

Molekulargenetische und zytogenetische

Diagnostik

Redaktion: H.G. Klein

Array-CGH in der Routinediagnostik bei geistiger Entwicklungsstörung

Array CGH in the routine diagnostic work-up of mental retardation

Uwe Heinrich^{1,*}, Hubertus von Voss² und Imma Rost¹

¹ Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein und Dr. Rost, Martinsried, Deutschland

² Privatinstitut für Soziale Pädiatrie, Jugend- und Adoleszentenmedizin – Rehabilitationswesen, Martinsried, Deutschland

Zusammenfassung

Die Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) ist heute zum unverzichtbaren Bestandteil der Diagnostik von mentalen Entwicklungsstörungen (mental retardation) im Kindesalter geworden. Eine Nachuntersuchung im eigenen Patientenkollektiv bei primär chromosomal *unauffälligen* Kindern mit mentalen Entwicklungsstörungen (n=194) ergab bei 17 Patienten (9%) mit der BAC- (Bacterial Artificial Chromosome) Array-CGH den Nachweis einer chromosomalen Imbalance als Ursache. Zur eindeutigen und schnellen Validierung von auffälligen CGH-Ergebnissen hat sich in einer kleinen Pilotstudie an 10 Patienten, insbesondere bei chromosomalen Duplikationen, der Einsatz einer zweiten, oligonukleotidbasierten Array-CGH-Plattform bewährt (sog. Kreuzvalidierung). Aufgrund unserer eigenen und der Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen wird derzeit ein Stufenkonzept bei der genetischen Diagnostik von Kindern mit mentaler Retardierung unter kombiniertem Einsatz der BAC- und Oligonukleotid-Array-CGH sowie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) empfohlen.

Schlüsselwörter: Array CGH; CNV; FISH; geistige Entwicklungsstörung; mentale Retardierung; Mikrodeletion; Mikroduplikation.

*Korrespondenz: Dipl.-Biologe Uwe Heinrich, Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein und Dr. Rost, Lochhamer Str. 29, D-82152 Martinsried, Deutschland
Tel.: +49 (089) 895578-0
Fax: +49 (089) 895578-78
E-Mail: Uwe.Heinrich@medizinische-genetik.de

Abstract

Array comparative genomic hybridization (CGH) analysis has become an essential part of the diagnostic work-up of mental retardation in children. Using bacterial artificial chromosome (BAC)-array CGH, a follow-up examination on chromosomally inconspicuous children with mental retardation (n=194) revealed a chromosomal imbalance as the cause of the retardation in 17 patients (9%). In a small pilot study on 10 patients, we could demonstrate the benefit of applying a second, oligonucleotide-based array CGH platform as a reliable and rapid validation tool for ambiguous CGH results, in particular if duplications were suspected (cross-validation). Based on our own experience and that of other groups, a stepwise approach for the diagnosis of mental retardation in children involving a combination of BAC- and oligonucleotide-array CGH as well as fluorescence in situ hybridization (FISH) is recommended.

Keywords: array comparative genomic hybridization (CGH); copy number variants (CNVs); fluorescence in situ hybridization (FISH); mental retardation; microdeletion; microduplication.

Klinik der mentalen Retardierung (geistige Entwicklungsstörung) bei Kindern und Jugendlichen

Von einer mentalen Retardierung, definiert als IQ von unter 70, sind in industrialisierten Ländern etwa 2 bis 3% der Bevölkerung betroffen. Je nach Schweregrad der Retardierung kann auch mit den heutigen Untersuchungsmöglichkeiten nur bei einem Teil der Betroffenen die Ursache der Entwicklungsstörung gefunden werden, wobei die Angaben in der Literatur von 20 bis 70% schwanken [1, 2]. Man geht davon aus, dass bis zu 50% der geistigen Entwicklungsstörungen durch genetische Ursachen bedingt sind [3, 4]. Bei den nicht-genetischen, exogenen Faktoren als Ursache sind in erster Linie Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen zu nennen sowie Infektionen oder frühkindliche Verletzungen.

Geistige Entwicklungsstörungen präsentieren sich je nach Schweregrad unterschiedlich. Insbesondere Kinder mit „grenzwertiger“ Intelligenz (IQ 80 bis 90) und solche mit Lernstörungen (IQ 70 bis 84) erfordern zumeist eine umfangreiche Diagnostik. Mit zunehmenden Ansprüchen an die intellektuellen Fähigkeiten werden diese Kinder häufig bereits im Kindergarten, ggf. auch schon in der Krippe, und spätestens vor der Einschulung auffällig hinsichtlich ihrer geistigen Fähigkeiten und/oder ihres Verhaltens.

Der Begriff der „mentalen Retardierung“, aus dem angloamerikanischen Kulturbereich vielfach kritiklos übernommen, suggeriert in der Praxis, dass solche Verzögerungen in der Entwicklung aufgeholt werden könnten. Die Meilensteine der Entwicklung (Fixieren, Greifen, Sitzen, Stehen, Laufen, erste Worte etc.) sind hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes definiert. Werden sie nicht erreicht, so muss spätestens zum Ende des zweiten Lebensjahres die Diagnostik beginnen. Das gilt insbesondere für Kinder, die zunächst keine Hinweise auf das Vorliegen eines spezifischen Syndroms vor oder nach der Geburt zeigten. Liegen syndromale Veränderungen beim Neu- oder Frühgeborenen vor, so muss es das Ziel sein, mit humangenetischen Untersuchungen, Stoffwechseldiagnostik und bildgebenden Verfahren die Ursachen für die vorhandenen Störungen zu finden. Eltern von entwicklungsauffälligen Kindern dürfen bei Vorliegen eindeutiger Entwicklungsstörungen nicht dahingehend vertröstet werden, hier läge nur eine Retardierung vor, die aufgeholt werden könne. Insofern ist der Begriff „Retardierung“ nur bei solchen Kindern adäquat, bei denen, z.B. durch Therapie oder spezielle Förderung, eindeutig Entwicklungsfortschritte erreicht werden können.

Bei Kindern mit grenzwertiger Intelligenz (IQ zwischen 80 und 90), Lernbehinderung (IQ 70 bis 84) oder mit ausgeprägten mentalen Entwicklungsstörungen (IQ < 70) muss der diagnostische Weg eindeutig sein (Abbildung 1). Die empfohlene diagnostische Vorgehensweise (siehe auch Leitlinien der Fachgesellschaften für Neuropädiatrie sowie Sozialpädiatrie) kann als Grundlage für eine Vereinheitlichung der diagnostischen Vorgehensweise gelten, wird aber im Einzelfall immer individuell sein müssen, wenn der klinische Verdacht bereits konkret, z.B. auf ein bereits definiertes Syndrom, hinweist und damit auch gezielte Untersuchungen erfordert.

