häufigsten verwendete Methode vor allem in jüngerer Zeit ist die M-FISH-Analyse oder davon abgeleiteter Methoden (cenM-FISH oder subcenM-FISH) in 5/14 Fällen (9, 11, 12, 13, eigener Fall). In 2 Fällen kam die Methode der chromosomalen Mikrodissektion zur Anwendung (5, eigener Fall).

In Fällen mit kleinen Ringchromosomen oder überzähligen Markerchromosomen wurde das Vorliegen einer Uniparentalen Disomie hinsichtlich phänotypischer Auffälligkeiten diskutiert (Daniel & Malafiej 2003). Untersuchungen belegen, dass eine UPD bei Markerchromosomen kein bedeutender Faktor für die beschriebenen klinischen Merkmale ist. In 3 von 14 Fällen wurden Untersuchungen auf das Vorliegen einer UPD der homologen Chromosomen durchgeführt. In keinem Fall konnte eine UPD nachgewiesen werden (Fälle 6, 7, eigener Fall). In einer Studie von 30 SMCs wurde in nur einem Fall eine UPD für die normalen homologen Chromosomen gefunden (Crolla 1998).

5.5.2 Chromosomale Verluste – Terminale Deletion 4q (O-643/88)

Das Deletionssyndrom 4q ist mit einer Inzidenz von 1:100000 eine seltene Chromosomenaberration und ist charakterisiert durch Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung, faciale Dysmorphien, LKG, Extremitätenfehlbildungen, Herzfehler und Urogenitaldefekten. Es sind sowohl interstitielle als auch terminale Deletionen verschiedenster Bruchpunkte beschrieben (Mitchell et al. 1981, Lin et al. 1988). Robertson und Mitarbeiter (1998) postulieren als minimal kritische Region 4q31, die bei Verlust zur Ausprägung des vollen 4q- Phänotyps beiträgt. Jedoch lag bei dem von ihm beschriebenen Patienten keine Lippen-Kiefer Gaumenspalte vor. Keeling und Mitarbeiter (2001) sehen dagegen als kritische Region die Bande 4q33 an. Dabei treten vor allem Fehlbildungen wie die Pierre-Robin-Sequenz (Mikrognathie, Mittelgesichtsdefekte wie mediane Gaumenspalte und Glossoptosis), faciale Dysmorphien, Entwicklungsverzögerung, Extremitätenfehlbildungen (insbesondere Aplasie der Ulna) und variable Herzfehler auf (Tab. 56). Hinsichtlich facialer Dysmorphiezeichen kann kein spezielles Merkmal für einen spezifischen Bruchpunkt in 4q benannt werden (Strehle & Bantogk 2003). Patienten mit terminalen Deletionen ab der Bande 4q31/32 weisen einen ähnlichen Phänotyp auf, während Patienten mit Deletionen in 4q33-34->qter einen insgesamt mildereren Phänotyp zeigen (Lin et al.

1988). Der einzige phänotypische Unterschied bei den Deletionen zwischen den Banden 4q31 und 4q32 besteht im Vorhandensein einer Pierre-Robin-Anomalie. In einer Studie mit 18 Patienten mit einer terminalen Deletion 4q31->qter zeigten nur 4 (22,2%) eine Pierre-Robin-Anomalie, während alle 4 Patienten (100%) mit einer Deletion 4q32->qter diese Fehlbildung aufwiesen (Lin et al. 1988).

Tabelle 55:

Zusammenstellung der Fälle mit einer reinen terminalen oder interstitiellen Deletion 4q

	Bruchpunkt	Gs / Ls / Ks	Mikro-/ Retro- gnathie	Pierre-Robin- Anomalie
Golbus et al. 1973	4q31.3->qter	+/-/ - *	+/-	+
van Kempen et al. 1975	4q31->qter	+/+/-	+/-	(+)
Back et al. 1977	4q31->qter	+/+/+	+/-	-
Serville & Broustet 1977	4q24-q32	-/-/ - #	-/-	-
Yang et al. 1979	4q31->35	-/-/ -	-/-	-
Shroff et al. 1981	4q31->qter	+/-/ -	+/-	-
Davis et al. 1981	4q31->qter	+/-/ -	+/+	+
Yu et al. 1981	4q31->qter	+/+/-	+/+	-
Mitchell et al. 1981				
Patient 1	4q31.3->qter	+/+/- ●	+/-	(+)
Patient 2	4q31.3->qter	+/+/-	+/-	-
Patient 3	4q31.3->qter	-/-/ -	+/-	-
Patient 4	4q31.3->qter	+/-/ -	+/-	-
Young et al. 1982	4q31->qter	+/-/ -	+/-	-
Lipson et al. 1982	4q31->qter	+/-/ -	+/-	(+)
Sandig et al. 1982	4q31.3->qter	+/-/ -	+/+	-
Chudley et al. 1982	4q31.3->qter	+/+/-	+/-	+
de Michelena & Campos 1989	4q31->qter	-/-/ -	+/+	-
Tejada et al. 1990	4q31.3->qter	-/-/ -	+/+	-
Giuffrè et al. 2004	4q31.3->qter	+/-/ -	+/+	-
Sarda et al. 1992	4q31.22-q34.2			
Robertson et al. 1998	4q31.3->q31.3	-/-/ -	+/+	-
Rethoré et al. 1979	4q32.1->qter	+/-/ -	+/+	+
Fryns et al. 1981	4q32->qter	+/-/ -	+/+	+
Lin et al. 1988				
Patient 2	4q32->qter	+/-/ -	+/-	+
Keeling et al. 2001	4q32-q34	+/-/ -	+/-	-
Aladhami et al. 2000				
Patient 1	4q32q33 mat	-/-/ -	+/-	-
Patient 2	4q32q33	-/-/ -	+/-	-
O-643/88 eigener Fall	4q31.3/32->qter	+/-/ - *	+/+	+

Gs=Gaumenspalte, Ls=Lippenspalte, Ks=Kieferspalte, * gespaltene Uvula, # hoher Gaumen;
● Fehlen des Gaumen, + Merkmal vorhanden, - Merkmal nicht vorhanden, (+) Merkmal leicht ausgeprägt

Im vorliegenden Fall ergab die Chromosomenanalyse kultivierter Amnionzellen eine Deletion des langen Arms von einem Chromosom 4 [46,XY,del (4) (q31.3->qter)] mit bereits sonografisch nachweisbarer Retrognathie und einer Gaumenspalte. Die cytogenetische Auswertung aus fetalen Fibroblasten bestätigte den pränatalen Befund. Die CGH-Analyse zeigte jedoch einen Verlust für das Chromosom 4 im Bereich q32->qter. Demnach weicht nach CGH der Bruch distal ab, so dass die Deletion kleiner erscheint als cytogenetisch diagnostiziert. Anhand der klinischen Merkmale ist im Vergleich mit den Literaturdaten ein Bruch in der Chromosomenregion 4q32 wahrscheinlich, da bei dem betroffenen Feten eine vollständige Pierre-Robin-Sequenz mit Mikro- und Retrognathie und einer Gaumenspalte mit gespaltener Uvula vorliegt, die verstärkt mit Deletionen 4q32->qter einhergeht (Tab. 55).

5.5.3 Chromosomale Verluste - Interstitielle Deletion 3p (O-212/86)

Interstitielle Deletionen im proximalen Abschnitt des kurzen Arms von Chromosom 3 sind selten vorkommende Chromosomenaberrationen, die bisher bei nur 9 Patienten beschrieben wurden.

Es wurden bisher 4 Hauptmanifestationen für das Deletions-Syndrom des proximalen kurzen Arms von Chromosom 3 herausgearbeitet (Neri et al. 1984):

1. charakteristischer facialer Aspekt: niedrige Stirn, Epikanthus, Hypertelorismus, breite Nasenbrücke, kurze Nase mit antevvertierten Nasenlöchern, kurzes Philtrum, kleiner Mund, Mikrognathie und tiefsitzende dysplastische Ohren
2. Limitationen der Gelenkbewegungen
3. Deformitäten wie Ulnarabweichung der Hände, Calcaneovalgus der Füße und Camptodaktylie
4. psychomotorische Retardierung

Andere Fehlbildungen wie Herzfehler, Agenesie der Gallenblase und Meckel-Divertikel sind eher unspezifisch und kommen auch bei anderen chromosomalen Rearrangements vor (Wieczorek et al. 1997).

Im vorliegenden Fall (O-212/86) wurde nach konventioneller Analyse cytogenetisch eine Deletion im Bereich 3p14.2->p11 beschrieben. Die Ergebnisse nach CGH wiesen jedoch auf eine Deletion des Abschnitts 3p14.2->p12 hin, d.h. das Ausmaß der Deletion erschien nach CGH kleiner. Anhand vergleichender Literaturdaten soll eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation Aufschluss über den möglichen Bruchpunkt und damit

die Größe der Deletion bringen. In der Tabelle 56 sind alle Fälle mit proximaler Deletion 3p und deren relevanten klinischen Angaben aufgelistet.

Tabelle 56:
Auflistung der Fälle mit proximaler Deletion 3p

	Facialer Aspekt			Deformitäten		Psycho- motorische Retardierung
	schmale Stirn / Epikanthus / Hypertelorismus	breiter Nasen- rücken / kurze Nase / antevertierte Nasenlöcher	kurzes Philtrum / kleiner Mund / Mikrognathie / tiefsitzende dys- plastische Ohren	Ulnarab- weichung der Hände	Calcaneo- valgus- Deformität der Füße	
Wyandt et al. 1980 p21.1->p13	-(hohe)/+/-	k.A.	k.A.	-	(+)	+
Sichong et al. 1981 p14.2->p11	-(hohe)/+/-	+/-/+	-/-/+	+	-	+
Mitter et al. 1984 p21->p13	-(hohe)/+/-	+/-/-	-/-/+	k.A.	k.A.	k.A. Fetus 17.SSW
Neri et al. 1984 p14.2->p12	-/+/+	+/-/-	-/(+)/(+)	+	+	+
Short et al. 1986 p21->p13.2	k.A.	k.A.	k.A./k.A./-/(+)	k.A.	k.A.	k.A. Fetus 18.SSW
Karimi-Nejad et al. 1990 p21.1->13	k.A.	k.A.	k.A./k.A./k.A./+	+	k.A.	+
Crispino et al. 1995 p14.1->p11	-/+/+	+/-/-	k.A./k.A./k.A./(+)	+	k.A.	
Wieczorek et al. 1997 p21.2->p12	+/-/+	+/+/+	+/-/+	+	-	+
Petek et al. 2003 p13->p11	-(hohe)/-/-	-/+/-	k.A./k.A./k.A./+	k.A.	k.A.	+
Hertz et al. 1988 p14.2->p11 dim p14.2p12 eigener Fall	-(hohe)/+/>+	+/+/>+	-(lang)/-/+	(+)	-	k.A. hypotropher Fetus der 20.SSW

k.A.=keine Angaben; +=Merkmal vorhanden; (+)=Merkmal leichte Ausprägung;
-=Merkmal nicht vorhanden;

Aufgrund der geringen Anzahl und den teilweise klinisch wenig beschriebenen Fällen ist eine Korrelation bezüglich der Zuordnung von Merkmalen zu den entsprechenden Bruchpunkten nicht eindeutig möglich. Lediglich die Ulnarabweichung der Hände scheint eher mit einer Deletion 3p11-p12 einherzugehen (Neri et al. 1984, Sichong et al. 1981, Crispino et al. 1995, Wieczorek et al. 1997). In 3 Fällen ist keine Aussage möglich. Als Herzfehler wurde im vorliegenden Fall eine subvalvuläre Aortenstenose diagnostiziert, welche ebenfalls bei Sichong und Mitarbeitern (1981) mit demselben

Bruchpunkt in 3p11 beschrieben wurde. Aufgrund des Vergleichs aller Daten dürfte im eigenen Fall der centromernahe Bruch in 3p11 erfolgt sein. Demnach erscheint nach CGH der proximale Bruchpunkt nach distal verschoben, so dass die eigentliche Deletion größer ist. Die Verschiebung der Bruchpunkte nach CGH-Analyse dürfte im vorliegenden Fall auf die Fragmentierung der DNA nach Formalinfixierung zurückzuführen sein.

5.5.4 Nachweis von Entstehungsmechanismen bei chromosomalen Aberrationen

Das Risiko für chromosomal unbalancierte Nachkommen bei einer familiären reziproken Translokation ist abhängig von den involvierten Chromosomen, der Größe der Chromosomensegmente und der Anzahl und Position der Chiasmata, den Punkten, an denen ein crossing over zwischen homologen Chromosomen während der meiotischen Paarung stattfand (Ford & Clegg 1969, Lorda-Sanchez et al. 2005).