Die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden in der Humangenetik führt vielfach auch zu neuen Begrifflichkeiten. Hierbei werden meist englische Fachbegriffe eingeführt, die nur den Spezialisten vertraut sind. Ziel dieser Darstellung in Ergänzung zu einer früheren Übersicht [5] ist es, einerseits die Array-CGH hinsichtlich Indikation und Verfahren vorzustellen, andererseits aber auch die Grenzen dieser Methode darzustellen. Die humangenetische „Basisdiagnostik“ zur Abklärung einer mentalen Entwicklungsstörung stellt nach wie vor die Chromosomenanalyse dar. Eine eingehende pädiatrische und klinisch-genetische Untersuchung mit dem Ziel, somatische Veränderungen und dabei ggf. auch Dismorphien entdecken zu können, ist hierbei unverzichtbar. Hinzu kommt eine gründliche Eigen- und Familienanamnese inklusive Erhebung des Stammbaums. Vor einer erweiterten Analyse muss Kenntnis über die bereits erfolgte Entwicklung (Erreichen von Meilensteinen, siehe Abbildung 1) vorhanden sein. Als erweiterte Untersuchungen mit unterschiedlicher Wertigkeit [6] gelten: neurologische Untersuchungen, Hörtests, Überprüfen des Sehvermögens, EEG, neuroradiologische Untersuchungen (z.B. NMR, CT), Stoffwechselanalysen in Blut, Urin, gegebenenfalls auch Liquor (Neurotransmitter) etc.

Die Abklärung der Ursache einer mentalen Entwicklungsstörung ermöglicht die Abschätzung eines eventuellen Wiederholungsrisikos bei weiter bestehendem Kinderwunsch der Eltern und kann damit Grundlage für die genetische Beratung der betroffenen Familie sein. Die Familien erwarten zusätzlich Aussagen zur Entwicklungsprognose bei den betroffenen Kindern. Mit einem solchen Konzept können Maßnahmen zur Förderung bzw. in Einzelfällen auch eine Therapie bei bekannter Diagnose gezielt aufeinander abgestimmt werden.

Chromosomenstörungen stellen den größten Anteil der genetisch bedingten mentalen Entwicklungsstörungen dar. Obwohl sich in den letzten Jahrzehnten die klassische zytogenetische Untersuchung vor allem durch Erreichen einer höheren Bandenauflösung in ihrer Aussagekraft deutlich verbessern ließ, sind der lichtmikroskopischen Auswertung von Chromosomen Grenzen gesetzt. In der Routinediagnostik wird üblicherweise mit einer Auflösung von ca. 550 Banden pro haploidem Chromosomensatz gearbeitet; auch bei dieser Auflösung

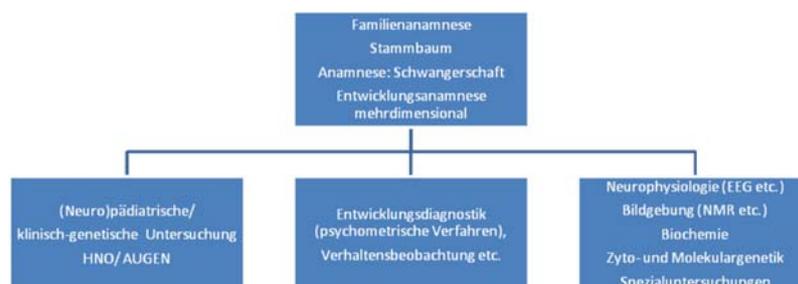


Abbildung 1 Diagnostisches Vorgehen bei Kindern mit geistigen Entwicklungsstörungen.

sind Veränderungen, die weniger als 5 bis 10 Millionen Basenpaare umfassen, nicht nachweisbar.

Durch die Entwicklung von molekularzytogenetischen Verfahren, bei denen mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden die jeweils komplementären Bereiche auf den Chromosomen nachgewiesen werden können, konnte in der Vergangenheit bereits eine höhere Auflösung erreicht werden [5]. Bei der Multicolour-FISH (M-FISH) werden sämtliche Chromosomen unterschiedlich angefärbt, womit die Herkunft von Strukturveränderungen bestimmt werden kann (Abbildung 2), bei der Subtelomerdiagnostik werden die genreichen Chromosomenenden auf Zugewinne oder Verluste hin untersucht (Abbildung 3). Diese Analysen eignen sich vor allem zum Nachweis balan-

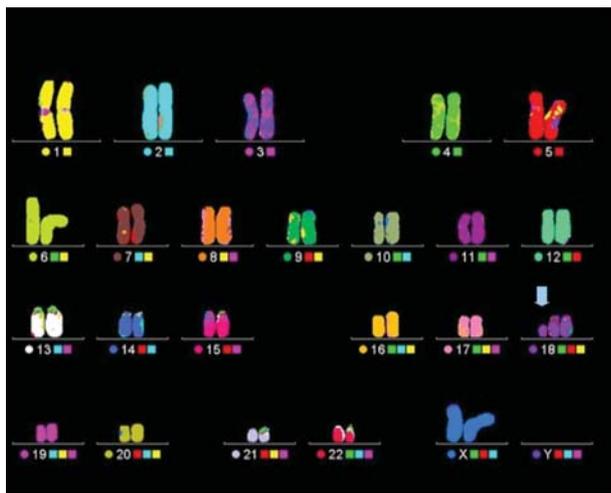


Abbildung 2 M-FISH-Analyse eines Markerchromosoms in Form eines Isochromosoms 18p (Pfeil).

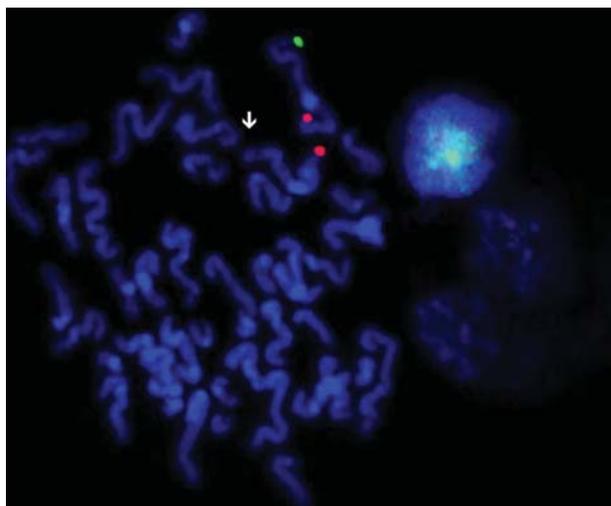


Abbildung 3 Subtelomerdiagnostik bei einer Mikrodeletion 1p36. Der Pfeil weist auf das fehlende grüne Signal der 1p-terminalen Sonde hin, die roten Signale stammen von der 1q-terminalen Sonde.

cierter oder unbalancierter Translokationen. In mehreren Studien zur Anwendung der Subtelomerdiagnostik bei mentaler Retardierung wurden in Abhängigkeit von den Einschlusskriterien bei 2 bis 7%, teilweise sogar in einem noch höheren Prozentsatz, der Patienten mit unauffälliger Chromosomenanalyse, Imbalancen gefunden [7–9]. Bei den spezifischen molekularzytogenetischen Untersuchungsverfahren, die vor allem zum Nachweis bzw. Ausschluss von Mikrodeletionssyndromen zur Anwendung kommen, wird bei einem konkreten klinischen Verdacht (z.B. Williams-Beuren-Syndrom) gezielt die syndromspezifische Sonde, in diesem Fall eine Sonde für das Elastin-Gen im Bereich 7q11.23, eingesetzt (Abbildung 4).

Prinzip der Array-CGH

Einen großen Fortschritt für die Diagnostik der mentalen Retardierung und von unklaren Syndromen stellt die Einführung der Array-CGH („molekulare Karyotypisierung“) dar [10, 11]. CGH steht für „Comparative Genomic Hybridization“ und bedeutet, dass das gesamte Genom eines Patienten mit einer Referenz-DNA, in der Regel gepoolte DNA gesunder Kontrollprobanden, verglichen wird (Abbildung 5). Die Auswertung der Hybridisierungssignale erfolgt über eine spezielle Software. Beurteilt wird dabei die Signalintensität für einen bestimmten DNA-Abschnitt, die bei einer Abweichung vom festgesetzten Referenzbereich (Verhältnis der Signalintensitäten Patienten-DNA zu Referenz-DNA=1) auf eine Amplifikation (Quotient >1,2) oder Deletion (Quotient <0,8) hinweist. In der ursprünglichen Variante der CGH, der chromosomalen CGH [12], wurden die beiden Genome in gleichen Mengenverhältnissen miteinander vermischt und diese Mischung als FISH-Sonde auf ein Chromosomenprä-

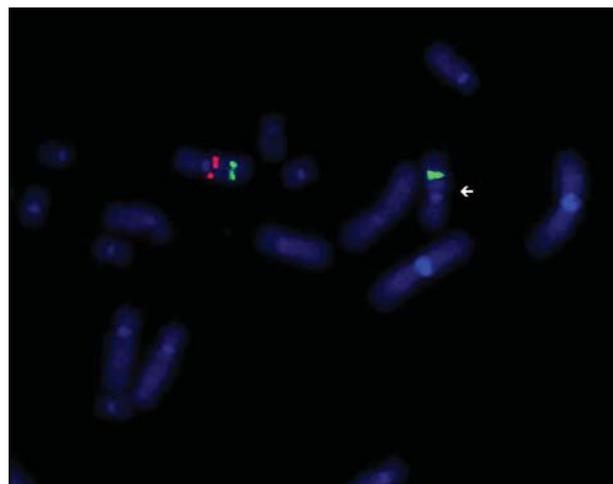


Abbildung 4 FISH-Analyse bei Williams-Beuren-Syndrom. Der Pfeil weist auf das fehlende rote Signal der Williams-Beuren-spezifischen Region, die grünen Signale stammen von der Kontrollsonde D7S486/D7S522 (chromosomale Lokalisation: 7q31).

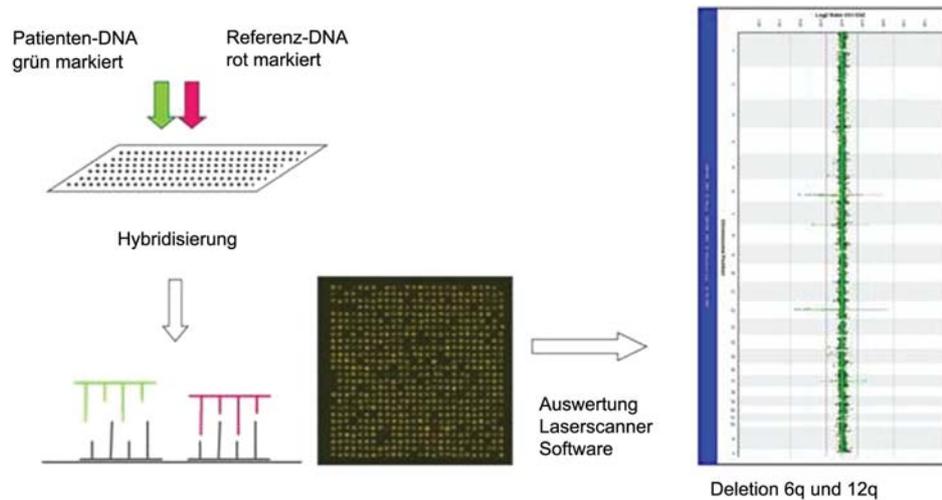


Abbildung 5 Vereinfachter Ablauf einer Array-CGH.

Fluoreszenzmarkierte Patienten-DNA (grün) und rot markierte Referenz-DNA werden zu gleichen Teilen vermischt auf den Array-Chip gegeben, auf dem BAC- oder PAC-Klone bzw. Oligomere als Sonden immobilisiert sind, die das komplette menschliche Genom repräsentieren. Beim Hybridisierungsvorgang unter standardisierten Bedingungen bindet sowohl Patienten- als auch Referenz-DNA an die jeweils komplementäre Sonde auf dem Chip. Liegt jeweils die gleiche Menge Patienten- und Referenz-DNA vor, ergibt sich für diese Sonde eine Mischfarbe. Liegt mehr Patienten-DNA vor (Duplikation), wird ein grünes Farbsignal entstehen, bei Überwiegen der Referenz-DNA (Deletion beim Patienten) ein rotes Farbsignal. Die Farbintensitäten werden mit einem Laserscanner für jede Sonde erfasst und mit einer speziellen Software ausgewertet und auf die chromosomale Lokalisation bezogen dargestellt. Im Beispiel liegen Deletionen in den Langarmen von Chromosom 6 und 12 bei einer zytogenetisch balanciert erscheinenden Translokation vor.

parat einer Kontrolle hybridisiert. Aufgrund der geringen Auflösung von durchschnittlich 8 bis 10 Mb war diese Methode der konventionellen Chromosomenanalyse jedoch nicht wirklich überlegen.