Um eine vollständige Paarung der homologen Chromosomensegmente zu erhalten, bilden die Translokationschromosomen und ihre normalen Homologen in der Meiose ein Quadrivalent. Aufgrund unterschiedlicher Segregationsmöglichkeiten eines Quadrivalents während der Keimzellreifung können die Gameten normal, balanciert oder unbalanciert sein. Bei der alternierenden Segregation enthält eine Gamete die normalen und die andere, die an der Translokation beteiligten Chromosomen. In beiden Fällen entstehen balancierte Gameten. Bei der nicht alternierenden (adjacent) Segregation gelangen benachbarte Chromosomen in eine Zelle. Als adjacent-1-Segregation wird dies bezeichnet, wenn sich Chromosomen mit homologen Centromeren trennen und Chromosomen mit unterschiedlichen Centromeren in die gleiche Gamete gelangen. Bei einer adjacent-2-Segregation gelangen Chromosomen mit gleichem Centromer in die gleiche Gamete. Das Ergebnis ist jeweils eine unbalancierte Gamete mit partiellen Duplikationen und Deletionen. In seltenen Fällen kann bei Auftrennung des Quadrivalents eine 3:1-Segregation stattfinden. Hierbei trennen sich entweder die beiden normalen oder die beiden Translokationschromosomen und gelangen in die beiden Tochterzellen.

In der Folge gibt es acht verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Gelangen bei der 3:1-Segregation zwei normale Chromosomen des Quadrivalents zusammen mit einem Translokationschromosom in eine Zelle, so wird dies als Tertiär-Trisomie bezeichnet. Wandern die beiden Translokationschromosomen zusammen mit einem normalen Chromosom in eine Keimzelle, so entsteht eine Interchange-Trisomie. Eine reziproke Translokation bei einem Elternteil kann zu insgesamt 32 Varianten bei der

Zygotenentstehung führen, wenn die Rekombinationsmöglichkeiten während der Meiose II mitgerechnet werden.

Am häufigsten ist jedoch die alternierende Segregation der Translokationschromosomen, während die adjacent 1-Segregation die häufigste Ursache für unbalancierte Gameten ist, gefolgt von der adjacent 2- und 3:1-Segregation (Guttenbach et al. 1997, Oliver-Bonet et al. 2002).

Im eigenen Fall ergab die cytogenetische Auswertung eines Frühabortes einen strukturell auffälligen männlichen Karyotyp mit einem Derivatvchromosom 22 (siehe Fallbeschreibung Kap. 4.4.2.4). Es lag demnach eine unbalancierte Chromosomenstörung vor. Die Eltern konnten cytogenetisch nicht untersucht werden. Die CGH-Analyse unter Verwendung von Zotten-DNA ergab eine Trisomie 12 für das gesamte Chromosom. FISH-Untersuchungen an asservierter Chromosomensuspension mit centromerspezifischen Sonden für die Chromosomen 12 sowie 14/22 zeigten, dass das Derivatvchromosom 22 dicentrisch ist, bestehend aus einem Centromer von Chromosom 12 und einem Centromer von Chromosom 22. Eine Interphase-FISH mit einer auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisierten Sonde (GLI-Gen in 12q13) ergab in 57% der analysierten Zellkerne 2 spezifische Signale, während 43% Zellkerne drei spezifische Signale aufwiesen. Eine Mikrosatellitenanalyse mit polymorphen Markern spezifisch für Chromosom 12 belegte die Trisomie mit Hinweis auf eine mütterliche Herkunft des überzähligen Chromosoms 12.

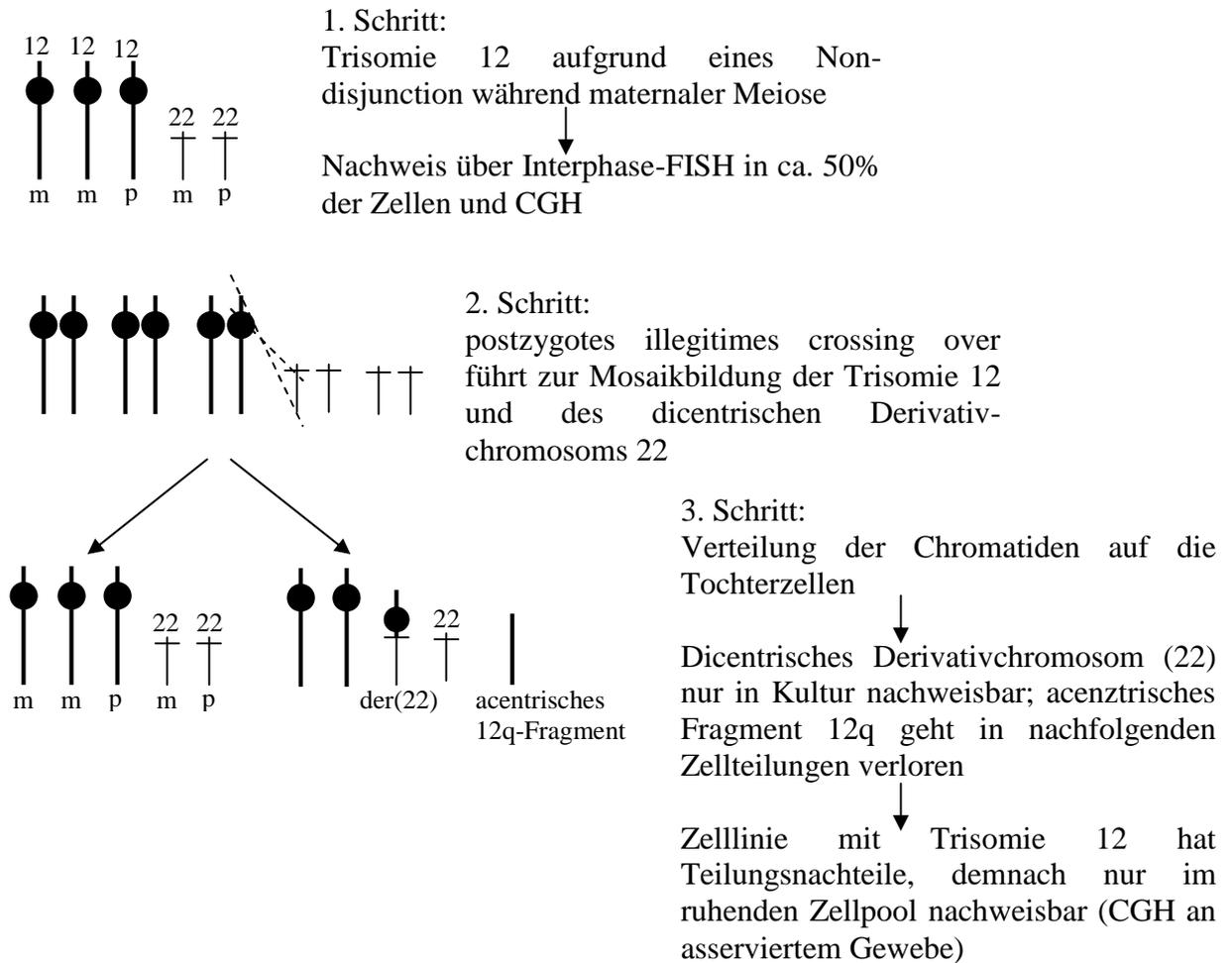
In diesem Fall ist ein Mosaik für das dicentrische Derivatvchromosom (22) und eine komplette Trisomie 12 anzunehmen. Die Trisomie 12 dürfte aufgrund eines Non-disjunction während der maternalen Meiose entstanden sein (1. Schritt). Ein postzygotisches illegitimes crossing over führte in einem 2. Schritt zur Entstehung des Translokationschromosoms (12;22). Bei der nachfolgenden Verteilung der Chromatiden auf die Tochterzellen bildete sich eine Tochterzelle mit der Trisomie 12, während die andere Tochterzelle zwei Chromosomen 12, das Translokationschromosoms (12;22) und das acentrische 12q-Fragment erhielt. Das acentrische Fragment dürfte während der nachfolgenden Zellteilungen verloren gegangen sein (siehe Abb. 49).

Die Zelllinie mit der Trisomie 12 proliferierte nicht unter den gewählten Kulturbedingungen und konnte somit nur im ruhenden Zellpool nachgewiesen werden (FISH-Analysen, CGH). Die Zelllinie mit dem Derivatvchromosom (12;22) war nach Zellkultivierung sowohl cytogenetisch als auch über FISH nachweisbar.

CGH hatte somit neben dem Nachweis einer chromosomalen Imbalance einen Beitrag geleistet, den Entstehungsmechanismus der Chromosomenaberration abzuklären, wie

dies auch in Fällen nach 3:1 Segregation von Translokationschromosomen bereits beschrieben wurde (Fritz et al. 2000, Lorda-Sanchez et al. 2005)

Abbildung 49 :
**Möglicher Entstehungsmechanismus der Chromosomenstörung im Fall V-1771/95 (m=maternal;
 p=paternal)**



6 Zusammenfassung

Der hohe Anteil chromosomaler Imbalancen in der Frühschwangerschaft impliziert die Notwendigkeit einer intensiven cytogenetischen Untersuchung sowohl der Aborte als auch der Paare mit Aborten. Die konventionelle Chromosomenanalyse erlaubt die Identifizierung numerischer wie auch struktureller Chromosomenanomalien. Grundvoraussetzung für die Darstellung von Chromosomen ist der Zugang zu proliferierenden (vitalen) Zellen. Chromosomenanalysen aus Abortgewebe sind jedoch häufig durch die geringe mitotische Aktivität der Zellen und die geringe Bandenqualität der Chromosomen erschwert und damit ist insbesondere die Aussagekraft bezüglich struktureller Aberrationen eingeschränkt. Weiterhin ist eine Kontamination der Abortkultur durch mütterliche Zellen zumindest bei unauffälligem weiblichen Chromosomenbefund nicht auszuschließen.

Die Comparative Genomhybridisierung (CGH) ist eine molekularcytogenetische Methode, welche chromosomale Imbalancen durch reverse Fluoreszenz- in situ-Hybridisierung zuverlässig aufdecken kann. Da ausschließlich genomische DNA und keine Metaphasechromosomen des zu untersuchenden Gewebes benötigt werden, umgeht die CGH die oben genannten Einschränkungen der konventionellen Chromosomenanalyse. Die CGH erwies sich daher als ein wertvolles Instrument zur retrospektiven Aufdeckung genetischer Imbalancen an archiviertem Material.

Um zu prüfen, inwieweit sich diese Methode für chromosomale Retrospektivanalysen in der Fetalpathologie eignet, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob mit DNA, die aus routinemäßigen Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben gewonnen werden kann, eine CGH durchzuführen ist. Um das diagnostische Potential der CGH zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Studie 51 Abortfälle retrospektiv untersucht. Vorrangig sollten Abortfälle bearbeitet werden, deren jeweilige fetale Fehlbildungen einen begründeten Verdacht auf einen chromosomalen Defekt gaben. Insbesondere sollte die Sensitivität der CGH anhand von 29 cytogenetisch bereits vordiagnostizierten Fällen ermittelt werden.

In insgesamt 12 Fällen wurden neben der Comparativen Genomhybridisierung noch weitere Techniken wie die chromosomale Mikrodissektion, Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) mit spezifischen Sonden und die Mikrosatellitenanalyse zur Abklärung der genomischen Imbalancen angewendet. Mittels dieser Techniken konnte der Ursprung eines Markerchromosoms sowie einer neu entstandenen unbalancierten Translokation identifiziert werden. Insbesondere erwies sich die chromosomale Mikrodissektion als herausragende Technik zur äußerst präzisen Abklärung von

chromosomalen Rearrangements in Fällen, in denen eine ausreichende Menge an Metaphasechromosomen asserviert wurde. Die Mikrosatellitenanalyse ermöglichte die Bestimmung der parentalen Herkunft und Entstehungszeitpunkt von Trisomien sowie den Ausschluss einer uniparentalen Disomie in insgesamt 10 Fällen.