Bei der Array-CGH wird mit objektträgergroßen Chips gearbeitet, auf denen Fragmente der gesamten menschlichen Erbsubstanz, entweder als BAC- oder PAC-Klone (Größe zwischen 50 und 200 kb) oder DNA-Oligomere (Größe 20 bis 90 Nukleotide) fixiert sind. Auf diesen Chips findet die Hybridisierung mit einer 1:1-Mischung aus Patienten-DNA und Referenz-DNA statt, die Auswertung erfolgt analog zur chromosomalen CGH. Auf diese Weise lassen sich kleinste Zugewinne bzw. Verluste von genetischem Material nachweisen. Das Auflösungsvermögen der Array-CGH beginnt je nach verwendetem Chip bei 1 Mb und erreicht 8 kb und niedriger. Ein Nachteil der Array-CGH besteht darin, dass balancierte strukturelle Chromosomenveränderungen wie Translokationen oder Inversionen sowie Polyploidien nicht detektiert werden können. Die Array-CGH-Diagnostik eignet sich daher vor allem für Patienten mit einer unklaren mentalen Entwicklungsstörung und einer vorliegenden unauffälligen Chromosomenanalyse.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass bei etwa 7% der Patienten mit unspezifischer mentaler Entwicklungsstörung und einer normalen konventionellen Chromosomenanalyse mittels Array-CGH doch submikroskopisch kleine chromosomale Veränderungen als Ursache für solche Entwicklungsstörungen gefunden werden können [13, 14]. Bei Patienten, die zusätzliche Symptome aufweisen, die an eine Chromosomenstörung denken lassen

(z.B. Dysmorphiezeichen und Fehlbildungen), steigt die Zahl der nachweisbaren Veränderungen auf bis zu 20% [15]. Aufgrund dieser hohen Nachweisrate hat die Array-CGH als neue diagnostische Möglichkeit zu Recht Einzug in das Routinelabor gehalten.

Validierungskriterien

Trotz der unbestreitbaren Vorteile ist die Interpretation von Array-CGH-Ergebnissen aufgrund von Kopienzahlvarianten (copy number variants, CNV) im menschlichen Genom und der Möglichkeit von falsch positiven Befunden auch mit Fehlerquellen belastet. Aufgrund der komplexen Reaktionskinetiken von mehreren tausend Hybridisierungen auf einem Chip kann es bei den Signalintensitäten zu Überlappungen zwischen normalen und unbalancierten Chromosomenbereichen kommen. Es ist daher wichtig, die Schwellenwerte für die Signalintensitäten („cut off“), die einer Deletion bzw. Duplikation entsprechen, so zu definieren, dass falsch positive und falsch negative Befunde möglichst vermieden werden.

Aus diesem Grund müssen bei BAC-Chips vor allem Einzelklon-Imbalancen mit einer zweiten Methode überprüft werden. Im Falle von BAC/PAC-Chips ist die FISH-Analyse der Goldstandard. Andere Methoden wie die quantitative PCR (qPCR) oder die MLPA-Analyse (MLPA: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) sind mögliche, aber aufwendige und teure Validierungsverfahren. Die FISH-Validierung hat den Vorteil, dass sie in den meisten zytogenetischen Labors ein Routineverfahren ist,

den sicheren Nachweis von Deletionen erlaubt und die Lokalisation einer Duplikation feststellen kann. Nachteilig ist die Notwendigkeit von Metaphasenpräparaten (meist verbunden mit der Einsendung einer neuen Blutprobe), die Gefahr ungenügender Signalintensitäten oder von Kreuzhybridisierungen und vor allem die Tatsache, dass eine Duplikation aufgrund des geringen Unterschieds der Signalintensitäten oft nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Eine alternative Validierungsmethode besteht in der Verwendung einer zweiten Array-CGH-Plattform (Kreuzvalidierung).

Um die Praktikabilität und Validität dieses Ansatzes zu beurteilen, wurde eine Pilotstudie mit zehn Fällen durchgeführt, die bereits mittels BAC-Array analysiert und zum Teil mit FISH überprüft waren [16]. Für die Validierung kam dabei ein 244K Chip (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) zum Einsatz. Auf diesem Chip sind 236000 Oligonukleotide mit einer einheitlichen Größe von 60 Basenpaaren sowie mehrere Kontrollen aufgebracht, die ein Auflösungsvermögen von durchschnittlich 9 kb gewährleisten. Im Ergebnis hat sich dieser Validierungsansatz als Methode erwiesen, die eine schnelle und sichere Überprüfung sowohl von Deletionen als auch von Duplikationen erlaubt (Abbildung 6). Ein weiterer Vorteil dieser Plattform ist die hohe Flexibilität, da die Zusammenstellung der Oligonukleotide auch fall- oder indikationsspezifisch bestimmt werden kann (z.B. X-chromosomaler Chip für die Diagnostik X-chromosomaler Syndrome oder regionenspezifischer Chip zur genaueren Charakterisierung einer bekannten Imbalance).

Interpretation

Eine besondere Herausforderung stellt die Interpretation von Array-CGH-Analysen dar. Ähnlich wie SNPs (single nucleotide polymorphisms) sind die meisten CNVs [17, 18] im menschlichen Genom für die Anlageträger nicht krankheitsrelevant und lediglich als Ausdruck genetischer Variabilität zu sehen. CNVs können jedoch auch zu einer klinischen Symptomatik führen. Bei der Interpretation der

Array-CGH müssen daher „harmlose“ von klinisch relevanten CNVs unterschieden werden. Das ist beim heutigen Kenntnisstand in den meisten Fällen möglich. Zum Beispiel haben Lee et al. Kriterien genannt, die bei der Risikobeurteilung einer nachgewiesenen CNV hilfreich sein können [19].

Zu den Faktoren, die für eine klinisch relevante CNV sprechen, gehören z.B. die Überlappung mit einem bereits bekannten Mikrodeletions- bzw. Mikroduplikations-syndrom sowie neu entstandene CNV. Zur Beurteilung der klinischen Relevanz sind auch die Größe der CNV sowie Zahl und Art der enthaltenen Gene von Bedeutung. So sind „harmlose“ CNVs in der Regel kleiner als klinisch relevante CNVs. Die durchschnittliche Größe von Deletions-CNVs liegt in der Normalbevölkerung zwischen 15 und 120 kb [20], in der Literatur wurden aber auch CNVs von über 10 Mb Größe beschrieben [21], die keine Krankheitsassoziation zeigen. Auch das Auftreten einer CNV bei mehreren Patienten mit unterschiedlicher Symptomatik, geringem oder fehlendem Gengehalt, das Fehlen regulatorischer Elemente oder die Vererbung von einem gesunden Elternteil sprechen eher für einen „harmlosen“ oder „benignen“ CNV. Allerdings schließt die Vererbung durch einen gesunden Elternteil eine klinische Relevanz nicht notwendigerweise aus. Die Vererbung von Chromosomenabschnitten, die genetisch aktives Material enthalten, aber keine Symptomatik verursachen, ist in der klassischen Chromosomenanalyse schon seit langer Zeit als Euchromatinvariante bekannt [22]. Zu den Einflussfaktoren, durch die sich familiäre CNVs phänotypisch ausdrücken können, gehören phänotypische Variabilität, unvollständige Penetranz, elterliches Mosaik, Imprinting-Effekte, Demaskierung einer rezessiven Mutation sowie Positionseffekte [23].

Eine weitere wichtige Quelle für die Interpretation stellen Datenbanken dar. So werden beispielsweise in der „Database of Genomic Variants“ (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) in der Literatur beschriebene Varianten erfasst, die in Normalpopulationen gefunden wurden. In andere Datenbanken wie das „European

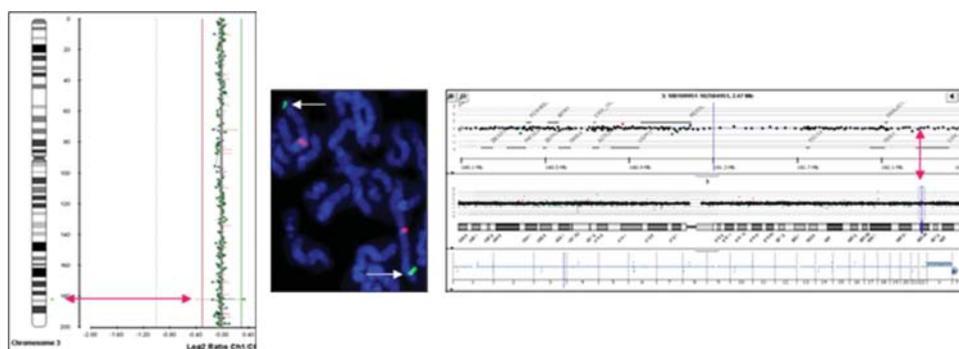


Abbildung 6 Beispiel der Validierungsstrategie:

Im BAC-Array findet sich eine Einzelklon-Duplikation im Langarm von Chromosom 3 (links). Die FISH-Analyse mit dem entsprechenden Klon als Sonde bestätigt die Duplikation nicht (Mitte), ebenso der Oligo-Array (rechts). Diese Einzelklon-Amplifikation wird daher als Artefakt interpretiert.

Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations“ (ECARUCA; <http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>) oder die „DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources“ (DECIPHER; <https://decipher.sanger.ac.uk>) können von Humangenetikern Fallbeschreibungen über Patienten mit einer chromosomalen Imbalance eingereicht werden.

Eigene Ergebnisse

Im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Martinsried wird die Array-CGH bei folgenden Indikationsgruppen eingesetzt:

Gruppe 1: Patienten mit Entwicklungsverzögerung/mentaler Retardierung bei unauffälligem Karyotyp.

Gruppe 2: Patienten mit lichtmikroskopisch balanciert erscheinenden chromosomalen Veränderungen und einer klinischen Symptomatik, die an eine Chromosomenstörung denken lässt.

Gruppe 3: Patienten mit einer bekannten chromosomalen Imbalance, die genauer charakterisiert werden soll.

Gruppe 4: Patienten mit einem zusätzlichen Markerchromosom unbekannter Herkunft.

Im Zeitraum von Dezember 2006 bis Mai 2008 wurden unter den genannten Indikationen 194 Fälle untersucht. Verwendet wurde der CytoChip Version 1 bzw. Version 2 (BlueGnome, Cambridge, UK). Die Version 2 des Chips umfasst 4209 BAC- bzw. PAC-Klone plus Positiv- und Negativkontrollen auf zwei Hybridisierungsarealen. Die durchschnittliche Auflösung liegt bei ca. 0,56 Mb, wobei die bekannten Mikrodeletions- bzw. Mikroduplikationsbereiche sowie die besonders reichen Subtelomerregionen mit einer höheren Sondendichte versehen sind. Mit diesem Chip konnten innerhalb des Patientenkollektivs 17 klinisch relevante, neu detektierte Imbalancen gefunden werden (Tabelle 1), in acht Fällen wurden bekannte Imbalancen bzw. ein Markerchromosom genauer charakterisiert (Tabelle 2). Somit liegt die Häufigkeit für neu detektierte Imbalancen in unserem Kollektiv bei ca. 9%. Bei 7 der 17 Patienten (40%) lag eine Dupli-

Tabelle 1 Neu detektierte Imbalancen nach Array-CGH (fünf Fälle ohne klinische Angaben sind nicht aufgeführt).

Patient	Befund der Array-CGH	Größe [Mb]	Symptomatik
1	Deletion 17q21.31	0,5	Sprachretardierung, faziale Muskelhypotonie, großer Mund, grobe Gesichtszüge, Hypertelorismus
2	Duplikation 17p11.2	3,6	Motorische Entwicklungsverzögerung, Muskelhypotonie, Sprachentwicklungsverzögerung, milde Dysmorphiezeichen
3	Duplikation 17p11.2	4,1	Mentale Retardierung
4	Deletion 6q22.1 q22.31	6,1–9,9	Intrauterine Wachstumsverzögerung, Gedeihstörung, milde statomotorische Retardierung, Muskelhypotonie, proportionierter Minderwuchs, Mikrozephalie, diskrete Dysmorphiezeichen, überstreckbare Gelenke
	Duplikation 12q14.3-q15	2,6–5,4	
5	Duplikation 19p13.2-p13.12	1,4	Minderwuchs, Hypertelorismus, breiter Mund, Sichelfüße, antevertierte Lidachsen
6	Deletion 13q22.2-q31.1	2,5–3,2	Entwicklungsverzögerung
7	Deletion 6p22.3	1,8–4,3	Hypertelorismus, grobe Gesichtszüge, tiefsitzende Ohren, große Zehen und Finger, ausgeprägte Entwicklungsretardierung
8	Deletion 3q29	2,1	Milde motorische Retardierung, Minderwuchs, craniofaziale Dysmorphien (Telecanthus, breite Nasenspitze, Retrognathie), Herzfehler (ASD), Nierenbeckenerweiterung
9	Deletion 8q24.3	1,6–2	Wachstumsverzögerung, Muskelhypotonie, schwaches Schreien, Vierfingerfurche bds., präaurikuläres Anhängsel, craniofaziale Dysmorphien
10	Deletion 2q23.2-q23.3	1,8–4,3	Schwere psychomotorische Retardierung, Epilepsie
11	Duplikation 2p21	2,1–2,9	Peripartale Asphyxie, Mikroretrognathie, Gaumenspalte, Truncus arteriosus communis, Rippen- und Wirbelfehlbildungen, präaxiale Hexdaktylie rechter Fuß, auffälliges EEG mit V. a. Krampfanfällen
12	Duplikation 2p25.3-p25.2	4,3–4,7	Minderwuchs, schmales Gesicht, schmales Lippenrot, Senkfuß, Sprachentwicklungsverzögerung

Tabelle 2 Zytogenetisch bekannte Imbalancen und Ergebnisbestätigung durch Array-CGH.