Grundvoraussetzung für eine CGH-Analyse ist die Gewinnung einer möglichst hochmolekularen DNA. Zu diesem Zweck wurde zunächst DNA aus nativem und Formalin fixierten und paraffinierten Geweben in insgesamt 42 Abortfällen gewonnen. Vergleichende Untersuchungen zur DNA-Isolierung aus fixiertem Gewebe ergab, dass die qualitativ und quantitativ besten Ergebnisse mittels einem laborinternen Protokoll nach Proteinausfällung erzielt wurden. Nach dieser Methode wurde daher DNA von 33 Abortfällen gewonnen. Anhand der Ergebnisse der CGH-Analysen wurden insbesondere folgende Parameter beurteilt: Alter der Gewebelöckchen, Dauer der Formalinfixierung und Mazeration/Autolyse des Ausgangsgewebes. Das Alter der asservierten Gewebelöckchen reichte von wenigen Wochen bis zu 18 Jahre. Anhand der Untersuchungsergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Lagerungsdauer in Paraffin keinen oder einen nur geringen Einfluss auf die Qualität der DNA hatte. Entscheidender Faktor dagegen war die vorangegangene Lagerungszeit der Gewebe im Gewebefixativ Formalin. Es ergab sich eine eindeutige Korrelation zwischen Fixationsdauer und DNA-Zustand. Je kürzer die Fixationsdauer des Gewebes in Formalin war, umso eher liess sich eine qualitativ und quantitativ hochwertige DNA gewinnen. Keine direkte Korrelation konnte dagegen zwischen DNA-Qualität und dem Mazerationsgrad/Autolysegrad des eingebetteten Gewebes festgestellt werden. Anhand der Ergebnisse der CGH-Analyse wurde die DNA in 3 Kategorien unterteilt:

1. DNA-Fragmente mit einer Länge von 200-1500bp und mehr (optimale Fragmentlänge) ermöglichten ein CGH-Ergebnis in 100% der Fälle.
2. Leicht degradierte DNA (Fragmentlänge 200-700bp) führte zu einem CGH-Ergebnis in 67% der Fälle.
3. Stark degradierte DNA mit Fragmentlängen <500bp eignete sich nicht für eine CGH-Analyse.

Die Comparative Genomhybridisierung wurde zur Analyse von 51 Aborten angewandt. In der vorliegenden Studie konnte in 42/51 Fällen (82,4%) mittels CGH in Verbindung mit Mikrosatellitentypisierung und Fluoreszenz- in situ-Hybridisierung ein Ergebnis erzielt werden. In 22/42 Fällen (52,4%) lag ein unauffälliges Ergebnis vor. In 5 Fällen konnte ein normaler Chromosomensatz mittels CGH bestätigt werden. In 2 Fällen wurde über eine anschließende Mikrosatellitenanalyse eine Triploidie gesichert.

Diese Fälle verdeutlichen, dass erst die Kombination verschiedener molekularcytogenetischer und molekulargenetischer Methoden eine exakte Bestimmung der Abortursache ermöglicht.

In 9/22 Fällen lag ein cytogenetischer Vorbefund mit einer Strukturaberration vor. Hierbei handelte es sich um Markerchromosomen (3 Fälle), Ringchromosomen (3 Fälle) und unbalancierte Translokationen (3 Fälle). Bezogen auf strukturelle Veränderungen war die Rate der falsch negativen Ergebnisse nach CGH mit 64,3% (9/14 Fälle) hoch. In 4/9 Fällen (44,4%) dürfte der falsch negative Befund nach CGH auf eine hochgradig degradierte DNA zurück zuführen sein. In 5/9 Fällen (55,6%) konnte jedoch eine qualitativ gute DNA gewonnen werden, so dass angenommen werden musste, dass aufgrund der limitierten Auflösung der CGH die zugrunde liegenden Aberrationen, insbesondere kleine Markerchromosomen und telomernahe Chromosomenveränderungen, nicht oder nur unzureichend erfasst wurden.

In 20 Fällen (47,6%) wurde eine chromosomale Aberration nachgewiesen. Unter den Fällen mit numerischer Aberration fanden sich 6 Trisomien (zweimal eine Trisomie 3 und jeweils eine Trisomie 12, 13, 18, 21) und in 4 Fällen gonosomale Aneuploidien (je zwei Fälle mit 45,X bzw. 47,XXY).

Bei 5 Fällen mit bekannter Strukturaberration konnten die Bruchpunkte präzisiert bzw. verifiziert werden. In einem Fall mit partieller Duplikation 2p konnte über CGH eine genaue Identifizierung und Lokalisation des duplizierten Segmentes erfolgen und der cytogenetische Befund bestätigt werden. In 4 Fällen konnte eine Deletion nachgewiesen werden, wobei in 3 Fällen der Vorbefund präzisiert wurde. Hierbei handelte es sich in einem Fall um eine interstitielle Deletion 3p und in 2 Fällen um eine terminale Deletion 4q und 13q. Die jeweiligen fetalen Fehlbildungen ließen sich auf die chromosomalen Veränderungen zurückführen und über den Vergleich mit den Literaturdaten konnte der entsprechende Phänotyp näher charakterisiert werden. In einem Fall gelang der Nachweis einer terminalen Deletion 13q ohne cytogenetische Vordiagnostik. Die beschriebenen fetalen Fehlbildungen konnten so einem gut beschriebenen syndromalen Krankheitsbild zugeordnet werden. In 3 Fällen konnte die zugrunde liegende Strukturaberration mittels CGH aufgrund telomernaher Bruchereignisse nur unzureichend dargestellt werden.

In einem Fall gab die CGH-Analyse neben dem Nachweis einer chromosomalen Imbalance (Trisomie 12) zusätzlich auch Hinweis auf den Entstehungsmechanismus der Chromosomenaberration.

Trotz der Einschränkung beim Nachweis struktureller Veränderungen, die jedoch im Abortgeschehen eher eine untergeordnete Rolle spielen, belegen die erhobenen Daten, dass die retrospektive CGH-Analyse an archiviertem Abortmaterial, eine potente Methode zur Aufdeckung genetischer Imbalancen bei Aborten ist. Die aktuellen Einsatzmöglichkeiten und Grenzen im Bereich der Fetalpathologie konnten in der vorliegenden Arbeit ausführlich dargestellt werden. Sie ist bisher die einzige Methode, die komplexe Retrospektivanalysen an Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben ermöglicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CGH in der Paido- und Fetalpathologie sowohl zur Aufdeckung von de novo-Aberrationen in Nachkommen von genetisch unauffälligen Eltern, als auch zur Bestätigung von unbalancierten Situationen in Nachkommen von einem Elternteil mit reziproker Chromosomenaberration sinnvoll angewendet werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass nur über die Kombination von verschiedenen molekularcytogenetischen und molekulargenetischen Methoden eine Potenzierung des Informationsgehaltes zu erzielen ist. Erst die Aufdeckung und Abklärung chromosomaler Aberrationen als Ursache für Aborte und fetale Fehlbildungen ermöglicht eine detaillierte Phänotyp-Genotyp-Korrelation, eine präzise Abschätzung des Wiederholungsrisikos für die Eltern sowie eine Verbesserung der Beratungssituation hinsichtlich der prognostischen Interpretation für eine bestehende Schwangerschaft.

7 Zukünftige Entwicklungen

Die Methode der Comparativen Genomhybridisierung (CGH) hat das diagnostische Spektrum in der allgemeinen Pathologie, Tumorgenetik, Fetalpathologie und Cytogenetik erweitert. Da das Verfahren der CGH unabhängig von der Kultivierung von Zellpopulationen oder der Verfügbarkeit geeigneter DNA-Sonden ist, besteht insbesondere im Bereich der Fetal- bzw. Paidopathologie ein weitreichendes diagnostisches Anwendungsgebiet hinsichtlich retrospektiver Untersuchungen an unterschiedlich archivierten Geweben. Essentiell ist jedoch, dass bei der Anwendung einer molekularcytogenetischen Methode die Vor- und Nachteile und insbesondere das jeweilige Auflösungsvermögen verdeutlicht werden.

Mit den molekularcytogenetischen Methoden lassen sich Alterationen lediglich auf chromosomaler oder subchromosomaler Ebene nachweisen. Das neu entwickelte Verfahren der Array CGH, bei der die Chromosomen durch immobilisierte DNA-Fragmente (Arrays) ersetzt werden, besitzt jedoch ein weit höheres Auflösungsvermögen als die CGH an Metaphasechromosomen. DNA-Imbalancen können so in einer Größenordnung von <100kb bzw. bis <50kb nachgewiesen werden (Solinas-Toldo et al. 1997, Pinkel et al. 1998, Barrett et al. 2004). Zudem besteht das Potential zur Automatisierung. Ein Chip mit DNA-Segmenten aus BAC-Klonen, die das gesamte Genom in einem durchschnittlichen Abstand von weniger als 500kb repräsentieren, ermöglicht nicht nur den Nachweis bekannter Mikrodeletionssyndrome und kryptischer Rearrangements, sondern auch den Nachweis bisher unbekannter Mikrodeletionen und -duplikationen (Zielinski et al. 2005). Neu entwickelte Computerprogramme zur Darstellung der gesamten Array CGH-Daten in Bezug auf Chromosomenlokalisierung erleichtern die Analyse der Chromosomenprofile und die Detektion genetischer Veränderungen (Chi et al. 2004).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit bietet die Array CGH bei der Analyse von cytogenetisch nicht untersuchten Frühaborten zum Nachweis von Aneuploidien und chromosomalen Imbalancen (Benkhalifa et al. 2005). Beim Vergleich cytogenetischer Befunde mit Ergebnissen nach Array CGH konnte in 4 von 41 Fällen eine zusätzliche Aberration identifiziert werden, die nicht mittels konventioneller Cytogenetik detektiert wurden (Schaeffer et al. 2004). So konnte eine Mosaiktrisomie 20, eine interstitielle Deletion 9p, eine terminale Duplikation 10q sowie eine interstitielle Duplikation 15q der Prader-Willi/Angelman-Syndrom Region nachgewiesen werden. Die Array CGH dient somit der Analyse zur schnellen, genomweiten und hochauflösenden

Untersuchung. Die Limitierung genomischer Mikroarrays sind falsch positive und falsch negative Ergebnisse aufgrund von Kreuzungshybridisierungen zwischen Test-DNA und den multiplen BAC-Klonen. Demzufolge ist es wichtig, Mikroarray-Ergebnisse mit Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) oder anderen unabhängigen Methoden zu überprüfen (Mao & Pevsner 2005). Zudem handelt es sich um eine vergleichsweise teure Methodik, was deren Einsatz in der Routinediagnostik bislang limitiert.

Die Kenntnis der Pathogenese von Aborten ist vergleichsweise noch gering. So liegen beispielsweise wenige Informationen über die molekularen Mechanismen der Implantation eines Embryos vor, die offensichtlich ein sehr kritisches Ereignis darstellt. Mit zunehmender Sensitivität der Untersuchungsmethoden sind grundlegende Erkenntnisse zu erwarten, die als Ausgangspunkt für weitere diagnostische und therapeutische Entscheidungen dienen können. Die Abklärung der Frage nach den zugrunde liegenden Ursachen angeborener Chromosomenstörungen ist eine der Herausforderungen der molekularen Medizin.

8 Tabellenanhang

Tabelle A

Liste für Fälle mit unauffälligem CGH-Ergebnis

Fall-Nr.	SSW	Indikation für PD	cytogenetischer Vorbefund	Faciale Dysmorphien	Innere Fehlbildungen/ Herzfehler	Gehirnfehlbildungen	Skelettfehlbildung, Gelenkkontrakturen, Sandalenfurchen	untersuchtes Material				CGH			Sonstiges	
								a	b	c	d	NT	DOP-PCR	GenomiPhi Amplification		
O-518/88	23	-	-	+	- / -	-	-	Lu Ni					+			IUFT, Oligohydramnion, Hydrops fetalis
O-574/88	k.A.	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Ni Ge					+	+		
O-1980/02	21	-	-	+	- / +	k.A.	k.A.	Lu					+			IUFT, IUGR, Hydrocephalus, V.a. Noonan-S.
O-2017/02	15	-	-	+	- / +	k.A.	+	Lu Ni					+			V.a. Trisomie 21, unauffällig an Abortzotten
O-2022/03	18	-	-	k.A.	+ / +	+	+	Lu Ni					+			Ahydramnie, Hypoplasie aller Röhrenknochen, Holoprosencephalie, Nierenagnesie
O-2065/03	k.A.	-	-	+	+ / +	k.A.	+		Zu				+			IUGR, V.a. Triploidie
S-145/03	20	-	-	+	- / -	-	-	Ni					+			Placentainfarkte, Placentallösung
V-1738/94	k.A.	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Zo					+	+		Frühabort, auffällig an Abortzotten
V-2317/01	k.A.	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Zo					+			Frühabort, V.a. Triploidie
V-2351/02	13	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		Zo				+			IUGR, placentares Zottenödem, V.a. Turner-Syndrom
V-2381/03	9	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Zo					+			unreifes ödematöses Zottengewebe, V.a. Chromosomenstörung
O-943/91	NG	V.a.Pottersequenz	unauffällig	+	++ / +	-	+	Ge Ha					+			V.a. Trisomie 21