Patient	Befund nach Chromosomenanalyse	Befund nach Array-CGH	Größe [Mb]	Symptomatik
1	Translokation (5;9)(q14;q22.3) (Imbalance vermutet)	Deletion 5q14.3, Deletion 5q15	1,9 5,2	Dysmorphiezeichen, Makrozephalie, keine Organfehlbildungen nach der Geburt; später Entwicklung einer milden psychomotorischen Retardierung und wiederkehrende Krampfanfälle ab dem 13. Lebensjahr
2	Deletion 2q33-q35 oder 2q35-q37.1 (pränatal)	Deletion 2q35q36.3-q37.1 (postnatal)	10,3	auffälliger Ultraschall; Kind postpartal verstorben
3	Deletion 10p14	Deletion 10p15.1-p13	6,9	konnatale Hypothyreose, Pseudohypoparathyreoidismus, leichte Dysmorphiezeichen
4	Deletion 7p15.3-p15.3 (pränatal)	Deletion 3q25.1-q25.2 Deletion 7p21.2-p15.3	1,8 10,6	auffälliger Ultraschall
5	Duplikation 6p25	Duplikation 6p25.3-p24.3	6,9	Herzfehler (ASD), submuköse Gaumenspalte, Entwicklungsverzögerung
6	Derivatives Chromosom 18 [46,XY,der(18)t(9:18)(p23.1;q22.3)pat]	Duplikation 9p24.3-p21.3, Deletion 18q22.3-q23	22,9 7,1	Herzfehler (ASD Typ II), beidseitige Kniegelenks- und Hüftdysplasie, milde Dysmorphiezeichen
7	Markerchromosom	Duplikation 20p13-q11.21	24,7–29,8	Fehlende Sprachentwicklung, motorische Entwicklungsverzögerung, Makrozephalie, Muskelhypotonie, Dysmorphiezeichen (grobe Gesichtszüge, volle Wangen), kleine plumpe Hände
8	Deletion 1p36.33 nach FISH	Deletion 1p36.33-p36.32	1,9	Entwicklungsverzögerung

kation vor, bei weiteren acht eine Deletion (48%) und in zwei Fällen (12%) eine kombinierte Deletion/Duplikation als Folge einer unbalancierten Translokation (Tabelle 3). Vier Fälle ließen sich bereits beschriebenen Syndromen zuordnen: ein Patient mit einem Mikrodeletionssyndrom 17q21.31 [24–26], ein Patient mit einem Mikrodeletionssyndrom 3q29 [27] sowie zwei Patienten mit einer Mikroduplikation 17p11.2 (Potocki-Lupski-Syndrom, PLS, Abbildung 7) [28].

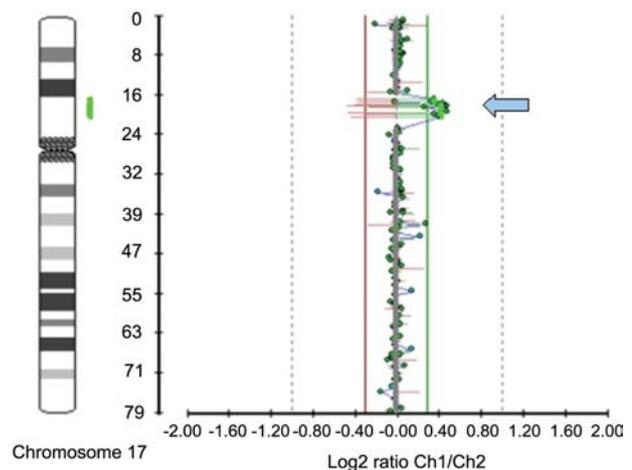
Die durchschnittliche Größe der Duplikationen lag bei 2,5 Mb mit einer Variationsbreite von 1,4 bis 4,5 Mb, die durchschnittliche Größe der Deletionen bei 3,1 Mb mit einer Variationsbreite von 0,5 bis 7,6 Mb.

Die Auswertung bereits bekannter Imbalancen zeigte die Überlegenheit der Array-CGH gegenüber der klassischen Chromosomenanalyse. In allen 8 Fällen musste

Tabelle 3 Detektionsraten chromosomaler Imbalancen mittels Array-CGH im eigenen Patientenkollektiv.

	Fallzahl (Prozent)
Gesamtzahl	194
neu detektierte Imbalancen	17 (8,8%)
davon Deletionen	8 (4,1%)
Duplikationen	7 (3,6%)
Doppelimbalancen	2 (1,0%)
bekannte Imbalancen	8 (4,1%)

zumindest ein Bruchpunkt, meistens sogar beide Bruchpunkte nach Durchführung einer Array-CGH revidiert werden. So erwies sich beispielsweise die nach Subtelomerdiagnostik terminal erscheinende Deletion 1p36 (Patient 8) als interstitielle Deletion, und im Falle der bereits pränatal zytogenetisch diagnostizierten intersti-

**Abbildung 7** Array-CGH mit dem CytoChip Version 2.0 (BlueGnome, Cambridge, UK) entsprechend einer Mikroduplikation 17p11.2 (Potocki-Lupski-Syndrom). Der Pfeil weist auf die duplizierten Klone.

tiellen Deletion 7p bei Patient 4 fand sich postnatal nach Array-CGH eine zusätzliche Deletion im Bereich 3q25, die jedoch nicht mit einer zweiten Methode überprüft werden konnte. Damit gelingt mit der Array-CGH eine weit präzisere Beschreibung chromosomaler Imbalancen, die im Einzelfall eine exaktere Genotyp-Phänotyp-Korrelation ermöglicht.