Fall-Nr.	SSW	Indikation für PD	cytogenetischer Vorbefund	Faciale Dysmorphien	Innere Fehlbildungen/ Herzfehler	Gehirnfehlbildungen	Skelettfehlbildung, Gelenkkontrakturen, Sandalenfurche	untersuchtes Material				CGH			Sonstiges	
								a	b	c	d	NT	DOP-PCR	GenomiPhi Amplification		
O-1842/02	23	V.a. Triploidie, Oligohydramnion	unauffällig	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		Zu				+			
O-1949/02	17	IUFT	unauffällig	+	+ / +	k.A.	+	Lu Pla					+			Nackenödem, Herzfehler, V.a. Trisomie 21
O-101/85	k.A.	Psyche	zusätzliches Markerchromosom	+	+ / -	k.A.	+	Lu Le					+	+		
O-317/87	k.A.	Alter	zusätzliches Markerchromosom im Mosaik	+	- / -	-	+	Lu Gen					+			
O-875/90	15	Alter	zusätzliches Markerchromosom im Mosaik	+	+ / -	+	+	Lu Ni					+			
O-542/88	17	Alter	Ringchromosom im Mosaik	+	+ / -	k.A.	+	Lu Ni					+			
O-633/88	19	Alter	Ringchromosom im Mosaik	+	- / -	-	+	Lu Ni					+			
O-1485/96	17	k.A.	Ringchromosom	+	- / -	++	-	Lu					+	+		
O-665/89	22	Psyche	unbalancierte Translokation	+	+ / -	-	+	Lu Ni					+			
O-1896/01	18	auffälliger Tripletest, Anhydramnie	+D in KZ, unauffällig in LZ	+	+ / -	-	+		Mu				+			V.a. Trisomie 13

Legende: k.A. = keine Angaben; V.a. = Verdacht auf; PD = Pränataldiagnostik; NT = Nicktranslation; KZ = Kurzzeitkultur; LZ = Langzeitkultur; NG = Neugeborenes
 IUGR = intrauterine growth retardation; IUFT = intrauteriner Fruchttod; + = Merkmal vorhanden; - = Merkmal nicht vorhanden
 a = Formalin fixiertes und paraffiniertes Gewebe; b = frisches oder nativ eingefrorenes Gewebe; c = Blut; d = Chromosomensuspension
 Ge = Gehirn; Gen = Genitale; Ha = Harnblase; Le = Leber; Lu = Lunge; Mu = Muskel; Ni = Niere; NN = Nebenniere; Pla = Placenta; Zo = Zotten; Zu = Zunge

Tabelle B

Liste für Fälle mit auffälligem CGH-Ergebnis

Fall-Nr.	SSW	Indikation für PD	cytogenetischer Vorbefund	Faciale Dysmorphien	Innere Fehlbildungen/ Herzfehler	Gehirnfehlbildungen	Skelettfehlbildung, Gelenkkontrakturen, Sandalenfurche	untersuchtes Material				CGH			Sonstiges	
								a	b	c	d	NT	DOP-PCR	GenomiPhi Amplification		
O-506/88	24	-	-	++	++ / -	++	++	Ni Haut					+			balancierte Translokation (13;20) beim Vater
O-515/88	29	-	-	+	+ / k.A.	+	+	Ni					+	+		auffällig an Fibroblasten
O-1154/93	21	-	-	+	+ / -	k.A.	+	Lu Ni					+			Nackenhyprom
O-1946/02	23	-	-	+	+ / -	-	+		Zu				+			V.a. Pottersequenz, auffällig an Abortzotten
O-2039/03	25	-	-	k.A.	- / -	+	k.A.	Lu Ni					+			auffällig an Abortzotten
S-41/02	24	-	-	k.A.	+ / -	k.A.	k.A.	Lu Pla					+			Wachstumsretardierung, Placentitis
V-1771/95	12	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Zo					+			auffällig an Abortzotten, ramifikationsgestörte Placenta
V-2307/02	k.A.	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Zo					+	+		Eianlagestörung
V-2370/02	8	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		Zo							Eianlagestörung, Duplikation 8p beim Vater
FBK 137	k.A.	-	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		Zo				+			auffällig an Abortzotten
O-2051/03	19	Alter	Trisomie 21	+	- / +	k.A.	+		Zu				+			Nackenödem
306/03	NG	-	dup(2p)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.				+		+	+		unklares Fehlbildungssyndrom
O-212/86	16	Alter	del(3p)	+	- / -	+	-	Ni					+			
O-643/88	18	Alter	del(4q)	+	+ / +	-	+	Lu Ni					+	+		

Fall-Nr.	SSW	Indikation für PD	cytogenetischer Vorbefund	Faciale Dysmorphien	Innere Fehlbildungen/ Herzfehler	Gehirnfehlbildungen	Skelettfehlbildung, Gelenkkontrakturen, Sandalenfurche	untersuchtes Material				CGH			Sonstiges
								a	b	c	d	NT	DOP-PCR	GenomiPhi Amplification	
O-1035/92	23	Alter	Deletion im Mosaik	+	+/-	-	+	Lu Ni Haut				+			
O-750/88	20	Hygroma colli	CVS: del(Xq); AZ: 45,X	+	- / +	-	+	Lu Ni Zo				+			
O-1919/01	16	Alter	zusätzliches Markerchromosom im Mosaik	+	- / -	-	-		Mu			+			
O-162/85	17	auffälliger Tripletest	Ringchromosom im Mosaik	+	- / -	-	-	Lu Ni				+			Gaumenspalte
O-236/86	20	balancierte Translokation (5;22) beim Vater	unbalancierte Translokation an Nabelschnurblut	+	+ / +	+	+	Lu Ni				+			
O-684/89	16	Inversion bei Mutter	auffällig an CVS	+	+ / +	k.A.	+	Lu Ni				+			Subcutanödem

Legende: k.A. = keine Angaben; V.a. = Verdacht auf; PD = Pränataldiagnostik; CVS = Chorion Villi Sample; AZ = Amnionzellen; NT = Nicktranslation; NG = Neugeborenes
a = Formalin fixiertes und paraffiniertes Gewebe; b = frisches oder nativ eingefrorenes Gewebe; c = Blut; d = Chromosomensuspension
Lu = Lunge; Mu = Muskel; Ni = Niere; Pla = Placenta; Zo = Zotten; Zu = Zunge
+ = Merkmal vorhanden; - = Merkmal nicht vorhanden

Tabelle C

Auflistung aller bearbeiteten Fälle hinsichtlich stattgefundener Pränataldiagnostik, CGH-Ergebnisse und anderer Methoden

Fall-Nr.	Bemerkungen	pränatal vordiagnostiziert	Befund nach CGH	Befund durch andere Methoden präzisiert
O-101/85		47,XX,+mar	rev ish XX	nein
O-114/85		t(1;13)	nein	nein
O-162/85		46,XX,r(18)/45,XX,-18	rev ish XX, dim(18q22.1qter)	nein
O-212/86		46,XY,del(3)(p11p14)	rev ish XY, dim(3p12p14)	nein
O-236/86		t(5,22)(p13;q13)pat	rev ish XY, enh(5)(p15.1pter)	nein
O-317/87		46,XY/47,XY,+mar	rev ish XY	nein
O-506/88		nein	rev ish XY, dim(13q22-qter)	nein
O-515/88	an Fibroblasten: 46,XX,r(13)(p12q13/14)	nein	rev ish XX, dim(13q21.1qter)	nein
O-518/88		nein	rev ish XY	nein
O-542/88		46,XX/46,XX,r(19)	rev ish XX	nein
O-574/88		nein	rev ish XX	nein
O-633/88		46,XY,r(14)(p12q32)	rev ish XY	nein
O-643/88	an Fibroblasten: 46,XY,del(4)(q31.3->qter)	46,XY,del(4q?)	rev ish XY, dim(4q32qter)	nein
O-665/89		46,XX,-21,+t(13;21)(pter->q13::21.2->qter),pat	rev ish XX	nein
O-684/89		46,XY,dup(13)(q22->qter)	rev ish XY, enh(13q32qter)	nein
O-750/89		46,XX,del(Xq?) in Plac.; 45,X in AZ	rev ish X	nein
O-875/90		46,XX/47,XX,+mar	rev ish XX	nein
O-895/90		46,XX/47,XX,+mar	nein	nein
O-943/91		46,XX	rev ish XX	nein
O-944/91		46,XX,13q-	nein	nein
O-955/91		46,XX,del4q	nein	nein
O-1035/92		46,XY/46XY,del(9)(p22p23)[80%]	rev ish XY, dim(9p22p23)	nein
O-1154/93		nein	rev ish X	nein
O-1173/93		nein	nein	nein
O-1242/94		nein	nein	nein

Fall-Nr.	Bemerkungen	pränatal vordiagnostiziert	Befund nach CGH	Befund durch andere Methoden präzisiert
O-1362/95		45,XX,-14/46,XXr(14)/46,XX,der(14)	nein	nein
O-1475/96		47,XY,+der(8)t(6;8)(q26->qter;pter->q12),mat	nein	nein
O-1485/96		46,XY,r(18)(p11q23)/45,XY,-18	rev ish XY	nein
O-1488/96		46,XX,r(18)	nein	nein
O-1842/00		46,XX	rev ish XX	nein
O-1893/01	nur MS bei V.a. UPD 2	47,XX,+2[38]/46,XX[6] an CVS; 46,XX an AZ	keine CGH	Ausschluß UPD 2 durch MS
O-1896/01		46,XY[9]/46,XY,+D-Gruppe KZK; 46,XY LZK	rev ish XY	nein
O-1910/01	nur FISH+MS	46,XX,del(4)(p16.3)	keine CGH	ja; FISH+MS
O-1919/01		(46,XX [19]/47,XX,+r(2)[21])	rev ish XX, enh (2p13q13)	ja; M-FISH+MS+MD
O-1946/02	an Abortzotten: 47,XXY	nein	rev ish XY, enh X	nein
O-1949/02		46,XY an CVS	rev ish XY	nein
O-1980/02		nein	rev ish XX	nein
O-2017/02	an Abortzotten: 46,XX; V.a. Down-Syndrom	nein	rev ish XX	ja; FISH mit LSI 21
O-2022/03		nein	rev ish XY	nein
O-2039/03	an Abortzotten: 47,XXY	nein	rev ish XY, enh X	nein
O-2051/03		47,XX,+21	rev ish XX, enh(21)	nein
O-2065/03	zusätzlich MS; V.a. Triploidie	nein	rev ish XX	ja;Tripl. mat. bestätigt durch MS
118/02	nur FISH+MS	46,XX,inv dup del(8)(qter->p23::p23->11.2)	keine CGH	präzisiert durch MS
306/03	postnatal: 46,XY,dup(2)(p13p22)	nein	rev ish XY, enh 2p13p22)	nein
S-41/02	V.a. chromosomale Aberration	nein	rev ish XY, enh (18),mat	ja; Maternität Ts18 durch MS
S-145/03	V.a. chromosomale Aberration	nein	rev ish XX	nein
FBK137	an Abortzotten: 47,XX,+3	nein	rev ish XX, enh(3)	nein
V-1738/94	an Abortzotten: 46,XX,der(7)t(7;?14)	nein	rev ish XX	
V-1771/95	an Abortzotten: 46,XY,add(22)(p13p11.1)	nein	rev ish XY, enh(12)	ja; FISH; MS: Maternität+UPD12
V-2307/01		nein	rev ish XX, enh(3)	
V-2309/01	an Abortzotten: 46,XY,add(8)(p23); nur MD+MS	nein	keine CGH	MD:rev ish XY, enh(6q22) + FISH
V-2317/01	zusätzlich MS; V.a. Triploidie	nein	rev ish XX	ja;Tripl. mat. bestätigt durch MS
V-2351/01	an Abortzotten: 46,XX; V.a. Turner-Syndrom	nein	rev ish XX	ja; FISH mit WCP X an Abortz.
V-2370/02	Vater mit dup(8p)	nein	rev ish XY, enh(13),mat	ja; Maternität Ts13 durch MS
V-2381/03		nein	rev ish XY	nein

Legende: FISH = Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung; MD = Mikrodissektion; MS = Mikrosatellitenanalyse; UPD = uniparentale Disomie; Ts = Trisomie

Fälle mit grauem Hintergrund: CGH ohne Ergebnis

Tabelle D

Auflistung aller Fälle, deren Lagerzeit in Formalin, der Autolysegrad des Gewebes und DNA- Zustand