Eine besondere Indikationsgruppe stellen Patienten mit klinischen Symptomen wie z.B. Entwicklungsverzögerung und/oder Fehlbildungen, aber einer balanciert erscheinenden Chromosomenveränderung dar (Patient 1). Wie mehrere Studien gezeigt haben [29–31], findet man bei bis zu 40% dieser Patienten mit klinischen Auffälligkeiten in einem oder beiden Bruchpunktbereichen eine submikroskopische Imbalance. Bei Patient 1 konnte eine komplexe Deletion in einem der beiden Bruchpunkte einer Translokation zwischen einem Chromosom 5 und einem Chromosom 9 gezeigt werden. In einer zweiten Gruppe konnte die zytogenetisch sichtbare Chromosomenveränderung als balanciert bestätigt werden, aber es fand sich eine submikroskopische Imbalance an einer anderen Stelle des Genoms. Die Array-CGH hat demnach das Potenzial, zytogenetisch sichtbare Veränderungen auf feinstruktureller Ebene in ihrer Komplexität genauer aufzulösen.

Diskussion

Mehrere Studien konnten bestätigen, dass die BAC-Array-CGH-Analyse ein wertvolles Instrument für die ursächliche Abklärung einer mentalen Entwicklungsstörung ist. Als Untersuchungsmethode hat dieses Verfahren daher schnell Einzug in die Routinediagnostik gefunden. Da es sich um ein komplexes Nachweisverfahren handelt, müssen zumindest kleinere Imbalancen mit einer zweiten Methode überprüft werden. Die von den meisten Laboratorien als Kontrollmethode eingesetzte FISH-Analyse kann Duplikationen jedoch nicht sicher nachweisen bzw. ausschließen. Aus diesem Grund haben wir die oligonukleotidbasierte Array-CGH-Analyse auf ihre Tauglichkeit als Validierungsinstrument vor allem bei kleinen Duplikationen überprüft.

In einer Pilotstudie zeigte sich, dass alle Veränderungen, die mittels BAC-Array detektiert wurden, mit dem Oligo-Array bestätigt werden konnten. Deletionen, die mit FISH validiert werden konnten, waren auch mit dem Oligo-Array als Deletion sicher nachweisbar. Einzelklon-Amplifikationen, die mit FISH *nicht* bestätigt werden konnten, waren auch mittels Oligo-Array nicht nachweisbar und müssen daher Hybridisierungs- bzw. Auswertartefakten zugeordnet werden. Wir schließen aus diesen ersten Ergebnissen, dass die Oligo-Array-Validierungsmethode (Kreuzvalidierung) für die Routinediagnostik geeignet ist. Aufwendigere Verfahren, wie z.B. quantitative PCR oder MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), die als Alternative zur FISH-

Analyse in Frage kommen, können hierdurch ersetzt werden.

Neben Fragen der Validierung und Interpretation wird derzeit diskutiert, welche Auflösung der Arrays in der Routinediagnostik sinnvoll ist. Am häufigsten werden BAC-Chips mit einem Auflösungsvermögen von durchschnittlich 0,5 bis 1 Mb eingesetzt, einige Forschungslabore verwenden auch sog. Tiling Path-BAC-Chips, auf denen das komplette menschliche Genom durch ca. 32000 sich überlappende Klone repräsentiert ist. Das Auflösungsvermögen dieser Chips liegt bei etwa 70 kb. Oligonukleotidbasierte Chips verfügen über deutlich höhere Auflösungsgrenzen. So hat z.B. der 244K-Chip der Firma Agilent (Waldbronn) ein Auflösungsvermögen von ca. 9 kb, demnächst wird ein 1.000 K-Chip erhältlich sein. Diese hoch auflösenden Chips haben einerseits den Vorteil, auch kleinere, neue und eventuell klinisch relevante Veränderungen zu detektieren, andererseits den Nachteil, dass wesentlich mehr Veränderungen auf ihre klinische Relevanz überprüft werden müssen.

Für die diagnostische Anwendung in der Patientenversorgung erscheint uns jedoch ein Ansatz am besten geeignet, der es einerseits ermöglicht, klinisch relevante Veränderungen mit hoher Sicherheit nachzuweisen, andererseits den Validierungsaufwand auf einen in der klinischen Anwendung sinnvollen Umfang beschränkt. Selbstverständlich stellt sich die Frage, ob nicht die Anwendung eines oligonukleotidbasierten, maximal hochauflösenden Chips von vornherein zu besseren Ergebnissen führen würde. Unsere Pilotstudie zeigte bei Kindern mit mentalen Entwicklungsstörungen unter Verwendung des Oligochip-Arrays keine größeren Amplifikationen oder Deletionen, die der BAC-Array nicht detektiert hätte. Laut De Vries et al. [15] sind die klinisch relevanten Aberrationen in der Regel größer (Median 2,76 Mb) als die klinisch nicht relevanten Varianten (Median 0,43 Mb). Man kann daher davon ausgehen, dass mit einem BAC-Chip, der eine durchschnittliche Auflösung von 0,5 bis 1 Mb bietet, ein Großteil der klinisch bedeutsamen Veränderungen erfasst wird.

Als Ergebnis dieser Überlegungen wird derzeit die in Abbildung 8 skizzierte Vorgehensweise zu Einsatz und Validierung einer Array-CGH-Analyse empfohlen. Die primäre Methode zur Abklärung einer mentalen Retardierung bei unauffälliger Chromosomenanalyse stellt demnach die BAC-Array-CGH mit einem Auflösungsvermögen von derzeit 0,56 Mb dar. Deletionen werden mittels FISH-Analyse überprüft, Duplikationen oder mehrere einzelne Veränderungen mittels eines 44K-Chips, der über ein Auflösungsvermögen von ca. 50 kb verfügt. Bei spezieller Indikation, z.B. möglichst genauer Analyse eines Translokationsbruchpunktes, können alternativ die höher auflösenden 105K- oder 244K-Chips eingesetzt werden.

Zusammenfassend ist der Einsatz der Array-CGH ein wesentlicher Fortschritt bei der genetischen Diagnostik von mentalen Entwicklungsstörungen bei Kindern und Jugendlichen oder der präziseren Charakterisierung

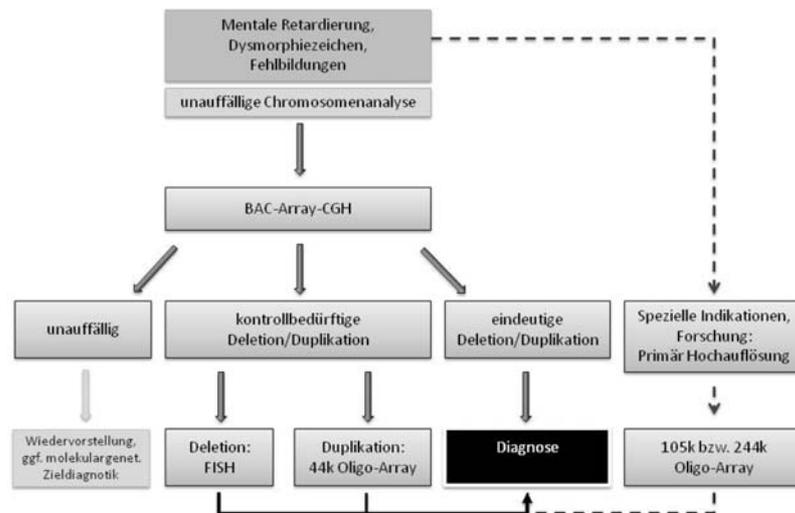


Abbildung 8 Empfehlung zu Einsatz und Validierung einer Array-CGH-Analyse bei mentaler Retardierung.