Fälle mit Ergebnis nach CGH	Lagerungszeit in Formalin	DNA-Fragmentlänge nach Agarosegel	Autolysegrad	Fälle mit Ergebnis nach CGH	Lagerungszeit in Formalin	DNA-Fragmentlänge nach Agarosegel	Autolysegrad	Fälle ohne Ergebnis nach CGH	Lagerungszeit in Formalin	DNA-Fragmentlänge nach Agarosegel	Autolysegrad
O-101/85	1,5 Jahre	200-600bp	/	O-1910/01		>700bp	Ib+IIa	O-114/85	2 Jahre	100-250bp	Ib+IIb
O-162/85	4 Wochen	200-1500bp	/	O-1919/02		300-1500bp	/	O-895/90	4 Monate	150-500bp	/
O-212/86	3 Wochen	200-800bp	/	O-1946/02		>1500bp	/	O-944/91	2,5 Monate	250-600bp	/
O-236/86	3 Monate	100-1000bp	/	O-1949/02	3 Wochen	200-800bp	Ib/IIb	O-955/91	3 Monate	150-500bp	/
O-317/87	1 Woche	200-1000bp	/	O-1980/02	1 Woche	200-1000bp	Ib+IIa	O-1173/93	4 Wochen	200-500bp	/
O-506/88	2 Wochen	200-1500bp	/	O-2017/02	2 Wochen	200-1000bp	Ia+IIa	O-1242/94	6 Wochen	200-500bp	k.A.
O-515/88	5 Wochen	200-1500bp	/	O-2022/03	2 Wochen	300- >1500bp	Ia+IIa	O-1362/95	6 Wochen	200-700bp	Ia
O-518/88	6 Monate	200-1200bp	k.A.	O-2039/03	3 Wochen	200-1200bp	/	O-1475/96	4 Wochen	200-500bp	Ia
O-542/88	5 Wochen	200-1500bp	/	O-2051/03		>1500bp	Ia+IIa	O-1488/96	2,5 Monate	200-700bp	/
O-574/88	4 Wochen	200-1200bp	/	O-2065/03		>1500bp	Ia				
O-633/88	4 Wochen	200-800bp	/	118/02		/	Ib+IIb				
O-643/88	4 Wochen	200-1200bp	k.A.	306/03		>1500bp	/				
O-665/89	2,5 Monate	200-600bp	k.A.	S-41/02	1 Woche	200-2000bp	Ia+IIa				
O-684/89	3 Wochen	200-1500bp	/	S-145/03	1 Woche	200-1200bp	k.A.				
O-750/89	4 Wochen	200-1200bp	/	FBK 137		>1500bp	/				
O-875/90	2 Wochen	200-1500bp	/	V-1738/94	2 Wochen	200-700bp	/				
O-943/91	2,5Monate	200-700bp	/	V-1771/95	2 Wochen	200-800bp	/				
O-1035/92	5,5 Monate	200-700bp	k.A.	V-2307/01	1 Woche	>1500bp	k.A.				
O-1154/93	3 Wochen	300-1500bp	Ib+IIb	V-2309/01		/	/				
O-1485/96	2,5 Monate	200-700bp	Ia	V-2317/01	2 Wochen	200-1200bp	/				
O-1842/00		300-1500bp	Ia	V-2351/02	2 Wochen	>1500bp	/				
O-1893/01		/	/	V-2370/02		>1500bp	/				
O-1896/01		>700bp	/	V-2381/03	2 Wochen	>1100bp	/				

164

DNA-Länge Optimum: 300-1500bp
 DNA leicht degradiert: 200-700bp
 DNA degadiert : 200-500bp

DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe
 DNA-Isolierung aus Chromosomensuspension
 DNA aus EDTA-Blut

I: Mazeration der Haut
 Ia: beginnende Mazeration der Haut
 Ib: fortgeschrittene Mazeration der Haut
II: Autolyse der inneren Organe
 IIa: beginnende Autolyse der inneren Organe
 IIb: fortgeschrittene Autolyse der inneren Organe

/ = keine Autolyse
 k.A.keine Angaben

9 Literaturverzeichnis

- Acevedo N, Smith GD (2005): Oocyte-specific gene signaling and its regulation of mammalian reproductive potential. *Front Biosci* 1; 10: 2335-2345
- Aladhani SMS, Gould CP, Muhammad FA (2000): A new inherited interstitial deletion of the distal long arm of chromosome 4, {del(4)(q32q33)}. *Hum Hered* 50: 146-150
- Amiel A, Reish O, Gaber E, Kedar I, Diukman R, Fejgin M (2000): Replication asynchrony increases in woman at risk for aneuploid offspring. *Chromosome Res* 8(2): 141-150
- Arnold N, Haeger AC, Jacobsen A, Kiechle M, Jonat M (2003): Analysis of ovarian borderline tumors by CGH with DNA obtained from paraffin embedded material. *Medgen* 3:284
- Aviram-Goldring A, Fritz B, Bartsch C, Steuber E, Daniely M, Lev D, Chaki R, Barkai G, Frydman M, Rehder H (2000): Molecular cytogenetic studies in three patients with partial trisomy 2p, including CGH from paraffin-embedded tissue. *Am J Med Genet* 91: 74-82
- Back E, Hertel C, Vogel W, Bettecken, F, Thiesen M (1977): Deletion of the long arm of chromosome 4 [46,XX,del(4)(q31)] in a patient with congenital anomalies. *Ann Génét* 20(4): 294-296
- Badge R, Yardley J, Jeffreys A, Armour J (2000): Crossover breakpoint mapping identifies a subtelomeric hotspot for male meiotic recombination. *Hum Mol Genet* 9: 1239-1244
- Barlow DP (1995): Gametic imprinting in mammals. *Science* 270 (5242): 1610-1613.
- Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, Tsang P, Curry B, Baird K, Meltzer PS, Yakhini Z, Bruhn L, Laderman S (2004): Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 21: 17765-17770
- Bartsch C, Aslan M, Köhler J, Miny P, Horst J, Holzgreve W, Rehder H, Fritz B (2001): Duplication dup(1)(q32q44) Detected by Comparative Genomic Hybridization (CGH): Further Delineation of Trisomies 1q. *Fetal Diagnosis and Therapy* 16: 265-273
- Bartsch, C (2000): Comparative Genomhybridisierung (CGH) an Formalin fixierten, paraffiniertem Gewebe zur Aufdeckung chromosomaler Aberrationen in der Fetalpathologie. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
- Bassam BJ (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196(1):80-83
- Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SDM (1986): Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Mol Cell Biol* 6: 3826-3830
- Baumer A, Balmer D, Binkert F, Schinzel (2000): A Parental origin and mechanisms of formation of triploidy: a study of 25 cases. *Eur J Hum Genet* 8: 911-917
- Beck L, Heywinkel E, Mikat-Drozchynski B (1998): Embryonalentwicklung, Anlagestörung, Abort und Abortursachen. *Gynäkologe* 31: 813-819
- Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, du Manoir S, Haddad BR (2001): Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 75: 374-376
- Belloso JM, Caballin MR, Gabau E, Baena N, Vidal R, Villatoro S, Guitart M (2005): Characterization of six marker chromosomes by comparative genomic hybridization. *Am J Med Genet* 136(2): 169-174
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A (1991): Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 39: 351-354
- Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi m, Tachdjian G, Demiroglu A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed m, qusiyeh MB (2005): Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn* 25: 894-900
- Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Döhner H, Lichter P (1995): Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias reveals a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85: 3610-3618

- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P (1998): Minimal size of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 172-175
- Biesecker L (2002): The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet* 107: 263-266
- Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, Gillberg C, Nordenskjold M (1995): Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 55(1): 85-94
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris h, Keymolen K, Devroey P, Van Steirtegham A., Liebaers I (2002): Prenatal Testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 17; 10: 2600-2614
- Boué A, Gallano P (1984): A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 4: 45-67
- Boué A, Boué J, Gropp A (1985): Cytogenetics of pregnancy wastage. In Harris H, Hirschhorn K (eds) *Advances in human genetics*. Vol 14 Plenum Press, New York, pp 1-57
- Boué J, Boué A, Lazar P (1975): Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous abortions. *Teratology* 12: 11-26
- Brajencovic-Milic B, Petrovic O, Krasevic M, Ristic S, Kapovic M (1998): Chromosomal anomalies in abnormal human pregnancies. *Fetal Diagnosis and Therapy* 13: 187-191
- Breen CJ, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glancy M, Hall K, Hegarty AM, Khokhar MT, Power M, Ryan K, Green AJ, Stallings RL. (1999): Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies. *J Med Genet* 36: 511-517
- Bruyère H, Rupps R, Kuchinka BD, Friedman JM, Robinson WP (2000): Recurrent trisomy 21 in a couple with a child presenting trisomy 21 mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 21 in the euploid cell line. *Am J Med Genet* 94: 35-341
- Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallionemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J (1995): Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 57: 1211-1220
- Burgess JK, Hazelton RH (2000): New developments in the analysis of gene expression. *Redox Rep* 5: 63-73
- Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM, Ferguson-Smith ME, Willat LR (1992): Reverse chromosome painting: a method for rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 29: 299-307
- Chandley AC (1991): On the parental origin of de novo mutation in man. *J Med Genet* 28: 217-223
- Cheung VG, Nelson SF (1996): Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc natl Acad Sci USA* 10; 93(25): 14676-14679
- Chi B, deLeeuw, Coe BP, MacAulay C, Lam WL (2004): SeeGH-A software tool for visualization of whole genome array comparative genomic hybridization data. *BMC Bioinformatics* 5:13-17
- Chudley AE, Pabello PD, Bingham W, Goluboff N (1982): Letter to the editor: del(4)(q31) syndrome. *Am J Med Genet* 13: 341-343
- Cody JD, Pierce JF, Brkanac Z, Plaetke R, Ghidoni PD, Kaye CI, Leach RJ (1997): Preferential loss of the paternal alleles in the 18q- syndrome. *Am J Med Genet* 69: 280-286
- Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN (1999): Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acid Research* 27(16): e12
- Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B (2002): Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71: 162-164
- Crane JP, Cheung SW (1988): An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue. *Prenat Diagn* 8: 119-129
- Crispino B, Cardoso H, Mimbacas A, Mendez V (1995): Deletion of chromosome 3 and a 3;20 reciprocal translocation demonstrated by chromosome painting. *Am J med Genet* 55: 27-29

- Crolla JA (1998): FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet* 75: 367-381
- Daniel A, Malafiej M (2003): A series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and literature review excluding chromosome 15. *Am J Med Genet* 117A: 212-222
- Daniel A, Malafiej M, Preece K, Chia N, Nelson J, Smith M (1994): Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing. *Am J Med Genet* 53: 8-18
- Daniely M, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A (1999): Detection of numerical chromosome aberrations by comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 19: 100-104
- Daniely M, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A (1999): Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86: 51-55
- Davis JM, Clarren SK, Salk DJ (1981): the del(4)(q31) syndrome-a recognizable disorder with atypical Robin malformation sequence. *Am J Med Genet* 9: 113-117
- DeFonbrune P (1949): *Technique de micromanipulation*. Monographus de l'Institut Pasteur, Masson, Paris
- Delhanty JDA (2005): Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res* 111: 237-244
- Demjek J, Voitassák J, Malová J (1992): Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 46: 129-136
- Devroey P, Van Steirteghem A (2004): A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod.* 10; 1:19.28
- Dietze I (2000): Identifizierung von Markerchromosomen mittels Mikrodissektion. Diplomarbeit, Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
- Dietze I, Fritz B, Steuber E, Kornmann E, Bachmann I, Piecha E, Schoner K, Rehder H (2003): Characterisation of a supernumerary marker chromosome derived from chromosome 2 by Multicolor-FISH and Comparative Genomic Hybridisation. *Medgen* 15 (W6 04): 280
- Dietze I, Fritz B, Huhle D, Simoens W, Piecha E, Rehder H (2004): Clinical, cytogenetic and molecular investigation in a fetus with Wolf-Hirschhorn syndrome with paternally derived 4p deletion. *Fetal Diagn Ther* 19: 251-260
- Dietze I, Fritz B, Kolitsch H, Piecha E, Rehder H (2004): Feasibility, reliability and limitations of comparative genomic hybridization using formalin fixed fetal tissue. *Medgen* 16 (P06-002): 105
- du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 27-41
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90: 590-610
- Edström JE (1964): Microextraction and microelektrophoresis for determination and analysis of nucleic acids in isolated cellular units. In „*Methods in Cell Physiology*“ (D.M.Prescott, ed.): 417-444 Academic Press, New York
- Eggermann T, Nothen MM, Eiben B, Hofmann D, Hinkel K, Fimmers R, Schwanitz G (1996): Trisomy of human chromosome 18: molecular studies on parental origin and cell stage of nondisjunction. *Hum Genet* 97: 218-223
- Eiben B, Bartels I, Bähr-Porsch S, Borgman S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Omers R, Rauskolb R, Hansmann I (1990): Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 47: 656-663
- Engel E (1980): A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6: 137-143
- Fang SG, Wan QH, Fujihara N (2002): Formalin removal from archival tissue by critical point drying. *BioTechniques* 33: 604-611

- Faraut T, Mermet MA, Demongeot J, Cohen O (2000): Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet Cell Genet* 88: 15-21
- Farra C, Giudicelli B, Pellissier MC, Philip N, Piquet C (2000): Fetoplacental chromosomal discrepancy. *Prenat Diagn* 20: 190-193
- Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L (1998): Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet* 102: 129-137
- Fisher JM, Harvey JF, Lindebaum RH, Boyd PA, Jacobs PA (1993): Molecular studies of trisomy 18. *Am J Hum Genet* 52: 1139-1144
- Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA (1995): Trisomy 18: Studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction. *Am J Hum Genet* 56:669-675
- Florida G, Piantanida M, Minelli A, Dellavecchia C, Bonaglia C, Rossi E, Gimelli G, Croci G, Franchi F, Gilgenkrantz S, Grammatico P, Dalpra L, Wood S, Danesino C, Zuffardi O (1996): The same molecular mechanism at the maternal meiosis I produces mono- and dicentric 8p duplications. *Am J Hum Genet* 58: 785-796
- Ford CE, Clegg HM (1969): Reciprocal translocations. *Br Med Bull* 25: 110-114
- Forozaan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP (1997): Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13: 405-409
- Frank TS, Svoboda-Newman SM, Hsi ED (1996): Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagn Mol Pathol* 5: 220-222
- Fretts RC, Boyd ME, Usher RH, Usher HA (1992): The changing pattern of fetal death, 1961-1988. *Obstet Gynecol* 79(1): 35-39
- Friedrich U, Houtman M, Holm Hansen B, Kaltoft K (2001): Microdissection and reverse painting in a melanoma cell line: a detailed description of structurally abnormal chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 125: 5-9
- Fritz B (2002): Molekularcytenetische Analysen zur Ursachenabklärung von Spontanabklärung. Habilitationsschrift, Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
- Fritz B, Dietze I, Wandall A, Aslan, M, Schmidt A, Kattner E, Schwerdtfeger R, Friedrich U (2001): A supernumerary marker chromosome with a neocentromere derived from 5p14->pter. *J Med Genet* 38: 559-556
- Fritz B, Greber-Platzer S, Frischer T, Streubel B, Gröblacher J, Amann G, Ventruba P, Rehder H, Fonatsch C (2000): Familial cryptic translocation with del 4q34->qter and dup 12pter->p13 in sibs with tracheal stenosis: Clinical and molecularcytogenetic studies and CGH analyses from archival placental tissues evidencing tertiary trisomy 4 in one abortion specimen. *Am J Med Genet* 94:271-280
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Müntefering H, Rehder H (2001): Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH) - Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions -, *Eur J Hum Genet* 9: 539-547
- Fritz B, Küster W, Ørstavik KH, Naumova A, Spranger J, Rehder H (1998): Pigmentary mosaicism in hypermelanosis of Ito further evidence for functional disomy Xp. *Human Genet* 103(4): 441-449
- Fryns JP, Timmermans J, Hoedemaekers J, Emmery I, Van Den Berghe H (1981): Pierre-Robin anomalad, moderate mental retardation and distal 4q deletion. *Ann Génét* 24(3): 187-188
- Gaillard DA, Paradis P, Lallemand AV, Vernet VM, Carquin JS, Chippaux CG, Visseaux-Coletto BJ (1993): Spontaneous abortions during the second trimester of gestation. *Arch Path Lab Med* 117: 1022-1026
- Gall K, Pavelic J, Jadro-Santel D, Poljak M, Pavelic K (1993): DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. *Int J Exp Pathol* 74: 333-337
- Gassen HG & Schrimpf G (1999): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 2. Auflage. Spektrum Verlag
- Geisler M, Kleinebrecht J (1978): Cytogenetic and histologic analyses of spontaneous abortions *Hum Genet* 45: 239-251.

- Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL, Crow YJ, Trainer AH, Connor JM (1998): A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 35(3): 225-233
- Giardino D, Finelli P, Russo S, Gottardi G, Rodeschini O, Atza MG, Natacci F (2002): Small familial supernumerary ring chromosome 2: FISH characterization and genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 111: 319-323
- Gicquel C, Gaston v, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y (2003): In Vitro fertilisation may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the *KCNQ1OT* gene. *Am J Hum Genet* 72: 1338-1341
- Girardet A, Coignet L, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP, Pellestor F (1996): Aneuploidy detection in human sperm nuclei using PRINS technique *Am J Med Genet* 64: 488-492
- Giuffrè M, La Placa S, Carta M, Cataliotti A, Marino M, Piccione M, Pusateri F, Meli F, Corsello G (2004): Hypercalciuria and kidney calcifications in terminal 4q deletion syndrome. *Am J Med Genet* 126°: 186-190
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985): Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 118-126
- Golbus MS, Conte FA, Daentl DL (1973): Deletion from the long arm of chromosome 4 (46,XX,4q-) associated with congenital anomalies. *J Med Genet* 10(1): 83-85
- Goumy C, Mihaescu M, Tchirkov A, Giollant M, Bonnet-Dupeyron MN, Jaffray JY, Geneix A, Perissel B, Francannet C, Boespflug-Tanguy O, Vago P (2005): An unusual familial chromosome 9 “variant” with variable phenotype: characterization by CGH analysis. *Morphologie* 89(285): 71-75
- Grasemann C, Gratiás S, Stephan H, Schuler A, Schramm A, Klein-Hitpass L, Rieder H, Schneider S, Kappes F, Eggert A, Kohmann DR (2005): Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma. *Oncogene* 24(42): 6441-6449
- Grevengood C, Dalton JD, Dungan JS, Park VM, Tharapel AT, Martens P, Ward JC, Shulman LP, Simpson JL, Elias S. 1993. Prenatal detection of a de novo supernumerary marker chromosome as der(2)(p13q12) in a fetus with abnormal fetus. *Am J Hum Genet* 53: 1796
- Guan XY, Meltzer PS, Dalton WS, Trent JMF (1994): Identification of cryptic sites of DNA sequences amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nat Genet* 8:155-161 Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. *Genomics* 22(1): 101-107
- Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Morizio E, Fantasia D, Colosimo A, Rinaldi MM, Cristini L (2004): Identification of 14 rare marker chromosomes and derivatives by spectral karyotyping in prenatal and postnatal diagnosis. *Am J Med Genet* 127A: 144-148
- Guttenbach M, Engel W, Schmid M (1997): Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Hum Genet* 100: 1-21
- Hagag NG, Viola MV (1993): *Chromosome Microdissection and Cloning*. Academic Press. Inc.
- Hamant O, Golubovskaya I, Meeley R, Fiume E, Timofejeva L, Schleiffer A, Nasmyth K, Cande WZ (2005): A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Curr Biol* 24; 15(10): 948-54
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M (1996): Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28: 167-175
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA (1980): A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 44: 151-178
- Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S (1995): Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57: 867-874
- Hassold T, Pettay D, Robinson A, Uchida I (1992): Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum Genet* 89: 647-652

- Henning W, Huijuser P, Vogt P, Jackle H, Edström JE (1983): Molecular cloning of microdissected lampbrush loop DNA sequences of *Drosophila hydei*. *EMBO J* 2: 1741-1746
- Hertz JM, Coerdts W, Hahnemann N, Schwartz M (1988): Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3. *Hum Genet* 79: 389-391
- Heyat M, Bartels I, Gratz G, Osmers R, Rauskolb R (1991): Chromosomenanomalien in Spontanaborten. *TW Gynäkologie* 4: 23-28.
- Hirose Y, Aldape K, Takahashi M, Berger MS, Feuerstein BG (2001): Tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) is an effective method to analyze genetic aberrations in invasive tumors. *J Mol Diagn* 3(2): 62-67
- Holdsworth J, Chaganti RS (1994): Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol* 145: 1253-1260
- Hook EB, Schreinemachers DM, Willey AM, Cross PK (1984): Inherited structural cytogenetic abnormalities detected incidentally in fetuses diagnosed prenatally: frequency, parental-age association, sex-ratio trends, and comparisons with rates of mutants. *Am J Hum Genet* 36(2): 422-443
- Hu L, Sham JS, Tjia WM, Tan YQ, Lu GX, Guan XY (2004): Generation of a complete set of human telomeric band painting probes by chromosome microdissection. *Genomics* 83(2): 298-302
- Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RS (2000): Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 28(4): 395-403
- Hummel S, Herrmann B, Rameckers J, Müller D, Sperling K, Neitzel H, Tönnies H (1999): Proving the authenticity of ancient DNA comparative genomic hybridization. *Naturwissenschaften* 86: 500-503
- Hwang KS, Pearson MA, Stankiewicz P, Lennon PA, Cooper ML, Wu J, Ou Z, Cai WW, Patel A, Cheung SW (2005): Cryptic unbalanced translocation t(17;18)(p13.2;q22.3) identified by subtelomeric FISH and defined by array-based comparative genomic hybridization in a patient with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Med Genet* 137(1): 88-93
- ISCN (2005): An international system for human genetic nomenclature, Shaffer LG, Toomerup N (eds); S. Karger, Basel 2005
- Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P (1990): Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43: 499-504
- Jacobs PA (1990): The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev Suppl* 1: 63s-74s
- Jacobs PA, Szulman AE, Funkhouser J, Matsuura JS, Wilson CC (1982): Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet* 46: 223-231
- Joly G, Lapiere JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana SP, Vekemans M, Turelu C (2001): Comparative genomic hybridization in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 60: 212-219
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citron G, Sauter G, De Vries S, Kerschmann R, Carroll P, Waldman FM (1995): Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 213-219
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 231-243
- Kalousek D (1987): Anatomic and chromosome anomalies in specimen of early spontaneous abortion: seven-year experience. *Genetic Aspects of Developmental Pathology*. Alan R. Liss, Inc., New York: 153-168
- Kalousek DK (1993): The effect of confined placental mosaicism on development of the human aneuploid conceptus. *Birth Defects Orig Artic Ser* 29: 39-51

- Karimi-Nejad R, Karimi-Nejad MH, Khodadad A, Najafi A (1990): An interstitial deletion of the short arm of chromosome 3. *Clin Genet* 37: 369-370
- Keeling SL, Lee-Jones L, Thompson P (2001): Interstitial deletion 4q32-34 with ulnar deficiency: 4q33 may be the critical region in 4q terminal deletion syndrome. *Am J Med Genet* 99: 94-88
- Kiely JL, Paneth N, Susser M (1986): An assessment of the effects of maternal age and parity in different components of perinatal mortality. *Am J Epidemiol* 123: 444-454.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose h, Bentz M, Döhner H, Lundsteen C (1999): Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridisation by standard reference intervals. *Genes Chromosomes & Cancer* 25: 410-413
- Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C (1998): Detection of chromosomal gains and losses in CGH analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31: 163-173.
- Kirchhoff M, Pedersen S, Kjeldsen E, Rose H, Dunø M, Kølvråa S, Lundsteen C (2004): Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH. *Am J Med Genet* 127A: 111-117
- Kirchhoff M, Rose h, Lundsteen (2001): High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38: 740-744
- Kitoh H, Ryozaawa S, Harada T, Kondoh S, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Okita K, Sasaki K (2005): Comparative genomic hybridisation analysis for pancreatic cancer specimens obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol* 40: 511-517
- Kline J, Stein Z (1987): Epidemiology of chromosomal anomalies in spontaneous abortion: In Bennet MJ, Edmonds DK (eds) *Prevalence, manifestation and determinants*, Oxford, Blackwell Scientific Publisher, pp29-50
- Knijnenburg J, van der Burg M, Nilsson p, van Amstel HKP, Tanke H, Szuhai K (2005): Rapid detection of genomic imbalances using micro-arrays consisting of pooled BACs covering all human chromosome arms. *Nucleic Acids Res* 33(18): e159
- Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zuhu Y (1998): DNA copy number amplifications in human neoplasms: Review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152: 1107-1123
- Koller S (1983): *Risikofaktoren der Schwangerschaft*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio
- Kosztolanyi G (1987): Does „ring syndrome exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75: 174-179
- Kotzot D, Martinez MJ, Bagci G, Basaran S, Baumer A, Binkert F, Brecevic L, Castellan C, Chrzanowska K, Dutly f, Gutkowska A, Karaüzüm SB, Krajewska-Walasek M, Luleci G, Miny P, Riegel M, Schuffenhauer S, Seidel, H, Schinzel A (2000): Parental origin and mechanisms of formation of cytogenetically recognisable de novo direct and inverted duplications. *J Med Genet* 37: 281-286
- Kupke KG, Muller U (1989): Parental origin of the extra chromosome in trisomy 18. *Am J Hum Genet* 45(4): 599-605
- Kuukasjärvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J (1997): Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 18: 94-101
- Lapierre JM, Tachdjian G (2005): Detection of chromosomal abnormalities by comparative genomic hybridisation. *Curr Opin Obstet gynecol* 17: 171-177
- Lasan Trcic R, Hitrec V, Letica I, Čuk M, Begivić D (2003): Small supernumerary marker chromosome derived from proximal p-arm of chromosome 2: identification by FISH. *CMJ* 44(4): 477-479
- Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, Mahoney MJ, Desnick RJ, Schulman J, Copeland KL, Verlinsky Y, Yang-Feng T, Schonberg SA, Babu A, Tharapel A, Dorfmann A, Lubs HA, Rhoads GG, Fowler SE, de la Cruz F (1992): Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn* 12: 317-345