bekannter chromosomaler Imbalancen, auf die im klinisch-diagnostischen Bereich nicht mehr verzichtet werden kann. Nach unserer Erfahrung stellt die verwendete BAC-Array-Diagnostik ein robustes Verfahren dar, mit dem ein Großteil klinisch relevanter Veränderungen erfasst wird. Da die Array-CGH die bisher durchgeführte Subtelomerdagnostik bei nur unwesentlich höheren Kosten, aber deutlich verbesserter Aussagekraft bei dieser Indikation ersetzt, ist die Forderung nach Kosteneffizienz erfüllt. Dennoch ist die klassische Zytogenetik bei der Abklärung einer mentalen Entwicklungsstörung bei Kindern auch weiterhin unverzichtbar.

Literatur

- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 1997;72:468–77.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006;140:2063–74.
- McLaren J, Bryson SE. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am J Ment Retard* 1987;92:243–54.
- Tzschach A, Ropers H-H. Genetik der mentalen Retardierung. *Dtsch Arztebl* 2007;104:1400–5.
- Rost I, Klein H-G. Genetische Diagnostik bei mentaler Retardierung. *J Lab Med* 2005;29:152–61.
- Van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet* 2005;13:6–25.
- Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, et al. Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2006;43:478–89.
- Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:310–6.
- de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001;38:145–50.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:399–407.
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207–11.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–21.
- Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, et al. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* 2007;28:1124–32.
- Lu XL, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS ONE* 2007;2:e327.
- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005;77:606–16.
- Heinrich U, Locher M, Hinrichsen T, Sendelbach K, Polten A, Rost I. Validation of BAC-array CGH using a different array platform. *Eur J Hum Genet* 2008;16(Suppl 2):125.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004;305:525–8.

18. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004;36:949–51.
19. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007;39:S48–54.
20. Zogopoulos G, Ha KCH, Naqib F, Moore S, Kim H, Montpetit A, et al. Germ-line DNA copy number variation frequencies in a large North American population. *Hum Genet* 2007; 122:345–53.
21. Daniel A, Darmanian A, Peters G, Goodwin L, Hort JR. An innocuous duplication of 11.2 Mb at 13q21 is gene poor: sub-bands of gene paucity and pervasive CNV characterize the chromosome anomalies. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:2452–9.
22. Barber JC. Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. *J Med Genet* 2005; 42:609–29.
23. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Genetics* 2006;7:85–97.
24. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 2006;38:1038–42.
25. Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, Gribble S, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 2006;38:1032–7.
26. Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, Regan R, et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 2006;38:999–1001.
27. Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, Donnai D, et al. 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;77:154–60.
28. Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, et al. Molecular mechanism for duplication 17p11.2 – the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 2000;24:84–7.
29. Ciccone R, Giorda R, Gregato G, Guerrini R, Giglio S, Carozzo R, et al. Reciprocal translocations: a trap for cytogeneticists? *Hum Genet* 2005;117:571–82.
30. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Bee Ling Ng, Douglas EJ, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet* 2006; 42:8–16.
31. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, et al. Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 2007;44: 750–62.

Internetadressen (URLs):

Database of Genomic Variants: <http://projects.tcag.ca/variation/>

European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations; <http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>

DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; <https://decipher.sanger.ac.uk>

Glossar

BAC: bacterial artificial chromosome; künstliches, genetisch verändertes Chromosom, mit dessen Hilfe Fremd-DNA mit einer Größe von bis zu 300 kb in *E. coli* eingeschleust und vermehrt werden kann.

CGH: comparative genomic hybridization.

CNA: copy number aberration, Kopienzahlveränderung; Bezeichnung für ein im Vergleich zu einem Referenzgenom in variabler Kopienzahl vorkommendes DNA-Segment mit phänotypischen Auswirkungen; der Begriff CNV sollte auf Zugewinne bzw. Verluste ohne phänotypische Auswirkungen begrenzt bleiben.

CNP: copy number polymorphism, Kopienzahlpolymorphismus; CNV, der in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von > 1% vorkommt.

CNV: copy number variant/variation, Kopienzahlvariante; DNA-Segment von > 1 kb Größe, das im Vergleich zu einem Referenzgenom in variabler Kopienzahl vorkommt; CNVs umfassen Zugewinne (Duplikationen, Amplifikationen, Insertionen) oder Verluste (Deletionen, Null-Phänotypen). In der Literatur werden CNVs mit einer Größe > 50 kb häufig auch als large-scale copy number variants (LVC) bezeichnet. Im momentanen Sprachgebrauch macht der Begriff CNV keine Aussage über mögliche phänotypische Effekte.

FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; Methode zum Nachweis bestimmter DNA-Bereiche mittels Fluorochrom-markierter DNA-Fragmente (Größe zwischen 50 und 200 kb) auf einem Chromosomen- oder Schnittpräparat (in situ).

kb: 1000 Basenpaare.

Mb: 1 Millionen Basenpaare.

PAC: P1 artificial chromosome; künstliches, genetisch verändertes Bakteriophagen P1-Genom, mit dessen Hilfe Fremd-DNA mit einer Größe von bis zu 300 kb in *E. coli* kloniert werden kann.

SD: Segmentduplikation (auch als low copy repeat (LCR) oder Duplicon bezeichnet); DNA-Segment mit einer Größe < 1 kb und einer Sequenzhomologie von > 90%, das im haploiden Chromosomensatz mit zwei oder mehr Kopien vorkommt; SDs umfassen ca. 5% des Gesamtgenoms und sind häufig die Ursache für die Entstehung von Mikrodeletionen bzw. -duplikationen.

SNP: single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus; Polymorphe Variante, die durch Veränderung eines einzelnen Nukleotids entsteht.

SV: Strukturvariante; Genomische Veränderung eines DNA-Segmentes mit einer Größe von > 1 kb; SVs können Quantität (Deletionen, Insertionen, Duplikationen), Position (Translokationen) oder Orientierung (Inversionen) betreffen.