- Levy B, Gershin IF, Desnick RJ, Babu A, Gelb BD, Hirschhorn K, Cotter PD (1997): Characterization of a de novo unbalanced chromosome rearrangement by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 76: 68-71
- Li S, Tuck-Muller CM, Yan Q, Wertelecki W, Chen H (1995): A rapid method for PCR amplification of DNA directly from cells fixed in Carnoy's fixative. *Am J Med Genet* 55: 116-119
- Lichter P, Fischer K, Joos S, Fink T, Baudis M, Potkul RK, Ohl S, Solinas-Toldo S, Weber R, Stilgenbauer S, Bentz M, Döhner H (1996): Efficacy of current molecular cytogenetic protocols for the diagnosis of chromosome aberrations in tumor specimens. *Cytokines and Molecular Therapy* 2: 163-170
- Lim CK, Jun Jh, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong Mk, Kang IS (2004): Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat diagn* 24: 556-561
- Lin AE, Garver KL, Diggans G, Clemens M, Wenger SL, Steele MW, Jones MC, Israel J (1988): interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4: Further delineation of phenotypes. *Am J Med Genet* 31: 533-548
- Lipson A, Collis J, Green C (1982): Partial deletion of the long arm of chromosome 4: a clinical syndrome. *J Med Genet* 19(2): 155-157
- Ljungner E, Cnattingius s, Lundin c, Annerén G (2005): Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84: 1103-1107
- Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, Kalousek D (2000): Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 66: 1516-1521
- Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Schinzel A (1992): Molecular study of 45,X conceptuses: correlation with clinical findings. *Am J Med Genet* 1992 42: 487-490
- Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Rodriguez de Alba M, Trujillo MJ, Ramos C (2005): Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH. *Prenat Diagn* 25(10): 934-938
- Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1989): Cloning of defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338: 348-350
- Ludwig M, Katalinic A, Groß S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B (2005): Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42: 289-291
- Lurie IW, Ilyina G, Gurevich DB, Romyantseva NV, Naumchik IV, Castellan C, Hoeller A, Schinzel A (1995): Trisomy 2p: analysis of unusual phenotypic findings. *Am J Med Genet* 55: 229-236
- Maher ER, Reik W (2000): Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 105(3): 245-246
- Mailhes JB, Marchetti F (1994): The influence of postovulatory ageing on the retardation of mouse oocyte maturation and chromosome segregation induced by vinblastine. *Mutagenesis* 9: 541-545
- Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD (2001): Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 38: 151-158
- Maher ER & Reik W (2000): Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 105(3): 245-246
- Mao R, Pevsner F (2005): The use of genomic microarrays to study chromosomal abnormalities in mental retardation. *MRDD Research Reviews* 11: 279-285
- Marchio A, Terris B, Meddeb M, Pineau P, Duverger A, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A (2001): Chromosomal abnormalities in liver cell dysplasia detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 54: 270-274
- Mark HF, Wyandt H, Huang XL, Milunski JM (2005): Delineation of a supernumerary marker chromosome utilizing a multimodal approach of G-banding, fluorescence in situ hybridization, confirmatory P1 artificial chromosome fluorescence in situ hybridization, and high-resolution comparative genomic hybridization. *Clin Genet* 68(2): 146-151

- Martin RH. (1998): Genetics of human sperm. *J Assist Reprod Genet* 15: 240-245
- Martius G, Breckwoldt M, Pflaiderer A (1996): *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Mathur A, Stekol I, Schatz D, macLaren NK, Scott ML, Lippe B (1991): The parental origin of the single X chromosome in Turner Syndrome: lack of correlation with parental gene or clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 48: 682-686
- McFadden DE, Langlois S (2000): Parental and meiotic origin of triploidy in the embryonic and fetal periods. *Clin Genet* 58: 192-200
- Meguro M, Mitsuya K, Nomura n, Kohda M, Kashiwagi A, Nishigaki R, Yoshioka H, Nakao M, Oishi M, Oshimura M (2001): Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes. *Hum Mol Genet* 15: 383-394
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM (1992): Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat Genet* 1:24-28
- Menasha J, Levy b, Hirschhorn k, Kardon NB (2005): Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genet Med* 7(4): 251-263
- Michelena de MI, Campos PJ (1989): Terminal deletion 4q in a severely retarded boy. *Am J Med Genet* 33: 228-230
- Miny P, Koppers B, Dworniczak B, Bogdanova N, Holzgreve W, Tercanli S, Basaran S, Rehder H, Exeler R, Horst J (1995): Parental origin of the extra haploid chromosome set in triploidies diagnosed prenatally. *Am J Med Genet* 57: 102-106
- Mitchell JA, Packman S, Loughman WD, Fineman RM, Zackai E, Patil SR, Emanuel B, Bartley JA, Hanson JW (1981): Deletions of different segments of the long arm of chromosome 4. *Am J Med Genet* 8: 73-89
- Mitter NS, Bryke CR, Sunderji SG, hallinan EJ, Gordon LP (1984): prenatal diagnosis of interstitial deletion of the short arm of chromosome 3. *Cytogenet* 105S: 308
- Monroy N, Lopez M, Cervantes a, garcia-Cruz D, Zafra g, Canun S, zenteno JC, Kofman-Alfaro S (2002): Microsatellite analysis in Turner Syndrome: Parental origin of X chromosome and possible mechanism of formation of abnormal chromosomes. *Am J Med Genet* 107: 181-189
- Morris JK, Mutton DE, Alberman E (2005): Recurrences of free trisomy 21: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. *Prenat Diagn* 25: 1120-1128
- Morton NE, Chin D, Holland C, Jacobs PA, Pettay D (1987): Chromosome anomalies as predictors of recurrence risk of spontaneous abortions. *Am J Med. Genet* 28: 353-360
- Moskaluk CA, Kern SE (1997): Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histological tissue sections. *Am J Pathol* 150(5): 1547-1552
- Mrasek K, Starke H, Liehr T (2005): Another small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 2: towards a genotype/phenotype correlation. *J Histochemistry Cytochemistry* 53(3). 367-370
- Müller-Navia J, Nebel A, Oehler D, Theile U, Zabel B, Schleiermacher E (1996): Micro-dissection and DOP-PCR-based revers chromosome painting as a fast and reliable strategy in the analysis of various structural chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 16: 915-922
- Müller-Navia J, Nebel A, Schleiermacher E (1995): Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection in prenatal diagnosis. *Hum Genet* 96: 661-667
- Mullis KB, Faloona F (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335
- Munné S (2002): Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *RBM Online* 4: 183-196
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995): Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64: 382-391

- Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, Green AR (1998): Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 15: 93-105
- Neri G, Reynolds JF, Westphal J, Hinz J, Daniel A (1984): interstitial deletion of chromosome 3p: Report of a patient and delineation of a proximal 3p deletion syndrome. *Am J Med Genet* 19: 189-193
- Ness GO, Lybæk H, Houge G (2002): Usefulness of High-Resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 113: 125-136
- Neuber M, Rehder H, Zuther C, Lettau R, Schwinger E (1993): Polyploidies in abortion material decrease with maternal age. *Hum Genet* 91(6): 725-726
- Newton CR, Graham A (1994): PCR; Spektrum, Akademischer Verlag
- Nicolaidis P, Petersen MB (1998): Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13: 313-319
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M (2000): Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320: 1708-1712
- O'Leary JJ, Browne G, Landers RJ, Crowley M, Healy EB, Street JT, Pollock AM, Murphy J (1994): The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR in situ hybridisation. *J Histochem* 26: 337-346
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K (2000): Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 73: 300-304
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue j, Benet J (2002): Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 8(10): 958-963
- Ostroverkhova NV, Nazarenko SA, Rubtsov NB, Nazarenko LP, Bunina EN (1999): Characterization of a small supernumerary ring marker derived from chromosome 2 by forward and reverse chromosome painting. *Am J Med Genet* 87: 217-220
- Overhauser J, McMahon J, Oberlender S, Carlin ME, Niebuhr E, Wasmuth JJ, Lee-Chen J (1990). Parental origin of chromosome 5 deletions in the cri-du-chat syndrome. *Am J Med Genet* 37: 83-86
- Ozcan T, Burki N, Parkash V, Huang X, Pejovic T, Mahoney MJ, Ward DC (2000): Cytogenetical diagnosis in paraffin-embedded fetoplacental tissue using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 20: 41-44
- Parruti G, Di Ilio C, Calabrese G, Stuppia L, Guanciali Franchi P, Aceto A, Palka G (1989): A new case of partial 2p trisomy due to de novo interstitial duplication 2p21→p22. *Ann Génét* 32: 55-58
- Pauer HU, von Beust G, Bartels I (1999): Zytogenetische Ursachen von Aborten. *Reproduktionsmedizin* 15: 124-132
- Pellestor F, Andreo B, Arnal fF, Humeau C, Demaille J (2002): Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17(8): 134-145
- Petek E, Windpassinger C, Simma B, Mueller T, Wagner K, Kroisel PM (2003): Molecular characterization of a 15 Mb constitutional de novo interstitial deletion of chromosome 3p in a boy with developmental delay and congenital anomalies. *J Hum Genet* 48: 283-287
- Petersen I, Schwendel A, Bockmühl U, Dietel M (1996): Die komparative genomische Hybridisierung. *Pathologie* 17: 333-341
- Philipp T, Kalousek DK (2002)a: Generalized abnormal embryonic development in missed abortions: Embryoskopische und cytogenetische findings. *Am J Med Genet* 111: 43-47
- Philipp T, Kalousek DK (2002)b: Neural Tube Defects in missed abortions: Embryoskopische und cytogenetische findings. *Am J Med Genet* 107: 52-57
- Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK (2003): Embryoskopische und cytogenetische analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod* 18(8): 1724-1732

- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collind C, Kuo WL, Chen c, Zai Y, Dairkee SH, ljung BM, Gray JW (1998): High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20: 207-211
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallionemi A, Kallionemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 10-26
- Pittalis MC, Dalpra L, Torricelli F, Rizzo N, Nocera G, Cariati E, Santarini L, Tibiletti MG, Agosti S, Bovicelli L (1994): The predictive value of cytogenetic diagnosis after CVS based on 4860 cases with both direct and culture methods. *Prenat Diagn* 14(4): 267-278
- Plattner R, Heerema NA, Howard-Peebles PN, Miles JH, Soukup S, Palmer CG (1993): Clinical findings in patients with marker chromosomes identified by fluorescence in situ hybridisation. *Hum Genet* 91: 589-598
- Poland BJ, Miller JR, Jones DC, Trimble BK (1977): Reproductive Counselling in patients who have had a spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 127(7): 685-691
- Rehder H, Coerd W, Eggers R, Klink F, Schwinger E (1989): Is there a correlation between morphological and cytogenetic findings in placental tissue from early missed abortions? *Hum Genet* 82: 377-389
- Ren H, Francis W, Boys A, Chueh AC, Wong N, La P, Wong LH, Ryan J, Slater HR, Choo KH (2005): BAC-based PCR fragment microarray: high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints. *Hum Mutst* 25(5): 476-482
- Rethoré MO, Couturier J, Mselati JC, Cochois B, Lavaud J, Lejeune J (1979): Monosomy 4q32.1->4qter survenue de novo chez un nouveau-né multimalformé. *Ann Génét* 22(4) : 214-216
- Rieder H (1998): Molekularzytogenetischer Nachweis chromosomaler Veränderungen bei der akuten lymphatischen Leukämie. Habilitationsschrift, Fachbereich Humanmedizin
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251
- Robertson SP, O'Day K, Bankier A (1998): The 4q-syndrome: delineation of the minimal critical region to within band 4q31. *Clin Genet* 53: 70-73
- Robinson WP (2000): Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* 22(5): 452-459
- Robinson WP, Bernasconi F, Lau A, McFadden DE (1999): Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *Am J Med Genet* 84: 34-42
- Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I (1996): Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH). *Pathologe* 17: 342-348
- Rousseau F, El Ghouzzi V, Delezoide AL, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J (1996): Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum Mol Genet* 5 (4): 509-512
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning- a laboratory manual*. Gold Spring Harbor, New York
- Sanchez-Cespedes M, Cairns P, Jen J, Sidransky D (1998): Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR): evaluation of its reliability for screening of genetic alterations in neoplasia. *Biotechniques* 25: 1036-1038
- Sanchez-Garcia JF, de Die-Smulders CEM, Weber JW, Jetten AGP, Loneus WH, Hamers AJH, Engelen JJM (2001): De novo duplication (5)(q31.3q33.3): Report of a patient and characterization of the duplicated region using microdissection and FISH. *Am J Med Genet*. 100: 56-61
- Sandig KR, Mücke J, Trautmann U (1982): The partial 4q monosomy. *Eur J Pediatr* 138: 254-257
- Sanger TM, Olney AH, Zaleski D, Pickering D, Nelson M, Sanger WG, Dave BJ (2005): Cryptic duplication and deletion of 9q34.3->qter in a family with a t(9;22) (q34.3;p11.2). *Am j Med Genet* 15(138): 51-55
- Sarda P, Lefort G, Devaux PH, Humeau C, Rieu D (1992): Multiple congenital anomalies due to partial 2p13->2pter duplication resulting from an unbalanced X;2 translocation. *Ann Génét* 35: 117-120

- Sarda P, Lefort G, Fryns JP, Humeau C, Rieu D (1992): Interstitial deletion of the distal long arm of chromosome 4. *J Med Genet* 29: 259-261
- Sato K, Kojima T, Izuta M, Miyakawa T, Takahashi K, Tametika S, Kasai T, Ogawa K (1992): Clinical course of early fetal loss and its chromosomal characteristics. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 18: 131-138
- Scalenghe F, Truco E, Edström JE, Pirotta V; Melli ML (1981): Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 82: 205-216
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Martin CL (2004): Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submikroskopische imbalances in spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 74: 1168-1174
- Schlüter G, Rossius M, Wessel A, Zoll B (2003): Das Noonan-Syndrom. *Deutsches Ärzteblatt* 18: 1192-1197
- Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M (2005): Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridization (array-CGH). *J Med Genet* 42: 699-705
- Schrock E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Sprbeck J, Jalal S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biesecker L, duManoir S, Ried T (1997): Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet* 101(3): 255-262
- Sellner W (1989): Fixierung histologischer Präparate. in: Böck (ed.) *Mikroskopische Technik/Romeis*, 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, pp 83-87
- Senger G, Lüdecke HJ, Horsthemke B, Claussen U (1990): Microdissection of banded chromosomes. *Hum Genet* 84: 507-511
- Serville F, Broustet A (1977): Pericentric inversion and partial monosomy 4q associated with congenital anomalies. *Hum Genet* 39: 239-242
- Shanske AL, Edelmann L, Kardon NB, Gosset P, Levy B (2004): Detection of an interstitial deletion of 2q21-22 by high resolution comparative genomic hybridization in a child with multiple congenital anomalies and apparent balanced translocation. *Am J Med Genet* 131A: 29-35
- Shapiro S, Cernie HS, Abramovicz M (1971): Factors associated with early and late fetal loss. *Adv in Planned Parenthood* 6: 45
- Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T, harada N, Kondoh t, Miyake N, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N (2004): Molecular charakterization of inv dup del(8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet* 128A: 133-137
- Short MP, Sha KD, Djamdjian S, Dische MR, Gilbert F (1986): Brief clinical report: Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 (3p14). *Am J Med Genet* 24: 649-652
- Shroff M, Israel J, Rosenthal F (1981): Congenital anomalies associated with partial deletion of the long arm of chromosome 4 [46,XY,del(4)(q31)]. *Cytogenet* 122A: 369
- Sichong Z, Bui TH, Castro I, Iselius I, Håkansson S, Lundmark KM (1981): A girl with an interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 studied with a High-Resolution banding technique. *Hum genet* 59: 178-181
- Simone N, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta L (1998): Laser capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *TIG* 14: 272-276
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997): Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 399-407
- Speicher MR, du Manoir S, Schröck E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T (1993): Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA amplification. *Hum Mol Genet* 2: 1907-1914

- Speicher MR, Jauch A, Walt H, du Manoir S, Ried T, Jochum W, Sulser T, Cremer T (1995): Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization and interphase cytogenetic. *Am J Pathol* 146: 1332-1340
- Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, Willard HF, Ledbetter DH, Hejtmancik JF, Pollack MS, O'Brien WE, Beaudet AL. (1988): Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 42: 217-226
- Sperling K (1998): Has low dose irradiation an effect on chromosomal non-disjunction in man? In Singh JR, Sperling K, Niemitz K (eds.) *Progress in human genetics*. Printwell, Amritsar, pp 263-273
- Sperling K, Pelz J, Wegner RD, Dorries A, Gruters A, Mikkelsen M (1994): Significant increase in trisomy 21 in Berlin nine months after the Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation? *BMJ* 309: 158-162
- Sperling K, Pelz J, Wegner RD, Schulzke I, Struck E (1991): Frequency of trisomy 21 in Germany before and after the Chernobyl accident. *Biomed Pharmacother* 45: 255-262
- Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Beelitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T (2003): Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 114(1): 51-67
- Stern C, Pertile M, Norris H (1999): Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* 14: 2097-2101
- Stirrat GM (1990): Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. *Lancet* 22; 336: 1191-1192
- Strachan T & Read AP (2005): *Molekulare Humangenetik*. Spectrum Verlag, pp 139-168
- Strehle EM, Bantogk HM (2003): The phenotype of patients with 4q- syndrome. *Genet Couns* 14(2): 195-2005
- Tejada MI, Mendoza R, Carbonero K, Lizarraga MA, Escudero F, Benito JA (1990): Deletion of chromosome 4: 46,XY,del(4)(q31.3) after gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization.embryo transfer. *Fertil Steril* 54(5): 953-954
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992): Degenerate oligonucleotide-primed PCR general amplification of target DNA by single degenerate primers. *Genomics* 13: 718-725
- Tönnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H (2001): Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnosis. *Cytogenet Cell Genet* 93: 188-194
- Tsubosa Y, Sugihara H, Mukaisho K, Kamitani S, Peng DF, Ling ZQ, Tani T, Hattori T (2005): Effects of degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction amplification and labelling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridisation. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 158: 156-166
- Uchida IA, Freeman VC (1985): Triploidy and chromosomes. *Am J Obstet Gynecol* 151(1): 65-69
- Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamanaka C, Momoi T, Nakahata T (2002): *Am J Med Genet* 111: 134-139
- Van Dyke DL, Weiss L, Roberson JR, Babu VR (1983): The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet* 35: 301-308
- Van Esch H, Bauters M Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg d, Bienvenu T, Jensen LR, Gecc J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G (2005): Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 77(3): 442-453
- Van Kempen C, Roepaan HM (1975): A patient with congenital anomalies and a deletion of the long arm of chromosome 4 [46,XY,del(4)(q31)]. *J Med Genet* 12: 204-212

- Verhagen PC, Zhu XL, Rohr LR, Cannon-Albright LA, Tavtigian SV, Skolnick MH, Brothman AR (2000): Microdissection, DOP-PCR, and comparative genomic hybridisation of paraffin-embedded familial prostate cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 122(1): 43-48
- Verjaal M, Leschot NJ, Wolf H, Treffers PE (1987): Karyotypic differences between cells from placenta and other fetal tissues. *Prenat Diagn* 7(5): 343-348
- Villa N, Riva P, Colombo D, Sala E, Mariani S, Zorloni C, Crosti F (2001): Identification of a small supernumerary marker chromosome, r(2)(p10q11.2), and the problem of determining prognosis. *Prenat Diagn* 21: 801-805
- Voss R, Ben-Simon E, Avital A, Godfrey S, Zlotogora J, Dagan J, Tikochinski Y, Hillel J (1989): Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental disomy be common in humans? *Am J Hum Genet* 45(3):373-380
- Walch A, Komminoth P, Hutzler P, Aubele M, Hofler H, Werner M (2000): Microdissection of tissue sections: applications to the molecular genetic characterisation of premalignant lesions. *Pathobiology* 68: 9-17
- Wang HS, Hunter AG (1979): Supernumerary chromosome possibly representing segment p11 yields q14 of chromosome 2. *Ann Genet* 22(3): 148-150
- Wegner RD, Schröck E, Obladen M, Becker R, Stumm M, Sperling K (1996): Partial trisomy/monosomy 6q in fetal cells and CVS long-term culture not present in CVS short-term culture. *Prenat Diagn* 16: 741-748
- Weimer J, Kiechle M, Wiedemann U, Tönnies H, Neitzel H, Ruhenstroth e, Ovens-Raeder A, Arnold N (2000): Delineation of a complex karyotypic rearrangement by microdissection and CGH in a family affected with split food. *J Med Genet* 37: 442-445
- Weiss MM, Hermsen MAJA, Meijer GA, van Grieken NCT, Baak JPA, Kuipers EJ, va Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 52: 243-251
- Weiss MM, Kuipers EJ, Meuwissen SGM, van Diest PJ, Meijer GA (2003): Comparative genomic hybridisation as a tool in diagnostic pathology. *J Clin Pathol* 56: 522-527
- Weisse A, Starke H, Heller A, Tönnies H, Volleth M, Stumm M, Gabriele S, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002): Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet* 39: 434-439
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA (1999): Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27(4): 1214-1218
- Wieczorek D, Bolt J, Schweddeheimer K, Gillessen-Kaesbach G (1997): A patient with interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 (pter->p21.2::p12->qter) and a CHARGE-like phenotype. *Am J Med Genet* 69: 413-417
- Wiegand P, Domhove J, Brinkmann B (1996): DNA degradation in formalin fixed tissues. *Pathologie* 1996 17: 451-454
- Wolstenholme J, Rooney DE, Davison EV (1994): Confined placental mosaicism, IUGR, and adverse pregnancy outcome: a controlled retrospective U.K. collaborative survey. *Prenat Diagn* 14: 345-361
- Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B (2002): Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 10(3): 269-274
- Wulf, Schmidt-Matthiesen (1985): Reproduktion-Störungen in der Frühgravidität. Urban&Schwarzenberg 2. Auflage: 115
- Wyandt HE, Kasparzak R, Ennis J, Willson K, Koch V, Schnatterly P, Wilson W, Kelly TE (1980): Interstitial 3p deletion in a child due to paternal paracentric inserted inversion. *Am J Hum Genet* 32: 731-735
- Yang V, Nielsen MK, Heilman J, Hanson JW, Patil SR (1979): Deletions and duplications in the long arm region of chromosome 4 in three patients. *Cytogenet* 117A: 392
- Young RS, Palmer CG, Bender HA, Weaver DD, Hodes ME (1982): Brief cytogenetic case report: A 4.5 year-old girl with deletion 4q-syndrome-de novo, 46,XXdel(4)(pter->q31:). *Am J Med Genet* 12:103-107

- Yu CW, Chen H, Baucum RW, Hand AM (1981): Terminal deletion of the long arm of chromosome 4. *Ann Génét* 24(3): 158-161
- Yu LC, Moore DH, Magrane G, Cronin J, Pinkel D, Lebo RV, Gray JW (1997): Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). *Cytometry* 28: 191-197
- Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold T (1994): Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet* 94: 411-417
- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ (2000): Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet* 66: 1807-1820
- Zielinski B, Gratias S, Toedt G, Mendrzyk F, Stange DE, Radlschwimmer B, Lohmann DR, Lichter P (2005): Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromos Cancer* 43: 294-301

10 Anhang

10.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:

Aurich, Barth, Elsässer, Fritz, Garten, Grzeschik, Habermehl, Kirchner, Klein, Knöllner, Koolman, Kunz, Lammel, Löffler, von Löw, Mandrek, Müller, Rehder, Röhm, Schäfer, Schulz, J. Seitz, K.-A. Seitz, Steinmetz, Suske

10.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Helga Rehder für die Vergabe dieses interessanten Themas und die intensive Förderung meiner Untersuchungen.

Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Fritz möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung bezüglich der Untersuchungen, die hervorragende Zusammenarbeit, die fördernden Vorschläge und Ideen bei der Erstellung der Arbeit danken.

Frau Dr. med. Dagmar Huhle und Herrn Dr. Götz für die Überlassung einiger interessanter Fälle.

Besonderer Dank gilt auch den übrigen Mitarbeitern des Medizinischen Zentrums für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg:

- Frau Dr. med. Ernestine Piecha für die fetalpathologischen Untersuchungen.

- Frau Evelyn Kornmann und Frau Hannelore Kolitsch für die sehr gute Zusammenarbeit und Hilfestellung in allen Laborfragen.

- Frau Ina Bachmann für die Überlassung der M-FISH-Analyse.

- Frau Renate Walter und Frau Edith Kulmburg für die Chromosomenpräparation- und Färbungen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, meinem Ehemann, meiner Schwester und ihrem Mann für ihre Zuversicht und seelisch-moralische Unterstützung sowie für die computertechnische Hilfe und Korrekturlesen.